

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06638

研究課題名(和文) 血管内皮細胞の線溶調節を担う細胞内シグナル経路の解析

研究課題名(英文) Intracellular signal pathways that are involved in the regulation of fibrinolysis by vascular endothelial cells

研究代表者

山本 千夏 (YAMAMOTO, Chika)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：70230571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- $\beta$  を介してPAI-1の誘導に關する転写因子であるSmad2とSmad3のカドミウムによるPAI-1誘導への寄与を、ヒト血管内皮細胞株EA.hy926細胞の培養を用いて検討した。その結果、カドミウムは、非毒性濃度である 20  $\mu$ Mまでは、t-PAの発現に影響を与えずにPAI-1の発現を誘導すること、カドミウムによるPAI-1の誘導はSmad2とSmad3に一部介在されることがわかった。本研究により、カドミウムによる血管障害のメカニズムの一端が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カドミウムは、イタイイタイ病の原因物質として知られている。一方、古くからカドミウムが動脈硬化の危険因子であることが動物実験や疫学研究において指摘されてきた。アテローム性動脈硬化部位は、血栓形成を伴う虚血性心疾患になりやすい。血液凝固線溶系の制御は、血管の内腔を覆う血管内皮細胞の重要な機能である。本研究の結果は、カドミウムによる血管病変のメカニズムの一端を示しただけでなく、血管内皮細胞線溶系の異常と血管病変を含む生活習慣病の理解に重要な知見を提供したものと考える。

研究成果の概要(英文)：The contribution of Smad2 and Smad3, transcription factors involved in TGF- $\beta$ -mediated induction of PAI-1, to cadmium induction of PAI-1 synthesis was investigated using cultures of human vascular endothelial cell line EA.hy926 cells. The results showed that cadmium induced the expression of PAI-1 without affecting the expression of t-PA up to a non-toxic concentration of 20  $\mu$ M, and that the induction of PAI-1 by cadmium was partly mediated by Smad2 and Smad3. This study provides a part of mechanisms underlying cadmium-induced vascular injury.

研究分野：重金属毒性

キーワード：カドミウム 血管内皮細胞 線溶系 プラスミノゲンアクチベーター1

### 1. 研究開始当初の背景

重金属であるカドミウムは、四大公害の一つであるイタイイタイ病の原因物質であり、腎臓の近位尿細管障害や骨軟化症を引き起こすことが知られている。現在でも、人は食事や喫煙などを通じて非意図的にカドミウムを摂取し続けている。古くからカドミウムが動脈硬化の危険因子であることが動物実験や疫学研究において指摘され、アテローム性動脈硬化部位は、血栓形成に伴う虚血性心疾患になりやすいと考えられる。血液凝固線溶系の制御は、血管の内腔を覆う血管内皮細胞の重要な機能である。組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1) は、血管内皮細胞で合成される主要な線溶系調節物質である。線溶系は t-PA と PAI-1 活性のバランスに依存しているため、t-PA が優位になるとプラスミノゲンをプラスミンに変換することで線溶が促進され、PAI-1 が優位になると線溶が抑制される。結果的に線溶活性が低下すると、血管内血栓の溶解が阻害されるため、虚血性心疾患のリスクが高まることが数多く報告されている。

### 2. 研究の目的

これまでに研究代表者はカドミウムが t-PA の発現に影響を与えることなく、PAI-1 の mRNA レベルを特異的に誘導することで PAI-1 タンパク質の分泌が増加し、線溶活性が抑制されることを報告した (Yamamoto *et al.*, 1993; Yamamoto and Kaji, 2002)。しかしながら、カドミウムを介した PAI-1 の発現誘導に関与する転写因子はこれまで不明のままであった。Smad2 および Smad3 は transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を活性化する転写因子であり、TGF- $\beta$  が PAI-1 の発現誘導に関与しているだけでなく、カドミウムが Smad2/3 シグナルを活性化することが近年報告されている。本研究では、カドミウムによって誘導される線溶活性の低下における Smad2/3 シグナルの関与について検討した。

