

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591089

研究課題名(和文)新規昇圧物質カップリングファクター6の血管傷害性に対する制御機構の確立

研究課題名(英文) Establishment of regulatory system against coupling factor 6-induced vascular damage

研究代表者

長内 智宏 (Osanai, Tomohiro)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00169278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：HEK293細胞にhuman mature並びにimmature IF1 plasmidをtransfectionしcell lysateと培養上清にmature IF1 (12kD) が分泌・発現亢進することを確認した。Human mature並びにimmature IF1 過剰発現HEK293細胞では、CF6による培養上清中のATP減少が軽減された。また、CF6によるHEK-293細胞のapoptosis促進作用はhuman mature 並びにimmature IF1 の過剰発現により消失した。IF1はCF6の細胞外作用を阻害する内因性ペプチドである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Coupling factor 6 (CF6) converts the rotation of ecto-F1Fo complex, plasma membrane bound ATP synthase, from a clockwise mode of proton export (ATP synthesis) to a counter-clockwise mode of proton import (ATP hydrolysis), thereby leading to intracellular acidosis. Inhibitory peptide 1 (IF1) is a unidirectional inhibitor of ATP hydrolysis only, suggesting its possible antagonizing effect on CF6 without affecting ATP synthesis. In both human mature and immature IF1-transfected HEK 293 cells, IF1 protein was overexpressed in the cytosol fraction, and also was detected in the exosome fraction. ATP concentration in the culture media was decreased by CF6, but IF1 protein abolished its effect. The percentage of apoptotic cells was increased by CF6, but it was blocked by the transfection with mature or immature IF1. Overall, these suggest that IF1 may function as an endogenous inhibitor for CF6.

研究分野：循環器内科

キーワード：coupling factor 6 IF1 ATP synthase acidosis HEK293

1. 研究開始当初の背景

プロスタサイクリンは強力な血管拡張作用と血小板凝集抑制作用を有する生理活性物質である。高血圧自然発症ラット(SHR)ではプロスタサイクリンの内因性産生は低下している。しかし、血液を除去した摘出標本(血管、臓器)での産生は著明に亢進している。この矛盾は SHR においてプロスタサイクリン産生を抑制する内因性物質が流血中に存在するという仮説によって説明可能と考えた。近年我々は coupling factor 6 (CF6) がプロスタサイクリンの産生を阻害する内因性ペプチドであることを発見した(*J Biol Chem* 1998)。CF6 は phospholipase A2 を阻害することによりプロスタサイクリン産生を阻害し、COX とプロスタサイクリン合成酵素には影響しない(*J Biol Chem* 1998)。CF6 は血管内皮細胞の表面に存在し、その分泌はズリ応力により亢進する (*Circulation*, 2001)。また、ラットに recombinant CF6 を静注すると、昇圧活性を有し、その昇圧反応は SHR が WKY に比較して亢進している(*J Clin Invest*, 2001)。さらに、血中 CF6 濃度は SHR で高値を呈し、中和抗体の投与により降圧が認められ、その反応は WKY に比較して亢進している(*J Clin Invest*, 2001)。CF6 はヒト血中にも存在し、本態性高血圧症患者において高値を示すこと、また、血中 CF6 濃度は食塩負荷により増加し、アスコルビン酸投与によりその増加反応は消失することを報告した(*J Hypertens* 2003)。さらに、血液透析患者では血中 CF6 濃度は高値を示し、内因性 nitric oxide synthase (NOS) 阻害物質である asymmetric dimethylarginine (ADMA) と正相関すること、虚血性心疾患の発症と密接な関係を有することを明らかにした(*Kidney Int*, 2003)。脳卒中患者でも CF6 濃度は上昇し、血中ホモシステイン濃度と正相関することも最近報告した(*Ann Med*, 2010)。

CF6 の産生に関する基礎的検討では、tumor necrosis factor- α とズリ応力により CF6 mRNA 発現と分泌は亢進し、その反応は NF-kB の dominant negative により阻害される(*Cardiovas Res*, 2004 and 2005)。CF6 のプロモーター解析では、ラット CF6 プロモーター領域に 1ヶ所の NF-kB 結合部位が存在し、NF-kB 結合部位の deletion 並びに double mutation により、ズリ応力によるルシフェラーゼ活性の亢進は完全に阻害されることを報告した(*Cardiovas Res*, 2005)。

