

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659580

研究課題名(和文) 静脈内皮細胞機能のエピゲノム調節における長寿遺伝子の役割

研究課題名(英文) Endothelial cell senescence in venous system and epigenetics

研究代表者

東 信良 (Azuma, Nobuyoshi)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30250559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：静脈内皮細胞老化は、高齢者の深部静脈血栓症や、老化静脈を用いたバイパスのグラフト不全に直結する問題である。

本研究では、静脈内皮老化のマーカーを探索し、その分子的制御を検討した。ラットにおいて、PAI-1は高齢ラットで発現が亢進しており、糖尿病ラットでより高い傾向にあり、さらに、長寿遺伝子との関連が指摘されているマイクロRNA132および34aが有意に高齢ラットで発現増加しており、老化マーカーとなりうると考えられた。現在、血管病患者の静脈材料におけるPAI-1, miR132, miR34a発現について検証中であり、年齢や生活習慣病の種類や期間にどのように影響されるのか研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：The senescence of vascular endothelial cells (ECs) should be related to most of vascular diseases. The endothelial senescence of venous ECs may be directly related to deep venous thrombosis and other vein disease including vein graft failure.

The purpose of this study was to explore the molecular markers indicating EC senescence of venous system in rat and patients underwent vein grafting. In rat femoral veins, mRNA of plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) was remarkably expressed in aged rats, especially diabetic model rats, compared to young age non-diabetic rats. The microRNA 132(miR132) and miR34a, which are known to regulate sirtuin-1, were also markedly expressed in aged rats ($p<0.01$) especially in aged diabetic rats. Thus, PAI-1 as well as miR132 and miR34a can be candidate as venous endothelial senescence. Currently, these candidates are tested in vein materials in patients underwent vein graft bypass surgery.

研究分野：血管外科

キーワード：静脈内皮細胞 内皮細胞老化 長寿遺伝子 内膜肥厚 静脈血栓症 PAI-1 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 静脈の内皮細胞機能制御について

動脈の内皮細胞老化については、動脈硬化症の発症・進展に極めて重要であり莫大な研究データが蓄積されている一方、静脈における内皮機能や内皮細胞の老化についての研究は動脈ほど進んでいない。静脈内皮機能は、静脈血栓症の発症に大いに関係していることが推測され、また、その静脈を動脈系に移植するバイパス手術においても、おそらく移植前の静脈内皮機能は重要であると考えられる。

(2) 内皮機能における長寿遺伝子の役割

「ヒトは血管から老いる」と言われるように、高齢化社会における血管病において、内皮細胞の老化は、社会にとっても重大な問題であり、高齢者の血管病、静脈血栓症、あるいは、静脈グラフトの不具合などを低減するひとつのアプローチとして、内皮機能を若く保つという考え方が成り立つ。そのアプローチが成立するためには、内皮機能の調節をつかさどる分子機構の理解が不可欠である。Sirtuin-1(SIRT1)は長寿遺伝子とも言われ、その脱アセチル化酵素活性から、ヒストンのアセチル化防止により DNA の露出を防いで、テロメアーゼ等から DNA を守るといったエピゲノム調節機構によって長寿へ貢献していると報告されてきた。さらに、SIRT1 は内皮細胞機能の要である eNOS の転写に抑制的に働く調節因子 p66shc というアダプター蛋白の発現を epigenetic に抑制するという報告がなされ、¹⁻³⁾ まさに「血管から老いる」のを長寿遺伝子が防いでいることが、本研究開始当時明らかになりつつある状況であった。

