

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19881

研究課題名(和文) PAI-1を介した新しい老化の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the new control mechanism of aging through PAI-1

研究代表者

段 孝 (Dan, Takashi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00512451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：SASP(細胞老化関連分泌形質)のTNF α の転写に対するPAI-1の影響について検討した結果、PAI-1がマクロファージのサイトカインの発現を直接亢進するというこれまで報告がないPAI-1の新規生理作用を見出した。この作用は、従来から知られる線溶系制御とは全く異なる。すなわち、マウスマクロファージ由来RAW246.7細胞株の培養系において、マウスPAI-1の添加は生理的濃度範囲である5nMで分泌TNF α 量が上昇し、それはLPS刺激と匹敵するものであった特筆すべきことに、化合物(仮称CompoundX)がPAI-1で誘導されるTNF α 産生を抑制することも発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物(仮称CompoundX)がPAI-1で誘導されるTNF α 産生を抑制することの発見は、新薬創製のシーズとなり、新しい機序の抗炎症剤や抗がん剤の研究開発につながる。

研究成果の概要(英文)：As a result of examining the influence of PAI-1 on the transcription of TNF α of SASP (cellular senescence related secretory trait), the new physiological action of PAI-1 which has not been reported so far has been reported that PAI-1 directly enhances macrophage cytokine expression I found it. This action is completely different from conventionally known fibrinolytic control.

研究分野：創薬科学

キーワード：老化制御 PAI-1 TNF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、長年 PAI-1 の生理作用研究を行い、低分子 PAI-1 阻害薬の臨床候補品を世界に先駆けて有している。また、その研究過程で、従来は凝固線溶系や線維化に関わると考えられていた PAI-1 が、老化に深くかかわることを発見した。具体的には、細胞老化において、PAI-1 の発現は亢進することが知られているが、その細胞内での作用は分かっていない。申請者らは、従来細胞外で作用すると考えられている PAI-1 が細胞内で作用することを突き止めた。申請者らは、PAI-1 阻害薬が炎症モデル動物において細胞老化に関わる BDNF (PLoS One. 2015;10:e0124510) や TGF-1 (データ未公表) の mRNA を上昇させることを見出している。そこで、PAI-1 の細胞老化、老化細胞の個体老化における重要性の解析とそこに関連する新たな制御機構・シグナル伝達系の発見と解明を目指した。

2. 研究の目的

申請者は、従来細胞外で作用すると考えられている PAI-1 が細胞内で作用することを突き止めている。本研究では、TGF- 1 を始めとする老化関連遺伝子の PAI-1 による転写制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1. PAI-1 反応性 TGF- 1 分泌の解析

TGF- 1 等の転写調節領域のレポーターアッセイ系を構築し、PAI-1 および TGF-1 発現細胞 (HepG2、および THP-1 細胞) に導入した。また、細胞外からの LPS あるいは PAI-1 シグナルは、それらを細胞培養液への添加後、培養液中の TGF- 1 を ELISA により測定した。

2. PAI-1 反応性 TNF- 分泌の解析

TGF- 1 等の転写調節領域のレポーターアッセイ系を構築し、PAI-1 および TNF- 発現細胞 (THP-1 細胞) に導入した。また、細胞外からの LPS あるいは PAI-1 シグナルは、それらを細胞培養液への添加後、培養液中の TNF- を ELISA により測定した。

4. 研究成果

本研究では、SASP (細胞老化関連分泌形質) の確実な因子と考えられる PAI-1 による TGF- 1 の転写制御機構を明らかにすることを目標とした。

まず TGF- 1 の転写調節領域のレポーターアッセイ系を構築し、PAI-1 および TGF-1 発現細胞 (例えば、HepG2) に導入することを計画した。ヒトゲノムサンプルから PCR 法で得た TGF- 1 転写調節領域 (accession No. AY871232.1) を pGLS3 ベクターのマルチクロニングサイトに一旦導入したのち、さらに pGL4.18 ベクターに移入した。作製したプラスミドの塩基配列とゲノムデータベースを比較したところ、273 番目塩基の後に GAG の 3 塩基の追加があった以外、転写調節領域の 49 番目から 1840 番まで 1 塩基の違いを除いて完全に一致し、ヒト TGF- 1 転写調節領域を含むレポータープラスミドができていることを確認した。次に、lipofectamine2000 を用いて HepG2 細胞に導入し、G418 存在下で安定発現株細胞を得た。得られた細胞株を LPS で刺激して、TGF- 1 分泌を ELISA で確認しようとしたところ、想定外の事態が生じた。すなわち市販の TGF- 1 の ELISA キットの全てで、培地による高いバックグラウンド値を示し、培地中の血清由来の種差に依存しない TGF- 1 の影響の方が大きいこと (ヒト TGF- 1 に特異的な ELISA が存在しない) が明らかになった。また、

その追求と対応検討に予定外の時間を費やした。

そこで、HepG2 細胞を断念し、無血清培地でも培養が可能な THP-1 細胞を用いることに計画を変更して、TGF- β 1 転写調節領域のレポーターを含む THP-1 の安定発現株細胞を得た。LPS による TGF- β 1 分泌亢進を検討した結果、LPS による TGF- β 1 分泌亢進は確認されたが、PAI-1 による TGF- β 1 発現の亢進や分泌促進は認められなかった。そこで、SASP の 1 つである TNF α について検討を行った。線溶系制御とは全く異なり、PAI-1 がマクロファージの TNF α などのサイトカインの発現を直接亢進するというこれまで報告がない PAI-1 の新規生理作用を見出した。すなわち、マウスマクロファージ由来 RAW246.7 細胞株の培養系において、マウス PAI-1 の添加は生理的濃度範囲である 5 nM で分泌 TNF α 量が 37 倍に上昇し、それは LPS 刺激と匹敵するものであった。この PAI-1 刺激による TNF α 分泌促進作用はヒトマクロファージ系の THP-1 細胞株でも確認した。

PAI-1 がマクロファージの遊走に不可欠であり、PAI-1 阻害薬の TM5275 がその遊走を阻害することを見出している (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33:935-42)。しかし、PAI-1 刺激による TNF α 分泌促進に対しては TM5275 をはじめとして、PAI-1 阻害薬として線溶系を促進することが報告されている PAI-1 阻害薬の PAI-039、PAZ-417、CDE-096 はいずれも影響を示さなかったが、PAI-1 中和抗体は阻害した。この PAI-1 による TNF α 分泌亢進が転写調節の促進による可能性を検討する目的で、レポーターアッセイ系を構築した。さらに、特筆すべきこととして、別用途で臨床開発中に経口吸収性が問題で開発中止になった化合物 (仮に Compound X と名付ける) が PAI-1 で誘導される TNF α 産生を抑制することも発見した。

5 . 主な発表論文等

該当なし

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

下記、該当なし

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。