CF6 の細胞内情報伝達機構に関しては、最近その受容体が血管内皮細胞表面に存在する ATP 合成酵素の β -subunit であることを明らかにした(*Hypertension*, 2005)。受容体に結合した CF6 は ATPase 活性を亢進させ、Fo 分

子モーターを介して水素イオンを細胞内に流入させ、それに伴って細胞内酸性化を引き起こす。Efrapeptin により ATPase を阻害すると、CF6 による細胞内酸性化は抑制され、CF6 によるプロスタサイクリン産生の抑制作用が消失する(*Hypertension*, 2005)。

CF6 の生理作用に関しては、血管内皮細胞の NO 産生と内皮依存性過分極因子(EDHF)産生も抑制することが明らかとなった(*J Hypertens*, 2006)。血管内皮細胞に CF6 を投与し、cDNA microarray で増減する遺伝子を検討すると、内因性 NOS 阻害物質 ADMA の産生酵素(PRMT-1)の亢進並びに分解酵素(DDAH-2)の低下が認められ、ADMA の分泌亢進も証明された。また、動脈硬化の促進因子であるエストロゲン受容体、ウロキナーゼ受容体の発現亢進、並びに心不全関連ペプチドである relaxin、neuregulin の発現亢進も認められた (*J Hypertens*, 2006)。ラット冠細小動脈の収縮実験では、NO とプロスタサイクリンを阻害しても、CF6 は強力な収縮を惹起させ、epoxyeicosatrienoic acid (EET)を初めとした EDHF の産生を阻害して、血管収縮をきたすことが明らかとなった(*AHA*, 2005)。CF6 過剰発現マウスを用いたフェノタイプの検討では、腸間膜動脈の angiotensin II に対する収縮性の亢進 (*Cardiovas Res*, 2009)、血管内皮のプロスタサイクリン、NO 産生の抑制 (*Atherosclerosis*, 2008)、食塩感受性高血圧ならびに糖尿病の発症 (*Diabetologia*, in press)、圧負荷に対する病的左室肥大の亢進、運動負荷による生理的左室肥大の抑制 (*AHA*, 2010) が明らかとなった。

CF6 の受容体である ATP 合成酵素は 2つの分子モーター、すなわち F1 分子モーター(ATP を駆動力に反時計回転)と Fo 分子モーター(プロトン駆動力に時計回転)から構成され、力の強い分子モーターが他の分子モーターを本来とは逆方向に回転させる性質を有する。ミトコンドリアでは Fo 分子モーターが F1 分子モーターを逆回転させることにより ATP を産生する。一方、細胞表面では CF6 が F1 分子モーター(ATPase 活性)を活性化し Fo 分子モーターを逆回転させることにより細胞内酸性化(水素イオンを細胞内に流入)を引き起こす。CF6 受容体である F1 分子モーターを種々の F1 阻害剤(efrapeptine 等)で処理した場合、ミトコンドリアの F1 モーターも阻害され ATP 産生が低下する可能性がある。そのため、創薬への活用は不適切であった。

最近、F1 分子モーターの阻害物質として inhibitory protein IF1 が同定された。IF1 は F1 分子モーターの反時計回転(ATP 分解)を阻害し、時計回転(ATP 産生)は阻害しない性質を有する。従って、IF1 は CF6 の作用は阻

害するがミトコンドリアの ATP 合成には全く影響を与えず、CF6 の特異的阻害物質として作用する可能性が極めて大きい。

2. 研究の目的

IF1 の抗 CF6 作用の有無について正常培養細胞と IF1 過剰発現細胞を用いて検討する。

まず、本研究で明らかにする第 1 点目は、HEK293 細胞を IF1 で処理後 CF6 を投与し、CF6 の細胞内情報伝達機構に及ぼす影響に関して、ATPase 活性測定、並びに細胞内 pH の indicator である BCECF を用いた細胞内 pH 測定を行い検討する。

本研究で明らかにする第 2 点目は、IF1 の ATP 産生に及ぼす影響を明らかにする。HEK293 細胞を IF1 で前処理後 CF6 を投与し、ATP 産生を化学発光法を用いて定量する。また、細胞内 ATP 分解活性を ADP を指標とした比色法で測定する。