### 3. 研究の方法

これまで、ヒト冠状動脈内皮細胞あるいはヒト脳微小血管内皮細胞を用いて線溶活性の制御に関わる研究を行ってきた。しかしながら、これらの細胞は初代培養細胞であり、増殖が遅いだけでなく継代できる回数に制限があることから研究の遂行が困難であった。そのため本研究では、臍帯静脈内皮細胞株の EA.hy926 細胞を用いた。

EA.hy926 細胞は 10%FBS-DMEM で培養や継代が可能であるなどこれまで実験に用いてきた細胞とはカドミウムの感受性が異なることが予想されたために処理条件について検討をおこなった。EA.hy926 細胞を 10%FBS-DMEM でコンフルエントまで培養後、無血清 DMEM に交換し、カドミウム (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50  $\mu$ M) で 24 時間曝露後、MTT アッセイを用いてカドミウムによる非特異的な細胞毒性について評価した。EA.hy926 細胞を同様に培養後、カドミウム (1, 5, 10, 15, 20  $\mu$ M) で 24 時間処理し、処理後の培地を回収し t-PA および PAI-1 の分泌量を ELISA キットで測定した。さらに、線溶活性をフィブリンザイモグラフィにより検出した。t-PA および PAI-1 の遺伝子発現は定量的 RT-PCR で測定した。

カドミウム処理による PAI-1 の発現誘導における Smad2/3 シグナルの関与を調べるために、siRNA を導入し Smad2/3 の発現を干渉した際の遺伝子発現を RT-PCR を用いて測定し、同条件下において Smad2/3 のリン酸化の程度についてウエスタンブロットを用いて検討した。

### 4. 研究成果

カドミウムによる非特異的な細胞毒性の影響を排除するために、まず、EA.hy926 細胞で細胞毒性が観察されるカドミウム濃度を調べた。25  $\mu$ M 以上のカドミウム曝露後、EA.hy926 細胞の生存率は著しく低下し、CC<sub>50</sub> は 27.94  $\mu$ M と算出された (図 1 A)。さらに、20  $\mu$ M 以下の濃度のカドミウムを 24 時間曝露しても、細胞の形態に変化は見られなかった (図 1 B)。

図 1 血管内皮細胞におけるカドミウムの細胞障害性。コンフルエントな EA.hy926 細胞をカドミウム (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45  $\mu$ M) で 24 時間曝露し、[A] 細胞生存率と [B] 形態を評価した。50% 細胞毒性濃度 (CC<sub>50</sub>) は、細胞の生存率が 50% 低下する濃度と定義した。

