

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19430

研究課題名(和文) 内皮eNOS-NO産生機構活性化における基底膜分子パールカン機能ドメインの探索

研究課題名(英文) Exploration of basement membrane molecule perlecan function domain in endothelial eNOS-NO production activation

研究代表者

野中 里紗 (NONAKA, RISA)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：90614248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：基底膜分子パールカンの遺伝子の発現を人為的に低下させた大動脈内皮細胞(HAECs)を用いた内皮型NO合成酵素(eNOS)の発現・活性調節機構の解析より、パールカン発現の低下は、eNOS発現を低下させることを示した。eNOSの発現・活性化を調節に關与するSrcリン酸化およびAktリン酸化のシグナル活性化は低下を示し、血管内皮増殖因子(VEGF)レセプター2(VEGFR2)の発現にも影響を与えた。パールカンは、Src/Akt経路を介してeNOS発現調節に關与することがわかった。組換えパールカン機能フラグメントを用いた解析は、パールカン機能ドメインVのeNOS発現調節に対する寄与は低いことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内皮機能の研究において、血管収縮・弛緩の調節は盛んに研究されているが、細胞外マトリックス分子との関連はほとんど明らかにされていない。本研究遂行により、細胞外マトリックス分子であるパールカンが、Src/Aktのシグナル経路を介して内皮細胞におけるeNOS発現維持に寄与することを示した。パールカンが制御するeNOS発現・活性化機構の機序を明らかにすることで、細胞外マトリックスの内皮機能維持に対する新たな知見を示した。また、パールカン機能フラグメントを用いた解析は、さらに解析を進めることで、機能制御に必要な配列を明らかにでき、機能維持・改善の治療法の開発のための新たな知見につながる解析である。

研究成果の概要(英文)：A knockdown of perlecan, a basement membrane component, in Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) by perlecan siRNA caused a reduced expression of endothelial NO synthase (eNOS) but not a reduced phosphorylated eNOS expression. A Src kinase phosphorylation, Akt phosphorylation and VEGF receptor 2 expressions involved in the regulation of eNOS expression and eNOS phosphorylation were decreased by knockdown of perlecan in HAEC. These results indicated that perlecan related eNOS expressions via Src/Akt signaling pathway. Analysis of perlecan functional fragments indicates that perlecan functional domain V is less involved in the regulation of eNOS expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：パールカン 内皮型NO合成酵素 細胞外マトリックス 血管内皮機能

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスは、様々な疾患発症・進行において、発現異常や構造異常が認められており、細胞外マトリックス分子の機能解明・制御することで疾患治療へと結びつけることが期待されている。本研究で着目した細胞外マトリックス分子であるパールカンは、基底膜を構成する構造タンパク質である一方、様々な細胞内シグナルを修飾・制御する多機能細胞外マトリックスとして知られている。パールカンは、血管組織において主に血管内皮細胞および血管平滑筋細胞から産生され、内皮細胞と中膜層との結合に関与する基底膜を構成する一方で、近年、内皮細胞の増殖や平滑筋細胞活性調節、アテローム性動脈硬化症など、血管の形成や形態維持だけでなく血管病変の進行にも関与することが報告されており (Hummel et al., 2004)、血管系内の様々なプロセスに重要な細胞外マトリックスであることが明らかになってきている。パールカンの完全欠損は、軟骨異形成による呼吸不全のため周産期致死性であるが (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al., 1999)、軟骨特異的にパールカンを発現させ生存可能としたコンディショナルノックアウトマウスを作成することにより、様々な組織におけるパールカンの役割を解析することが可能となった (Tsumaki et al., 1999; Xu et al., 2010; Ishijima et al., 2012)。これまで研究代表者は、心血管機能・構造におけるパールカンの役割を明らかにすること目的としたパールカン欠損マウス大動脈およびパールカンノックダウンした大動脈内皮細胞を用いた解析を行い、パールカン欠損大動脈が内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現低下を引き起こし、内皮依存性の機能低下を引き起こすことを新たに見出し、パールカンが内皮機能維持の一部に役割を担うことを示した (Nonaka et al., 2015)。しかし、パールカンと eNOS 発現・活性化機構の詳細な機序は明らかになっていない。