本研究で明らかにする第 3 点目は、IF1 過剰発現細胞に CF6 を持続投与し、フェノタイプに及ぼす影響を観察する。特に CF6 による apoptosis 促進作用に及ぼす影響を観察する。この研究は、創薬に向けた基礎研究として特に重要である。

CF6 作用の封じ込めとして、細胞内酸性化のみを阻害して ATP 産生には影響を及ぼさないことが期待される IF1 の有用性の検討は、創薬を考えた上で極めて重要である。特に CF6 のフェノタイプに及ぼす IF1 の影響を観察することは、心血管系における病態生理学的意義の解明並びに創薬の基礎につながる。また、IF1 投与による CF6 の細胞内情報伝達機構への影響の解明は、心疾患を初めとした循環器疾患の形成に CF6 がどのように関与するかを明らかにできる点で学術的な特色がある。IF1 の作用の解明はヒト循環器疾患において CF6 の阻害により病態の改善がもたらされる可能性を示すものであり、CF6 の阻害剤の開発を介して心疾患患者に恩恵をもたらす可能性がある。

3. 研究の方法

IF1 の細胞内情報伝達機構に及ぼす影響

1. Human mature, immature IF1 plasmid の作製: Open Biosystems 社の MHS1010-73732 大腸菌を抗生物質入り LB 培養液で培養し、Promega PureYield Plasmid Midiprep System (Code No. A2495)を用いて human immature IF1 plasmid を精製した。さらに、human immature IF1 plasmid から制限酵素で mature human IF1 (26-106, 81aa)に相当する部分 (169-411) を切り出し human mature IF1 plasmid を精製する。

2. HEK-293 細胞 human mature 並びに immature IF1 を過剰発現させ、CF6 の細胞内情報伝達機構に及ぼす影響を以下の項目について検討する。

a. ATP 合成酵素は酸化リン酸化により ATP を産生する。細胞表面の ATP 合成酵素が CF6 の受容体の場合、CF6 投与により ATP 並びに ADP 産生が影響を受ける。HEK-293 細胞に CF6 を投与し、培養上清中の ATP 量は化学発光法により、ADP 量は pyruvate kinase-lactate dehydrogenase 反応により比色法で測定する。

b. ATP 合成酵素は酸化リン酸化により ATP を産生するので、水素イオンの移動により細胞内 pH が変化する。細胞内 pH の indicator である BCECF を HUVEC 内に load し、CF6 投与による細胞内 pH の変化を蛍光装置を用いて明らかにする。

IF1 の細胞内 ATP 産生に及ぼす影響

ATP 合成酵素は F1 分子モーター (ATP を駆動力に反時計回転) と Fo 分子モーター (プロトン駆動力に時計回転) から構成され、ミトコンドリアでは Fo 分子モーターが F1 分子モーターを逆回転させることにより ATP を産生する。通常の F1 阻害物質は ATP 産生ならびに分解の両方を抑制するが、IF1 は F1 分子モーターの反時計回転 (ATP 分解) を阻害し、時計回転 (ATP 産生) は阻害しない性質を有する。IF1 が細胞内 ATP 産生を抑制しないことを以下の方法で確認する。

a. HEK-293 細胞に human mature 並びに immature IF1 を過剰発現させ、細胞内 ATP 産生に及ぼす影響を検討する。

b. 未処理の HUVEC と IF1 発現を増減させた HUVEC から細胞質を抽出し、ATP 含量は化学発光法により、ADP 含量は pyruvate kinase-lactate dehydrogenase 反応により比色法で測定する。また、CF6 投与による ATP、ADP 含量も測定する。

CF6 によるフェノタイプに及ぼす IF1 過剰発現の影響

HEK-293 細胞に immature (full length, 106aa) IF1 または mature IF1 (81aa) を transfection し、24 時間後に CF6 $10^{-7}M$ を添加し、さらに 24 時間後に apoptosis 陽性細胞の割合を annexin V-FITC/propidium iodide assay kit を用いて測定する。

