

機関番号： 13802
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008~2010
 課題番号： 20590881
 研究課題名 (和文) 線溶阻害因子 PAI-1 による血管老化促進機構の解析

研究課題名 (英文) **Enhancement of vascular vessels senescence caused by a fibrinolytic inhibitor, PAI-1.**

研究代表者 井原 勇人 (IHARA HAYATO)
 浜松医科大学・医学部 助教
 研究者番号： 00223298

研究成果の概要 (和文)：

加齢と共に血管内皮から発現増強される PAI-1 分子の血管老化に与える影響を、培養血管内皮細胞及び PAI-1 遺伝子破壊 (PAI-1KO) マウスを用いて解析した。1) 内皮細胞の培養経過に伴い老化関連細胞周期因子 p16^{INK4A} が増加すると共に、老化マーカー (SA-β-gal 染色) との間に相関性を示した。2) PAI-1 ノックダウン内皮細胞では、p16^{INK4A} 発現が抑制され、3) 抗酸化ポリフェノール処理により、SA-β-gal 染色と p16^{INK4A} 発現の増加が抑制された。4) 老齢と若齢マウスの大動脈での発現遺伝子の差異を DNA マイクロアレイで解析したところ、老齢血管では PAI-1 を始めとして MnSOD、Hsp 等が増加し、GST、Troponin 等が減少していた。5) また PAI-1 KO 老齢血管では、老齢血管で発現増加していたものが低下し、細胞骨格、細胞外基質関連、ミトコンドリア関連遺伝子発現が減少していた。

研究成果の概要 (英文)：

To investigate the role of PAI-1 in vascular vessels senescence, we employed a vascular endothelial cell line, UV₂ cells, for studying molecular mechanisms of senescence and PAI-1 KO mice for studying the links between senescence and aging *in vivo*. After confluent, UV₂ cells increased expression levels of senescence-associated CDKI, p16^{INK4A} and a senescence marker, SA-β-gal staining. PAI-1 knockdown by RNA interference results in reduction of p16^{INK4A} gene expression in these cells. Treatments with resveratrol, an antioxidant polyphenol found in red wine, reduced p16^{INK4A} expression levels and SA-β-gal staining. DNA microarray analysis using aorta RNA from old-aged and young mice revealed that aging blood vessels increased expression levels of genes, such as PAI-1, MnSOD, Hsp etc. compared with young one and that aging blood vessels from PAI-1 KO mice reduced expression levels of genes concerned with cytoskeleton, extracellular matrix, mitochondrial components as compared with that from wild-type mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,000,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	950,000	4,120,000

研究分野： 分子血管病態学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学 循環器内科学

キーワード： PAI-1, 血管老化, 細胞周期制御因子, レスベラトロール

1. 研究開始当初の背景

ヒトは血管と共に老いると言われていた。高齢化が進む我が国の場合、加齢に伴う動脈硬化性疾患、虚血性心疾患、脳血管障害発症等の増加が、社会問題となってきた。血管内皮細胞から加齢と共に産生・分泌増強されるプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター1 (PAI-1) は、これら疾患発症に深く関与するだけではなく、近年、細胞老化を直接促進する鍵分子として働く事が明らかとなった (Kortlever, *et al Nat. Cell Biol.* 8, 877-884, 2006)。加齢と共に血管内皮細胞で発現・分泌増強されたPAI-1 分子の血管老化に与える影響は大きいと考えられた。

2. 研究の目的

これまでの研究代表者の脂肪細胞における PAI-1 遺伝子発現制御機構 (基盤研究 (C) H13-15) や抗酸化物質による血栓形成抑制機構 (基盤研究 (C) H17-19) から得られた知見を基盤として、本研究課題では、血管内皮細胞が分泌する PAI-1 による血管老化誘導の分子メカニズムについて、培養内皮細胞系、PAI-1 遺伝子破壊 (PAI-1KO) マウスを用いて解析する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養経過に伴う細胞周期制御因子の解析

培養血管内皮細胞 UV \varnothing 2 の培養経過に伴う細胞周期制御因子の変動を見るため、各タイムコースポイントにおける細胞抽出液、細胞からの Total RNA を用いてウェスタンブロット法及びリアルタイムPCR法により解析した。細胞老化は、そのマーカーの1つである SA- β -Gal 染色法にて解析した。