(3) 教室における内皮細胞研究の背景

静脈グラフトによる動脈バイパス手術や透析用ブラッドアクセス造設において、動脈血流環境におかれた静脈の内膜肥厚 (IH) は、時にバイパスグラフトや透析用ブラッドアクセスを閉塞に導く問題であり、IH の解決に向けて世界中で長年研究されてきたが、いまだに解決できていない。⁴⁾ 教室では、動脈環境への移植後の静脈内皮の脱落と再内皮細胞化や、⁵⁾ 静脈グラフト IH における炎症性サイトカインの関与とその転写因子 NFkB の遺伝子導入の有効性などを研究してきたとともに、⁶⁾ 内皮機能における血流の重要性和その細胞内情報伝達についても研究してきた。^{7,8)} その結果、糖尿病や腎不全といった背景に加えて、内皮の虚血や炎症、あるいは血流低下が移植前の静脈の内皮機能障害を引き起こし、そうした質的不良静脈を移植することが IH 発生の主因ではないかという臨床的推論に至った。糖尿病や腎不全における酸化ストレスや炎症、虚血は、細胞のヒストン修飾変化を引き起こし、その結果、効率良い IH 関連遺伝子発現が可能となり、やがて

IH などの病態の発生・進行につながるという仮説を立て、下記の実験を行うこととなった。

2. 研究の目的

(1) 静脈内皮の老化の証明とその分子マーカーの探索：静脈内皮細胞の老化によって、静脈血栓症が惹起されたり、老化静脈を用いたバイパスグラフトの開存成績が不良であるといった背景を明らかにするためには、まず、①高齢動物を用いて、静脈内皮老化のマーカーとなる分子候補を探索するとともに、②その分子マーカーが患者検体でも有用なマーカーとして使用可能なものかを明らかにする必要がある。

(2) 静脈内皮老化のメカニズムにおける SIRT1 の役割とそのエピゲノム調節機序の解明：上記 (1) で候補に上がった静脈内皮老化分子マーカーと長寿遺伝子 SIRT1 との関連、分子マーカーの発現調節に SIRT1 が関与しているのかどうか、加えて、その調節機構はエピゲノム調節を含め、どのようなものであるのかの解明の糸口を探索することを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) マウスにおける静脈内皮老化

高齢マウス(48~56週齢 C57BL/6マウス)および高齢糖尿病発症マウス(48~56週齢 ob/obマウス)の大腿静脈を採取し、下記①、②、③について両者を比較した。①ホルマリン固定標本による形態学的所見、②発現 mRNA、③静脈片の等尺性内皮依存弛緩反応。

(2) ラットにおける静脈内皮老化の分子マーカーの探索

GK ラット (II 型糖尿病発症 Wister ラット) と Wister ラットの 2 系統を用いて、下記の i から iv の 4 群で、大腿静脈に発現している mRNA および microRNA を抽出した。

i) 若年 Wister ラット、ii) 若年 GK ラット、

iii) 老年 Wister ラット、iv) 老年 GK ラット
老年ラットは月齢 18 か月まで通常餌飼育したものをを用い、若年ラット (月齢 2 か月) と比較・検討した (n=4)。

mRNA は、GAPDH を internal control として、microRNA は total RNA 量をコントロールとして、RT-PCR を行い、4 群間での発現量を比較した。発現量比較の統計解析には、Turkey-Kramer 法などを用いた。

(3) ヒト静脈内皮の解析

①グラフト材料としての静脈標本の RNA 解析：倫理委員会許諾のもと、バイパスに用いる静脈組織を採取し、長期間の糖尿病や、維持透析をうけていて、長期間にわたって酸化ストレスや炎症性ストレスを受けている静脈の発現 RNA を解析した。症例を 3 群に分

け、静脈からの抽出 RNA のマイクロアレイを行って、高齢や長期ストレス暴露によって起こる静脈内皮老化に関わる分子の絞り込みを行う。対象群：i) 非糖尿・非透析症例、ii) 糖尿病、非透析症例、iii) 糖尿病、透析例以上 3 群で標本を採取し、できるだけ年齢の近い 3 症例を選び、RNA を抽出して、解析を行った。

②静脈グラフト狭窄発症例における RNA 解析：バイパスグラフト不全症例について、バイパスグラフト狭窄部とそれに隣接する非狭窄部、および、狭窄部置換に用いた静脈材料の 3 者の組織の一部を RNA 解析用に抽出して、発現 RNA を解析した。