図 1

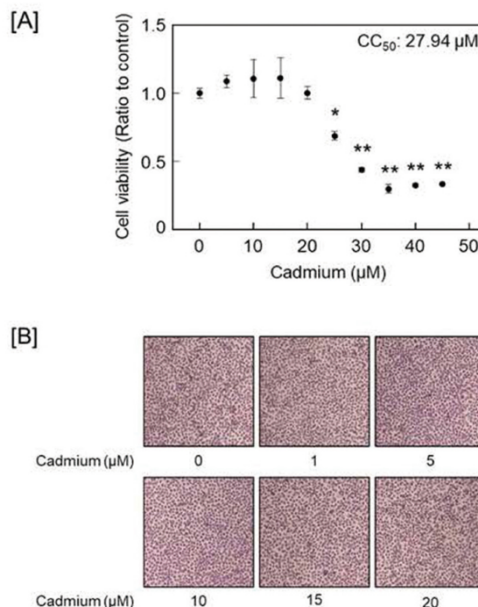


図 2

次に、EA.hy926 細胞の t-PA および PAI-1 の発現に対するカドミウムの影響を解析した。図 2 A に示すように、t-PA 活性はカドミウムにより用量依存的に抑制された。ELISA 法を用いて解析した結果、カドミウムによる t-PA 活性の抑制は、t-PA の減少ではなく、PAI-1 の条件培地への分泌が促進されたことによると考えられた (図 2 B)。さらに、カドミウムは、t-PA mRNA の発現に影響を与えることなく、PAI-1 mRNA の発現のみを選択的かつ用量依存的に誘導した (図 2 C)。これらの結果は、培養ヒト臍帯血管内皮細胞を用いた我々の報告と一致している (Yamamoto and Kaji, 2002; Yamamoto *et al.*, 1993)。

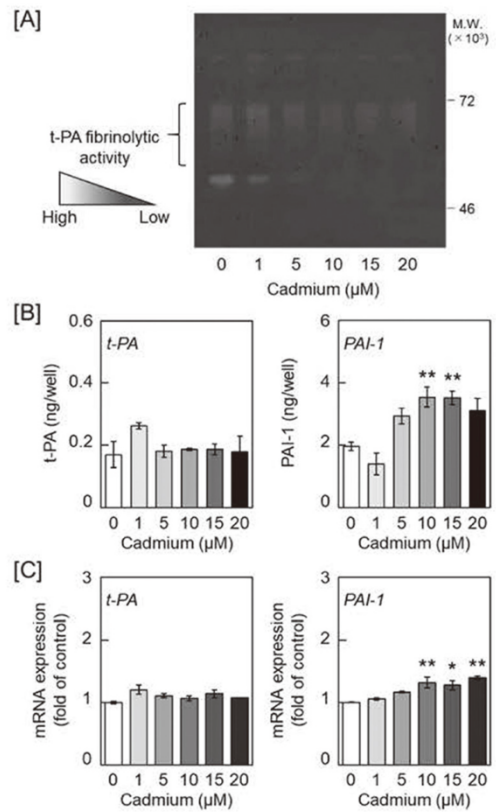


図 2 カドミウムは血管内皮細胞において PAI-1 の誘導を介して t-PA 線溶活性を抑制する。コンフルエントな EA.hy926 細胞に 1, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{M}$  のカドミウムを 24 時間曝露し、[A] 線溶活性、[B] タンパク質分泌、[C] mRNA 発現を解析した。

Smad2 および Smad3 は、PAI-1 mRNA の発現をアップレギュレートする主要な転写因子であることが明らかになっている。Smad2 および Smad3 がカドミウムによって活性化され、カドミウムによる PAI-1 mRNA のアップレギュレーションに関与しているかどうかについて調べた。Smad3 は 12 時間のカドミウム曝露によって活性化された (図 3 A)。一方、EA.hy926 細胞には Smad2 が発現していたが、その活性化状態は Smad3 に比べて弱かったカドミウムによる PAI-1 誘導への Smad2 と Smad3 の関与を調べるために、EA.hy926 細胞に Smad2 と Smad3 の siRNA をトランスフェクトした後、カドミウムで曝露した。Smad2 および Smad3 siRNA のトランスフェクションによって、カドミウムによる PAI-1 mRNA の発現を部分的に抑制し、Smad2 よりも Smad3 のノックダウンの方が PAI-1 の抑制効率が高いことが確認された (図 3 B)。カドミウム非存在下で 24 時間培養した後、Smad2 および Smad3 をノックダウンした細胞では、コントロールの siRNA を導入した細胞と比較して、PAI-1 mRNA の発現がそれぞれ 56% および 46% に抑制された。Smad2 と Smad3 をノックダウンすると PAI-1 mRNA の発現が抑制されるという結果は、Smad2 と Smad3 の両方によって PAI-1 mRNA 発現の基礎レベルが維持されていることを示唆していた。