(2) shRNA発現ベクター安定発現株の作成と空ベクター発現株との比較

予めノックダウン効率を確かめてある配列を発現する shRNA 発現ベクターを構築し、トランスフェクションの後、ピューロマイシン薬剤耐性株を選別し、目的の遺伝子発現がノックダウンされている安定発現株を取得した。同様に取得した空ベクター導入株を比較し上記①の解析法にて解析した。

(3) 老齢PAI-1 KOマウスの遺伝子型の確認と血液サンプルでのPAI-1 発現の解析

2-3 mm の尾から抽出した DNA し、PCR 法により各遺伝子アレルを検出できるプライマーを用いて遺伝子型のチェックを行なった。また、血液中の PAI-1 量を ELISA 法で測定した。

(4) 大動脈血管 (Aorta) からのTotal RNAを用いたGene Chipによる網羅的発現解析

野生型及びPAI-1 KO型の老齢並びに若齢マウス血管から抽出した RNA を用い、DNA マイクロアレイ法により網羅的解析を行なった。

4. 研究成果

(1) マウス血管内皮細胞株UV \varnothing 2 細胞におけるPAI-1 分子の老化促進機構の解析

① 培養血管内皮細胞 UV \varnothing 2 の培養経過に伴う細胞周期制御因子の変動

培養血管内皮細胞 UV \varnothing 2 を用いて、老化マーカーの一つである SA- β -gal 染色を行なった所、コンフルエントになってから、培養経過に伴い染色される細胞の数が増加した。また、これらに呼応する様に老化関連サイクリンキナーゼインヒビター(CDKI)、p16^{INK4A} タンパクの発現量も増加した。また、p16^{INK4A} mRNA 発現量も培養経過に伴い増加傾向にあった。一方、同じ CDKI である p19^{ARF} タンパク発現量は減少傾向に、また p19^{ARF} mRNA はコンフルエント後 24 時間で増加ののち 120 時間にかけて減少した。

以上のことから、コンフルエント以降の培養経過に伴い同じ CDKI でも発現パターンが異なる事と、p16^{INK4A} 発現量と SA- β -gal 染色陽性との間に相関関係がある事が明らかとなった。

② shPAI-1 発現ベクター安定発現株の作成と空ベクター発現株との比較

PAI-1 RNA に対する合計 5 種類の siPAI-1 を合成し、そのノックダウン (KD) 効率の検討をリアルタイム PCR 法並びにウェスタンブロット法にて行なった。siRNA 5 種類のうち二種類の siRNA が最も効率よく PAI-1 mRNA を KD させ、ウェスタンブロットではほとんど

発現ゼロにまで抑制した。この配列の siRNA を発現する shPAI-1 発現ベクターを構築し、培養血管内皮細胞 UV₂ にトランスフェクションした。ピューロマイシン耐性で選択した後、PAI-1 が効率よく KD されている安定発現株を 2 株 (shPAI-1 A, H) 得た。

次にこれらを用いて項目①と同様培養経過に伴う老化マーカー SA- β -gal 染色並びに細胞周期制御因子の変動を検討した。shPAI-1 A, H 2 株とも同じようなタイムコースを示した。Mock (空ベクター導入) 株は WT 株と同様、老化関連サイクリンキナーゼインヒビター (CDKI) の内、p16^{INK4A} は mRNA、タンパクの発現量共に培養経過に伴い増加傾向を示し、反対に p19^{ARF} 発現量は減少するパターンを示した。さらにもう一つの CDKI である p21^{Cip/Kip} 発現量は培養経過に伴い増加するパターンを示した。それに対して、PAI-1 KD 安定株 (shPAI-1 A, H) では、p19^{ARF}、p21^{Cip/Kip} の発現パターンは Mock 株と同様であったが、p16^{INK4A} 発現は、PAI-1 KD によって有意に抑制されていた。しかしながら、p16^{INK4A} 発現が有意に抑制されているにもかかわらず、SA- β -gal 染色は、Mock 株と同等はそれ以上であった。

③ 抗酸化ポリフェノール・レスベラトロールによる老化関連サイクリンキナーゼインヒビター p16^{INK4A} 発現量に与える影響

抗酸化ポリフェノール・レスベラトロールは、NAD 依存性デアセチラーゼ Sirt I を活性化し、抗老化作用を有する事が知られている。そこで、コンフルエント以降の培養液にレスベラトロールを添加し、老化関連サイクリンキナーゼインヒビターと SA- β -gal 染色に与える影響を検討した。

レスベラトロールは、老化マーカー SA- β -gal 染色を有意に抑制すると共に老化関連サイクリンキナーゼインヒビター p16^{INK4A} 発現量を有意に減弱させた。p19^{ARF}、p21^{Cip/Kip} の発現量はあまり変化がなかった。