血管内皮機能は、一酸化窒素 (NO) などの血管作動性因子を放出して、血管の収縮・弛緩、血管透過性、炎症細胞の接着、凝固・線溶系の調節などであり、NO バイオアベイラビリティは最も重要であると考えられている。NO 産生・調節に関わる eNOS の発現・活性化の解析は重要であると考えられる。NO 産生は、eNOS のセリン残基 (Ser1177) とスレオニン残基 (Thr495) のリン酸化による eNOS 活性化により産生される。eNOS 活性化の経路には Ca^{2+} 依存性・非依存性経路があり、複数の経路によって調節が行われているが、 Ca^{2+} 非依存性経路の 1 つとして、PI3K により活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである Akt による、PI3K-Akt 経路による eNOS 活性化が報告されている (Dimmeler et al., 1999)。また Src キナーゼを介した PI3K-Akt 経路は、Shear Stress 誘導による eNOS の発現調節の中心的役割を担う報告がされており (Davis ME et al., 2001)、eNOS の発現・活性化のどちらにも重要なシグナル経路であると考えられる。さらに、パールカンは血管内皮増殖因子 (VEGF) レセプター2 (VEGFR2) と結合し、VEGF-VEGFR2 の活性化を促進することにより血管新生を促進することも報告されている (Ishijima et al., 2012)。

近年、細胞外マトリックスの分解フラグメントが様々な生物活性を有することが明らかになっている。パールカンのドメイン V フラグメントであるエンドレペリン (Mongiati M. et al., 2003) は、脳血管の内皮細胞に対し血管新生促進、脳血管以外の内皮細胞に対し血管新生抑制を示すと報告されているが、この作用はパールカン分子自体には認められず、フラグメントになることにより作用を示す。細胞外マトリックスの機能ドメイン・フラグメントの解析は、強力な特異的な生物活性を見出す可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、基底膜分子パールカンに着目した一酸化窒素 (NO) 産生・調節機構の解析を行い、内皮機能維持におけるパールカン機能ドメインの探索を目的とした。

3. 研究の方法

(1) パールカン分子に着目した一酸化窒素 (NO) 産生・調節機構の解析

ヒト大動脈内皮細胞 (HAECs) にパールカン siRNA およびコントロール siRNA を処理し、ノックダウン HAECs を作製し、以下の検討を行った。

① パールカン欠損が内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 活性化に与える影響の検討

NO 産生・調節機構に重要である eNOS 活性化におけるパールカン欠損の影響を検討するため、作製したパールカンノックダウン HAECs を用いて、リン酸化 eNOS および eNOS の特異的抗体を指標としたウェスタンブロット法を用いて解析した。

② パールカン欠損がセリン・スレオニンキナーゼである Akt の活性化に与える影響の検討

eNOS の発現および活性化の調節へ関与すると報告されている Akt シグナルの活性化に対するパールカン欠損の影響を検討するため、作製したパールカンノックダウン HAECs を用いて、リン酸化 Akt および Akt の特異的抗体を指標としたウェスタンブロット法を用いて解析した。

③ パールカン欠損が Src キナーゼのシグナル活性化に与える影響の検討

eNOS の発現および活性化の調節において関連が報告されている Src キナーゼの活性化に対するパールカン欠損の影響を検討するため、前述したパールカンノックダウン HAECs を用いて、リン酸化 Src および Src の特異的抗体を指標としたウェスタンブロット法を用いて解析した。

④ パールカン欠損が血管内皮増殖因子 (VEGF) レセプター2 (VEGFR2) の活性化に与える影響の検討

血管新生に役割を果たす VEGF-VEGFR シグナル経路活性化におけるパールカン欠損の影響を

検討するため、前述したパールカンノックダウン HAECs を用いて、VEGF 存在下で、リン酸化 VEGFR2 および VEGFR2 の特異的抗体を指標としたウェスタンブロット法を用いて解析した。