4. 研究成果

(1) マウスにおける静脈内皮老化

マウスの大腿静脈を対象として、①光学顕微鏡レベルでの形態学的差異、②発現 RNA 抽出・解析、③血管リング標本による内皮弛緩反応などを試みた。しかし、マウスの静脈壁が非常に菲薄で、十分量の RNA 抽出が難しく、内皮弛緩反応も技術的に非常に難しく、また、光学顕微鏡レベルで、老年糖尿病マウスの血管壁構造に特に若年マウスや非糖尿病マウスと大きな差がなかった。そもそもマウスの寿命は特に糖尿病マウスで短く、糖尿病への暴露時間が十分かどうか、臨床で扱うような 20 年以上糖尿病に暴露されたり、透析を週 3 回受けるような血管病患者の血管壁に比べると、1 年に満たない期間の糖尿病暴露マウスの血管壁は実験動物としてあまり適切な選択ではなかったと考えられた。そのため、より長期間生存可能で組織量も十分に採取可能なラットを実験動物として、さらに、実際に莫大な強さの酸化ストレスを長年にわたって受け続けている血管病患者の静脈をそれぞれ研究材料とすることに変更し、下記の実験を実施した。

(2) ラットにおける静脈内皮老化のマーカ探索とその調節機構解析

①静脈内皮老化のマーカ候補の探索

高齢非糖尿病ラット (OA-NDM) および高齢糖尿病ラット (OA-DM) から採取した大腿静脈から抽出した mRNA および microRNA を、若年非糖尿病ラット (YA-NDM) や若年糖尿病ラット (YA-DM) のそれと比較検討した。内皮機能のマーカとして、NO 産生機能指標として eNOS, 血栓関連指標として PAI-1, 増殖因子産生指標として VEGF-A, FGF-2, 炎症性ストレス指標として MNP-1, IL-8 を調査した。それぞれの mRNA レベルは、GAPDH を internal control として標準化して表示した。

その結果、最も内皮機能と直結すると推測していた eNOS の mRNA レベルは、若年と老年という観点においても、糖尿病の有無でも有意差なく、少なくともこのモデルにおいて eNOS は内皮細胞の機能不全や各種ス

レスの指標として有用とは言えなかった (図 1)。これに対して、最も年齢と関係があると考えられたのは、PAI-1 の mRNA レベルであり、高齢で高発現の傾向にあり、内皮機能障害の指標として有用な可能性が示唆された (図 2)。ただし、検体間でのばらつきが大きく、統計学的有意差は得られなかった。各種増殖因子や炎症性ストレスについては、有意差をもって変化するものもなく、また、上記 PAI-1 の変動に類似する分子を認めなかった。

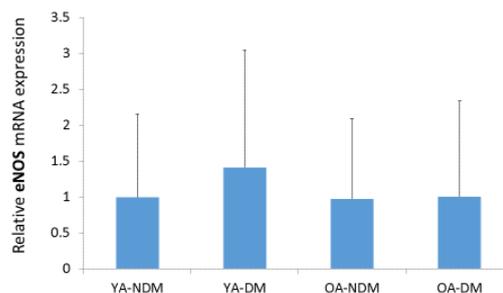


図1. 高齢および若年ラット大腿静脈におけるeNOS mRNA発現

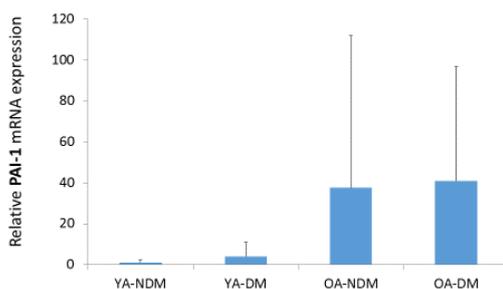


図2. 高齢および若年ラット大腿静脈におけるPAI-1 mRNA発現

② マーカ候補分子と長寿遺伝子 SIRT1 の関与

若年動物と老年動物において SIRT1 mRNA 発現量に統計学的有意差はなく、また、糖尿病と非糖尿病動物の間にも SIRT1 mRNA 発現量に統計学的有意差はなかった (図 3)。