次に、レスベラトロールのターゲットである NAD 依存性デアセチラーゼ Sirt I を KD すると、老化マーカー SA- β -gal 染色度合いが増強した。しかし、これにレスベラトロールを添加しても SA- β -gal 染色が減弱す

ることから、Sirt I を介しない経路により SA- β -gal 染色を抑制しているものと考えられた。

- (2) 老齢並びに若齢の PAI-1 KO マウス及び野生型 (WT) マウスを用いた解析
老齢マウスになるまで長期間飼育を続けるため、若年齢のうちに遺伝子型を確認しておく事は重要である。このため以下のチェックを行った。

① 老齢 PAI-1 KO マウスの遺伝子型の確認と血液サンプルでの PAI-1 発現の解析

2-3 mm の尾から抽出した DNA し、PCR 法により各遺伝子アレル (KO と WT) を検出できるプライマーを用いて遺伝子型のチェックを行なった。野生型雄 8 匹、雌 3 匹、PAI-1 KO 雄 8 匹、雌 4 匹を検索した所、いずれのマウスも、野生型は 415 bp の WT 特異的なバンドが、KO 型は 190 bp の KO 特異的なバンドが検出され、遺伝子型が正しい事を確認した。さらに、血液サンプルの ELISA 測定から血中 PAI-1 量がほとんど認められないことを確認した。

② 大動脈血管からの Total RNA を用いた Gene Chip による網羅的発現解析

次に、血管内皮細胞での PAI-1 を介するシグナル伝達系に関して不明であるため、PAI-1 分子のシグナルの下流にある遺伝子発現制御について DNA マイクロアレイで網羅的に解析するアプローチをとった。老齢マウスは野生型、ノックアウト共に 1 年 3 ヶ月齢のものから、また若齢マウスは 8 週齢のものから Aorta の RNA 抽出を行い、Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて解析を行った。

野生型では、老齢マウスは若齢マウスに比べ、PAI-1 を始めとし、MnSOD、Hsp 等が増加し、GST、Troponin 等が減少していた。また老齢 PAI-1 KO マウスでは、老齢野生型マウスで発現増加していたものが低下するパターンが見られた。また、細胞骨格関連遺伝子、細胞外基質関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子などが減少していた。PAI-1 が直接阻害するプラスミノーゲン活性化因子 (PA) は PAI-1 KO により、血管内皮細胞で発現している組織型 PA (tPA) は 0.5 倍以下に減少し、ウロキナーゼ型 PA (uPA) は逆に 2 倍以上増加していた。現在、これらの発現を

定量的 PCR によって確認すると共に、その生物学的意義を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ①. Yashiro, K., Matsumoto, Y., Ihara, H., et al. Involvement of platelet activation via P2Y12 receptor in the development of transplant arteriosclerosis in mice. *Transplantation* **87**, 60-667, 2009
- ②. Suzuki, Y., Mogami, H., Ihara, H., and Urano, T. Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Blood* **113**, 470-478, 2009
- ③. 井原 勇人 機能性食品成分によるメタボリック症候群発症に関わるアディポカイン遺伝子発現抑制機構の解析 - 赤ワインに含まれるレスベラトロールの効果を中心として - 月刊 **フードリサーチ** (特集号: メタボ対策とアンチエイジング) **645**, 22-25, 2009
- ④. 井原 勇人 脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポカイン遺伝子発現制御 **比較生理生化学** **26**, 47-57, 2009
- ⑤. Koizumi, S., Gu, C., Amano, S., Yamamoto, S., Ihara, H. et.al. Migration of mouse-induced pluripotent stem cells to glioma-conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors. *ONCOLOGY LETTERS* **2**, 283-288, 2011

[学会発表] (計 2 件)

- ① 井原 勇人 機能性食品成分によるメタボリック症候群発症に関わるアディポカイン遺伝子発現抑制機構の解析 - 赤ワインに含まれるレスベラトロールの効果を中心として - 日本技術士会 食品技術士センター講演 東京 9. 20. 2008
- ② 井原 勇人 赤ワインに含まれるレスベラトロールの抗肥満・抗老化効果 日本技術士会 食品技術士中部協議会講演 名古屋 3. 27. 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)
なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 勇人 (IHARA HAYATO)
浜松医科大学・医学部 助教
研究者番号: 00223298

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

山本 清二 (YMAMOTO SEIJI)
浜松医科大学・光量子医学研究センター
准教授
研究者番号: 60144094