4. 研究成果

1. Human mature 並びに immature IF1 plasmid の作製と細胞外分泌の確認

Open Biosystems 社の MHS1010-73732 大腸菌を抗生物質入り LB 培養液で培養し、

Promega PureYield Plasmid Midiprep System (Code No. A2495)を用いて human immature IF1 plasmid を精製した。さらに、human immature IF1 plasmid から制限酵素で mature human IF1 (26-106, 81aa)に相当する部分 (169-411) を切り出し human mature IF1 plasmid を精製した。HEK293 細胞に Opti-MEMI Reduced Serum Medium と TransIT-293 Reagent を用いて 各々の plasmid を transfection し、24 並びに 48 時間後に、cell lysate 中と培養上清中に anti-ATPase IF1 antibody (ab110277)を用いて Western blot 法で 12kD のバンドを確認した。

2. IF1 ペプチドの精製

上記で作成した human immature IF1 plasmid から制限酵素で mature human IF1 (26-106, 81aa)に相当する部分 (169-411) を切り出し pGEX-4T-3 Vector に挿入した。E. coli BL21 (DE3)を用いて培養後、細菌ペレットを lysis buffere で溶解し Glutathion sepharose 4B カラムを通過させた。吸着物を thrombin で分解後 HiTrap streptavidin HR column で thrombin を除去し、human mature IF1 を精製した。

3. IF1 過剰発現の CF6 作用に及ぼす影響

a. ATP 消費 : HEK293 細胞に CF6 $10^{-7}M$ 投与 5 時間後では培養上清中の ATP は CF6 無添加に比して有意に定値であった。human mature 並びに immature IF1 過剰発現細胞では CF6 $10^{-7}M$ 投与後 5 時間でも培養上清中の ATP 量は減少しなかった

b. apoptosis 作用 : HEK-293 細胞に CF6 $10^{-7}M$ を添加し、24 時間後に apoptosis 陽性細胞の割合を annexin V-FITC/propidium iodide assay kit を用いて測定した。CF6 添加により、HEK-293 細胞の apoptosis は 1.57 ± 0.20 倍 ($p < 0.05$) 増加した。

HEK-293 細胞に immature, mature IF1 を transfection し、24 時間後に CF6 $10^{-7}M$ を添加しさらに 24 時間後に apoptosis 陽性細胞の割合を annexin V-FITC/propidium iodide assay kit を用いて測定した。CF6 による apoptosis 細胞増加作用は消失した。

4. CF6 による apoptosis 促進機序

CF6 による apoptosis 誘発作用機序について血管内皮細胞を用いて検討した。Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) では chemokine CXCL12 (stromal cell-derived factor-1)-CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4) 系が細胞機能の維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。HUVEC に CF6 を添加し、CXCR4 の発現を RT-PCR、Western blot 法で測定した。

HUVEC における CXCR4 遺伝子並びに蛋白発現は CF6 投与により濃度依存性に抑制され、 $10^{-7}M$ で有意な抑制を認めた ($p < 0.05$)。また、CF6 $10^{-7}M$ 投与により、CXCR4 発現は時間依存性に抑制された (24 時間後、48 時間後ともに $p < 0.05$)。CF6 による CXCR4 の抑制は hypoxia inducible factor (HIF)- 1α siRNA 並びに cSrc 阻害薬 PP1 の前投与により完全に消失した。CF6 投与によりアポトーシス細胞の割合は、正常酸素において $4.3 \pm 0.7\%$ から $5.6 \pm 1.7\%$ へ増加した ($p < 0.05$)。また、低酸素状態でも $5.3 \pm 1.8\%$ から $7.0 \pm 1.3\%$ へ増加し ($p < 0.05$)。それらの増加は HIF- 1α siRNA または CXCR4 ligand の添加により抑制された。

結論

IF1 は CF6 の apoptosis 作用に拮抗することが明らかとなった。また、このペプチドは細胞内 ATP 産生に悪影響を与えないことが確認された。従って、IF1 は CF6 の細胞外作用を阻害する内因性ペプチドであり、創薬の対象になりうるということが考えられた。

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 8 件)

以下、全て査読あり

Osanai T, Tanaka M, Magota K, Tomita H, Okumura K. Coupling factor 6-induced activation of ecto-F1F0 complex induces insulin resistance, mild glucose intolerance and elevated blood pressure in mice. Diabetologia. 2012;55:520-529.