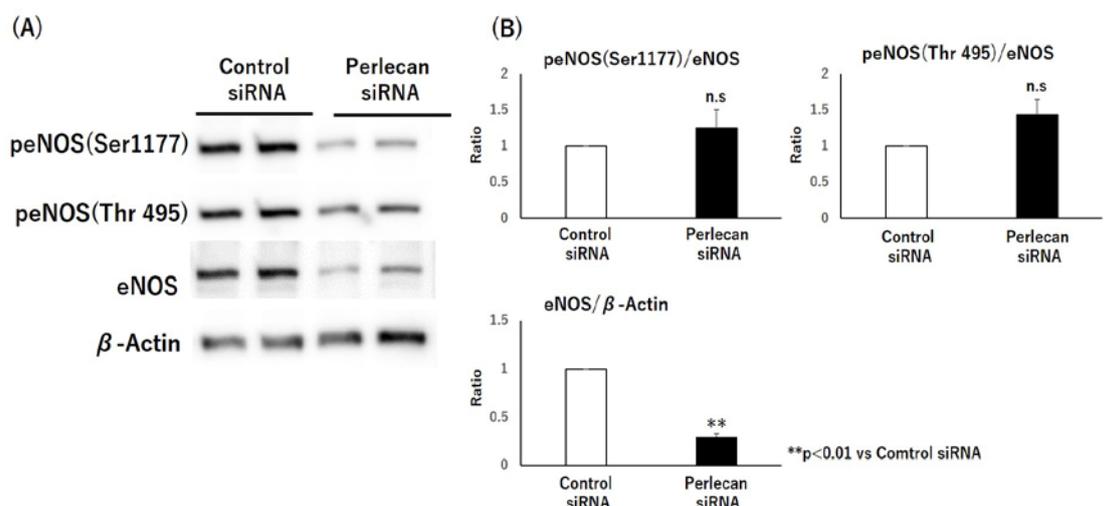
(2) パールカン機能ドメインの組み換えタンパク質を用いた eNOS 発現変動の検討

eNOS 発現に関与するパールカン機能ドメインの探索する為、パールカン機能ドメインとして報告されているエンドレペリンをコートしたプレート上に、パールカン siRNA 処理した HAECs を播種し、36 時間後の eNOS の mRNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

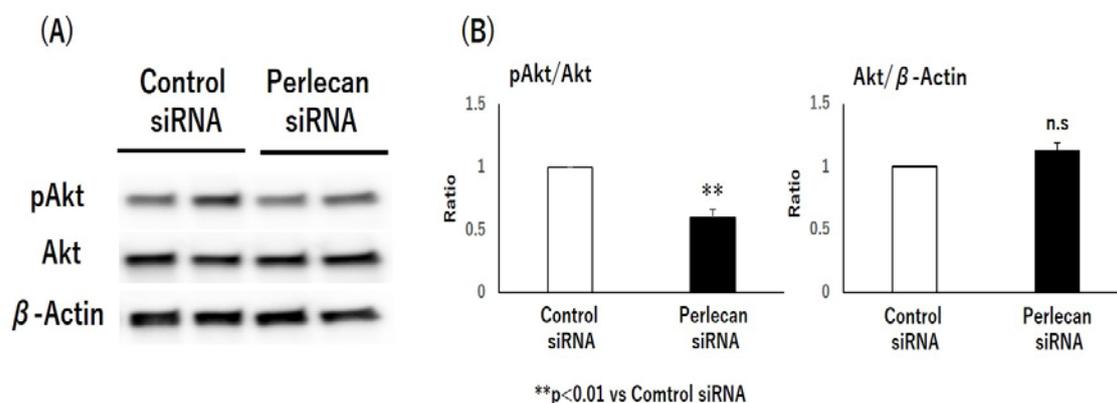
(1) パールカン分子に着目した一酸化窒素 (NO) 産生・調節機構および内皮機能の検討

