

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590821

研究課題名（和文） バゾヒビンによる血管恒常性維持の解明と動脈硬化抑制への応用

研究課題名（英文） Homeostasis of vascular vessels and prevention of atherosclerosis by vasohibin-1

研究代表者：

宮下 浩輝(MIYASHITA HIROKI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：80302222

研究成果の概要（和文）：

Vasohibin-1 (VASH1)は血管新生刺激に反応して血管内皮細胞が自ら産生・分泌し、さらに自らに作用して血管新生を抑制する極めてユニークな分泌タンパクである。今回、筆者らはこの研究を行い、以下の事を明らかにした。VASH1 の発現は血管内皮細胞において HuR による post-transcriptional な調節下にあり、Reactive Oxygen Species (ROS)の除去に働く Superoxide Dismutase 2 (SOD2) や、抗老化・抗ストレス に働く SIRT1 の活性を高めることが分かった。in vivo においては VASH1 ヘテロマウスは野生型マウスに比べ paraquat (ROS を発生し組織を障害する)による 肺障害が強く現れ、死にやすい傾向にあった。さらに VASH1 ヘテロマウスに VASH1 adenovirus を感染させて VASH1 の発現を増加させてやると control adenovirus を感染させたマウスと比較して paraquat による肺障害が弱く死にくくなり、VASH1 によりレスキューされることが明らかになった。要約として VASH1 が血管新生抑制作用の他に、血管内皮細胞に対して SOD2 と SIRT1 を介して抗老化・抗細胞死作用を有し、さらには内皮細胞の恒常性維持にも非常に重要な分子であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Vasohibin-1 (VASH1) is isolated as an endothelial cell (EC)-produced angiogenesis inhibitor. We questioned whether VASH1 plays any role besides angiogenesis inhibition, knocked-down or overexpressed VASH1 in ECs, and examined the changes of EC property. Knock-down of VASH1 induced premature senescence of ECs, and those ECs were easily killed by cellular stresses. In contrast, overexpression of VASH1 made ECs resistant to premature senescence and cell death caused by cellular stresses. The synthesis of VASH1 was regulated by HuR-mediated post-transcriptional regulation. We sought to define the underlying mechanism. VASH1 increased the expression of (superoxide dismutase 2) SOD2, an enzyme known to quench reactive oxygen species (ROS). Simultaneously, VASH1 augmented the synthesis of sirtuin 1 (SIRT1), an anti-aging protein, which improved stress tolerance.

Paraquat generates ROS and causes organ damage when administered *in vivo*. More *VASH1* (+/-) mice died due to acute lung injury caused by paraquat. Intratracheal administration of an adenovirus vector encoding human *VASH1* augmented *SOD2* and *SIRT1* expression in the lungs and prevented acute lung injury caused by paraquat. Thus, *VASH1* is a critical factor that improves the stress tolerance of ECs via the induction of *SOD2* and *SIRT1*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：(1)バソヒビン (2) 血管新生抑制因子 (3) 細胞の老化 (4) 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

vasohibin-1 は当初、血管新生因子 *VEGF*・*FGF2* などの血管新生刺激によって、血管内皮細胞によって発現が誘導されるにもかかわらず、*in vitro* では内皮細胞の増殖・遊走・管空形成などの一連の血管新生過程を抑制し、*in vivo* では CAM アッセイや角膜アッセイ等で血管新生を抑制した。このように *vasohibin-1* は *VEGF* などの血管新生刺激に反応して血管内皮細胞が自ら産生・分泌するにもかかわらず自らに作用して血管新生を抑制する極めてユニークな分泌タンパクである。そしてこのことを我々世界で初めて報告してきた。しかし *vasohibin-1* にはこれ以外の働きもあるのではないかと推測し今回の実験を行った。

2. 研究の目的

日本人の死因の上位を占める虚血性心疾

患と脳血管疾患の主な原因は動脈硬化である。動脈硬化の主因に血管内皮細胞の老化と細胞死があり、それらを抑制することがこれらの疾患の防止につながると考えられる。本研究の目的は血管内皮細胞において *vasohibin-1* が抗老化・細胞死作用を有しているかということと、もしそうならばそのメカニズムの解明と実際に *vasohibin-1* が動脈硬化を抑制できるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

血管内皮細胞 *HUVEC* において *siRNA* を用いて *vasohibin-1* の発現を低下させたり、*vasohibin-1* 発現アデノウイルスベクターで *vasohibin-1* の発現を増加させたりして、細胞の形態的変化を観察する。もし老化や細胞死が起きた場合 *SA-beta-galactosidase* 染色やアポ

ト-シスに関するアッセイを行う。さらにそれらを引き起こす vasohibin-1 の下流の標的遺伝子を同定する。in vivo では vasohibin-1 ノックアウトマウスを使用し活性酸素を発生させる劇物であるパラコートを投与しそれに対する耐性を野生マウスと比較検討する。さらに vasohibin-1 ノックアウトマウスに高脂肪食を与えて胸・腹部大動脈の動脈硬化巣を数え動脈硬化になりやすさを野生マウスと比較検討する。

4. 研究成果

in vitro では vasohibin-1 の発現低下により内皮細胞は老化し、過酸化水素水や血清飢餓などの種々のストレスに弱くなる。逆に vasohibin-1 の発現を増加させると種々のストレスに対して抵抗性を示すようになる。in vivo では vasohibin-1 ノックアウトマウスではパラコートを投与する野生マウスと比較し死にやすくなり、vasohibin-1 ノックアウトマウスに vasohibin-1 発現アデノウイルスベクターを投与し vasohibin-1 の発現を増加させるとコントロールに比べ死ににくくなった。これらのメカニズムとして Vasohibin-1 が血管内皮細胞に対して HuR による post-transcriptional な調節下に vasohibin-1 の活性を高め、その標的遺伝子である SOD2 と SIRT1 を介して抗老化・抗細胞死的に働き内皮細胞に恒常性維持に働き動脈硬化を抑制できることが示唆された。vasohibin-1 ノックアウトマウスに高脂肪食を与えて胸・腹部大動脈の動脈硬化巣を数え動脈硬化になりやすさを野生マウスと比較検討する実験は現在進行中である。

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 2 件)

1. Miyashita H, Suzuki H, Ohkuchi A, Sato Y. Mutual Balance between Vasohibin-1 and Soluble VEGFR-1 in Endothelial Cells. *Pharmaceuticals* 4, 1551-1577, 2011
2. Miyashita H, Watanabe T, Hayashi H, Suzuki Y, Nakamura T, Ito S, Ono M, Hoshikawa Y, Okada Y, Kondo T, Sato Y. angiogenesis inhibitor vasohibin-1 enhances stress resistance of endothelial cells via induction of SOD2 and SIRT1. *PLoS One* 7, e46459, 2012.

[学会発表] (計 1 件)

宮下浩輝、佐藤靖史 内皮ストレス耐性における splicing variant vasohibin-1 の意義
第 18 回日本血管生物医学会学術集会 2010 年 12 月 1 日 大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 浩輝 (MIYASHITA HIROKI)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号：80302222

(2) 研究分担者

佐藤 靖史 (SATO YASUFUMI)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：50178779

(3) 連携研究者

()

研究者番号：