図 3

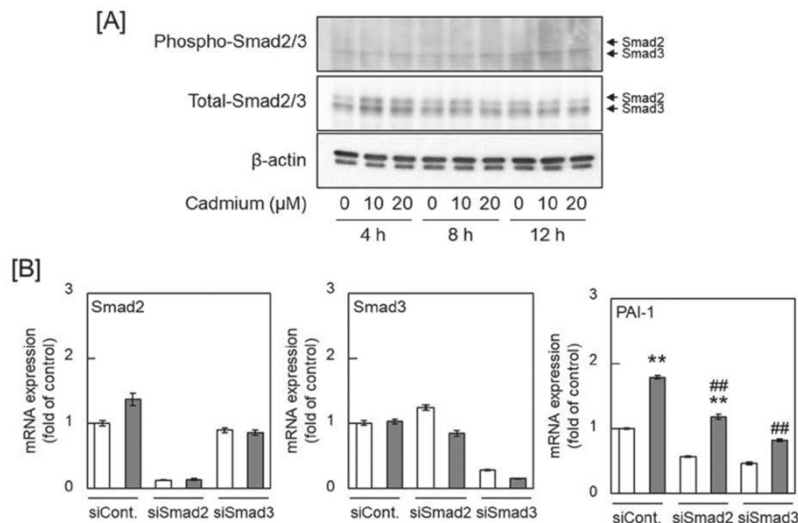


図 3 血管内皮細胞におけるカドミウムによる PAI-1 の発現は Smad2/3 が介在している。[A] コンフルエントな EA.hy926 細胞を 10 および 20  $\mu\text{M}$  のカドミウムで 4, 8, 12 時間曝露後、Smad2/3 のリン酸化を検出した。[B] Smad2 (siSmad2) または Smad3 (siSmad3) をノックダウンした EA.hy926 細胞を 10  $\mu\text{M}$  のカドミウムに 24 時間曝露し、mRNA の発現を解析した。\*\* $p < 0.01$  vs. カドミウム非存在下 siCont. ### $p < 0.01$  vs. カドミウム存在下 siCont.

本研究では、カドミウムが Smad2 および Smad3 の活性化を介して PAI-1 の発現を誘導することにより、EA.hy926 細胞の線溶活性を抑制することを確認した。研究代表者らは、カドミウムによる PAI-1 の誘導がプロテインキナーゼ C を介して行われることを報告していたが (Yamamoto and Kaji, 2002)、本研究は、この誘導に転写因子 Smad2 と Smad3 が一部関与していることを明らかにしたものである。カドミウムによる PAI-1 の発現誘導におけるプロテインキナーゼ C と Smad シグナルの関係はまだ解明されていないが、これらの研究はカドミウムによる血管機能障害の分子メカニズムに関し重要な知見を提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hara Takato, Sakuma Miki, Fujie Tomoya, Kaji Toshiyuki, Yamamoto Chika	4. 巻 46
2. 論文標題 Cadmium induces plasminogen activator inhibitor-1 via Smad2/3 signaling pathway in human endothelial EA.hy926 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 249 ~ 253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.46.249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原崇人, 佐久間美岐, 藤江智也, 鍛冶利幸, 山本千夏
2. 発表標題 ヒト血管内皮細胞株EA.hy926細胞におけるカドミウムによるPAI-1発現誘導メカニズムの探索
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤江智也, 原崇人, 伊藤愛, 鍛冶利幸, 山本千夏
2. 発表標題 血管内皮細胞においてt-PA発現を誘導するターピリジン亜鉛錯体
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原崇人, 佐久間美岐, 藤江智也, 鍛冶利幸, 山本千夏
2. 発表標題 カドミウムによるヒト血管内皮細胞株EA.hy926細胞のPAI-1発現の誘導
3. 学会等名 生命金属に関する合同年会（ConMetal 2020）オンライン
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤江 智也  (FUJIE Tomoya)  (20780886)	東邦大学・薬学部・講師   (32661)	
研究 分担者	原 崇人  (HARA Takato)  (90805681)	東邦大学・薬学部・助教   (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------