① ヒト大動脈内皮細胞 (HAECs) にパールカン siRNA およびコントロール siRNA を処理し、パールカンノックダウン HAECs を作製した。パールカンノックダウン HAECs における eNOS 発現を確認した結果、eNOS のたんぱく質発現が対照 HAECs と比較し、有意に減少することを確認した (図 1-A, B)。これは我々の以前の報告における結果と同様であった。更に、eNOS の活性化は、セリン残基 (Ser1177) とスレオニン残基 (Thr495) のリン酸化により調節されている為、それらリン酸化の特異的抗体を用いてリン酸化 eNOS (peNOS) の解析を行った。その結果、リン酸化 eNOS の Ser1177 および Thr495 どちらのタンパク質発現は低下していたが (図 1-A)、eNOS の活性化 (pAkt/Akt) は、対照 HAECs と比較し、有意な差は認められなかった (図 1-B)。以上のことから、パールカンは、eNOS 活性化にはあまり影響を与えず、eNOS 発現に顕著に影響を与えることがわかった。



(図 1) パールカンノックダウン HAECs における peNOS・eNOS のタンパク質発現

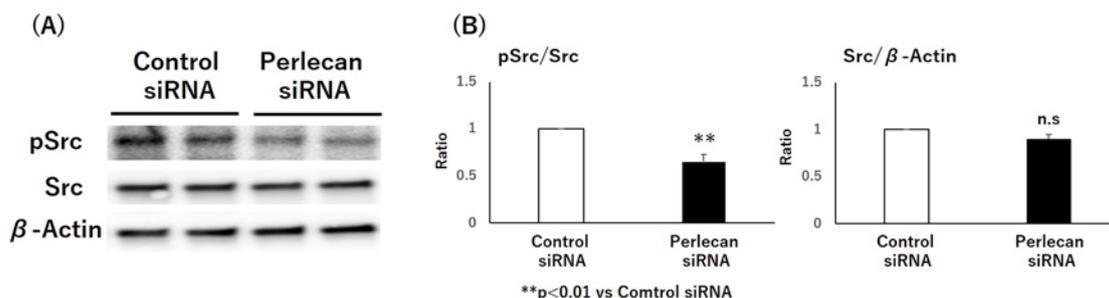
② eNOS の発現および活性化の調節への関与が報告されている Akt シグナルの活性化に対するパールカン欠損の影響を検討する為、前述同様にパールカン siRNA 処理により作製したパールカンノックダウン HAECs を用いて、Akt シグナル活性化の検討を行った。その結果、対照 HAECs と比較してリン酸化 Akt (pAkt) の発現が減少していたが、Akt の発現には変化が認められず (図 2-A)、Akt シグナルの活性化 (pAkt/Akt) は、対照 HAECs と比較して有意な減少が認められた (図 2-B)。このことから、パールカンは、Akt シグナルの活性化に影響を与えることがわかった。



(図 2) パールカンノックダウン HAECs における pAkt・Akt のタンパク質発現

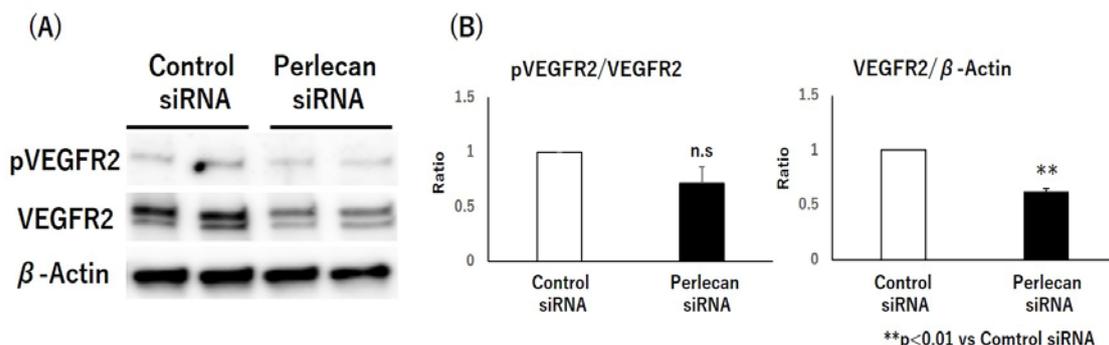
③ eNOS の発現調節において中心的役割を果たすことが報告されており、上記 Akt シグナルの上流経路の 1 つでもある Src キナーゼの活性化に対するパールカン欠損の影響を検討する為、前述同様にパールカン siRNA 処理により作製したパールカンノックダウン HAECs を用いて、Src