Yamamoto Y, Osanai T, Nishizaki F, Sukekawa T, Izumiyama K, Sagara S, Okumura K. Matrix metalloprotein-9 activation under cell-to-cell interaction between endothelial cells and monocytes: possible role of hypoxia and tumor necrosis factor- α . Heart Vessels. 2012;27:624-633.

Izumiyama K, Osanai T, Sagara S, Yamamoto Y, Itoh T, Sukekawa T, Nishizaki F, Magota K, Okumura K. Estrogen attenuates coupling factor 6-induced salt-sensitive hypertension and cardiac systolic dysfunction in mice. Hypertens Res. 2012;35:539-546.

Shibutani S, Osanai T, Ashitate T, Sagara S, Izumiyama K, Yamamoto Y, Hanada K, Echizen T, Tomita H, Fujita T, Miwa T, Matsubara H, Homma Y, Okumura K. Coronary Vasospasm Induced in Transgenic

Mouse with the Increased Phospholipase C- δ 1 Activity. Circulation 2012;125:1027-1036.

Sagara S, Osanai T, Itoh T, Izumiyama K, Shibutani S, Hanada K, Yokoyama H, Yamamoto Y, Yokota T, Tomita H, Magota K, Okumura K. Overexpression of coupling factor 6 attenuates exercise-induced physiological cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K/Akt signaling in mice. J Hypertens 2012;30:778-786.

Sukekawa T, Osanai T, Nishizaki F, Metoki N, Hagii J, Kamada T, Yasujima M, Tomita H, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 enhances the spontaneous microaggregation of platelets by decreasing cytosolic cAMP irrespective of antiplatelet therapy. Hypertens Res 2013;36:520-527.

Suzuki A, Osanai T, Tanaka M, Tomita H, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 attenuates CXCR4 expression through the HIF-1 α and c-Src pathways and promotes endothelial apoptosis and inflammation. Hypertens Res. 2014;37:708-715.

Suzuki A, Osanai T, Tanaka M, Endo T, Murakami K, Tomita H, Okumura K. Effect of coupling factor 6 on chemokine receptors in vascular endothelial cells. Hirosaki Med J 2014;65:119-127.

〔学会発表〕(計 7 件)

Osanai T, Okumura K: Coupling factor 6 affects lifespan by reduced autophagy irrespectively of blood pressure. Scientific Sessions 2012 (American Heart Association), Los Angeles (USA), November 3-7, 2012.

長内智宏、泉山圭、祐川誉徳、奥村謙 : Coupling factor 6 は細胞内酸性化を介して Autophagy を障害し細胞老化と Lifespan の短縮を惹起する。第 35 回日本高血圧学会総会 平成 24 年 9 月 20 - 22 日、名古屋

Osanai T, Okumura K: Coupling factor 6 accelerates aging and shortens lifespan through reduced autophagy by proton-mediated histone acetylation. Scientific Sessions 2013 (American Heart Association), Dallas (USA), November 16-20, 2013.

Osanai T, Okumura K: Coupling factor 6 promotes endothelial apoptosis and inflammation by attenuating CXCR4 expression through HIF-1 α and cSrc pathways. Scientific Sessions 2013 (American Heart Association), Dallas

(USA), November 16-20, 2013.

長内智宏、泉山圭、富田泰史、奥村謙 : Coupling factor 6 の proton を介した histone 4 acetylation は個体老化を促進させ lifespan を短縮する。第 36 回日本高血圧学会総会 平成 25 年 10 月 24 - 26 日、大阪

Osanai T, Okumura K: Chronic nuclear acidosis defines aging and lifespan by histone 4 lysine 5 acetylation in mice. Scientific Sessions 2014 (American Heart Association), Chicago (USA), November 15-19, 2014

長内智宏、泉山圭、山田雅大、樋熊拓未、富田泰史、奥村謙 : Coupling factor 6 は核内酸性化による核膜ラミナ構造異常を介して老化・寿命を規定する。第 37 回日本高血圧学会総会、平成 26 年 10 月 17-19 日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特記すべきことなし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長内 智宏 (OSANAI TOMOHIRO)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 00169278

(2) 研究分担者

奥村 謙 (OKUMURA KEN)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 20185549

(3) 連携研究者

なし