キナーゼ活性化の検討を行った。その結果、対照 HAECs と比較してリン酸化 Src (pSrc) の発現が減少していたが、Src の発現には変化が認められず (図 3-A)、Src キナーゼの活性化 (pSrc/Src) は、対照 HAECs と比較して有意な減少が認められた (図 3-B)。このことから、パールカンは、Src シグナルの活性化に影響を与えることがわかった。



(図 3) パールカンノックダウン HAECs における pSrc・Src のタンパク質発現

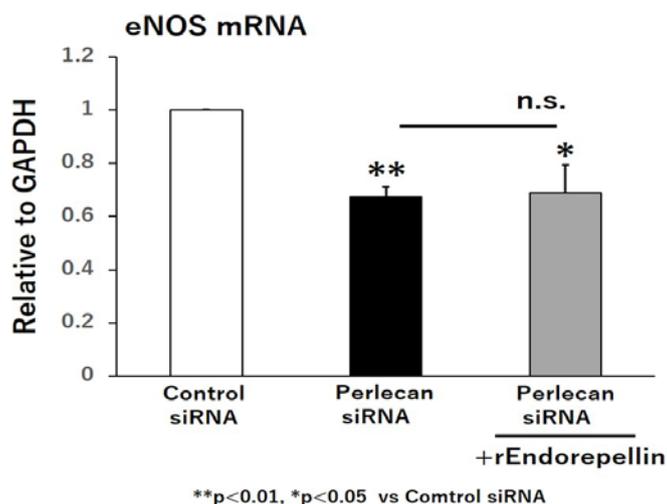
④次に、パールカンは血管内皮増殖因子 (VEGF) レセプター-2 (VEGFR2) と結合し、VEGF-VEGFR2 の活性化を促進することにより血管新生を促進する役割を果たすことが知られている。VEGF-VEGFR2 の活性化におけるパールカン欠損の影響を検討するため、前述同様にパールカン siRNA 処理によりパールカンノックダウン HAECs を作製後、VEGF 処理を行い、VEGFR2 の活性化の検討を行った。その結果、リン酸化 VEGFR2 (pVEGFR2) の発現および VEGFR2 の発現どちらも低下していたが (図 4-A)、VEGF-VEGFR2 の活性化 (pVEGFR2/VEGFR2) は、対照 HAECs と比較して減少傾向を示したものの、有意な減少は認められなかった (図 4-B)。この VEGFR2 の発現低下は、VEGF 非存在下においても減少を示していた (未掲載)。このことから、パールカンは、VEGF-VEGFR2 の活性化への寄与は低く、VEGFR2 の発現に影響を与えることで、血管新生に影響を与えることがわかった。



(図 4) パールカンノックダウン HAECs における pVEGFR2・VEGFR2 のタンパク質発現

(2) パールカン機能ドメインの組み換えタンパク質を用いた eNOS 発現変動の検討

我々これまでの組み換えパールカンを用いたレスキュー実験の解析より、パールカンが eNOS 発現調節に重要であることを明らかにしている。パールカン機能ドメインの最小単位の探索する為、パールカンの機能フラグメント V として報告のある組換えエンドレペリンを用いてレスキュー実験を行った。組換えエンドレペリンをコートしたプレート上に、作製したパールカンノックダウン HAECs を播種し、36 時間後の eNOS の RNA 発現変動を検討した結果、パールカンノックダウンにより減少した eNOS の RNA 発現 (図 5, 中央カラム) は、組み換えエンドレペリンの存在下においても回復せず、対照 HAECs の eNOS の RNA 発現と比較して有意に減少したままであった (図 5, 右端カラム)。エンドレペリンは、eNOS の RNA 発現の変動調節における寄与は少ないことが分かった。



(図 5) 組み換えエンドレペリン存在下の eNOS mRNA 発現変動

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

○野中 里紗、家崎 貴史、佐々木 隆子、平澤 (有川) 恵理、大動脈内皮機能における細胞外マトリックス、パールカンの役割、第41回日本分子生物学会年会、(2019年11月28-30日)、パシフィコ横浜

6. 研究組織

研究代表者

野中 里紗 (Nonaka Risa)

順天堂大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：90614248

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。