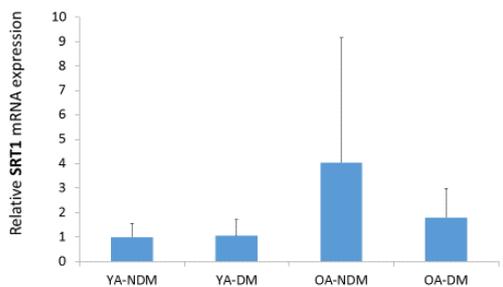


図3. 高齢および若年ラット大腿静脈におけるSIRT1 mRNA発現

ただ、有意差はないものの、老年動物で SIRT1 が高い傾向にあり、後述するいくつかの microRNA の中に SIRT1 と類似の変動パ

ターンを示すものが存在することから、何らかの関連性がある可能性が示唆された(図4)。

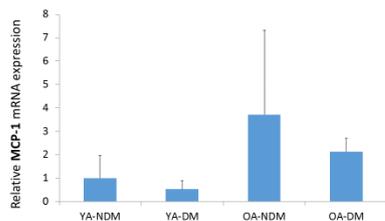


図4. 高齢および若年ラット大腿静脈におけるMCP-1 mRNA発現

③内皮細胞老化とマイクロRNA

近年、microRNAが内皮機能と深くかかわり、かつ、SIRT1の発現調節にも関与していることを示唆する報告が相次いだことから、⁹⁻¹¹⁾追加実験としてラット大腿静脈からのmicroRNA抽出を行って、YA-NDM群、YA-DM群、OA-NDM群、OA-DM群の4群間で発現量を比較検討した。

その結果、mi132では、高齢ラット静脈で発現量が有意に減少し(図5)、特に高齢糖尿病ラットで発現量低下が著しいことから、内皮細胞の老化の状態に一致した変動を示していることを示唆する結果が得られた($p < 0.01$)。mi34aについても、mi132とほぼ同様の傾向で動いており(図6)に糖尿病高齢ラット大腿静脈での発現が著しく減少していることが判明した($p < 0.01$)。なお、これらはSIRT1の月齢や糖尿病暴露による変動とは異なる変動をしていることから、SIRT1とは別のメカニズムで内皮細胞老化に関与している可能性が示唆された。

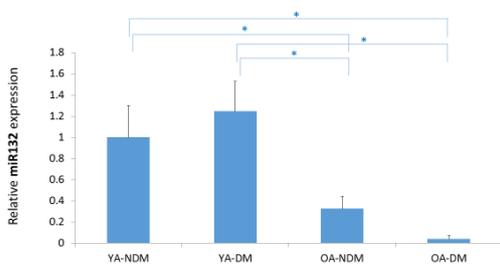


図5. 高齢および若年ラット大腿静脈におけるマイクロRNA132発現
* : $p < 0.01$

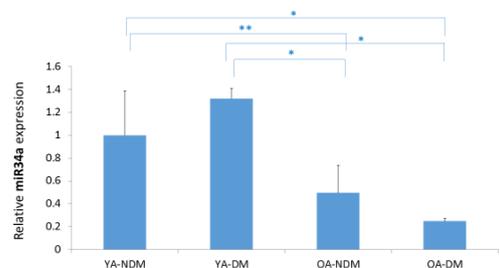


図6. 高齢および若年ラット大腿静脈におけるマイクロRNA34a発現
* : $p < 0.01$, ** : $p < 0.05$

(3) ヒト静脈内皮の解析

①グラフト材料としての静脈標本のRNA解析：我々は、バイパスグラフト狭窄発生の分

子生物学的機序を解明するため、実際に静脈グラフト狭窄を起こした静脈について、mRNAマイクロアレイを行って、mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 (MAPKAPK3) や four-and-half LIM domains 5 (FHL5) など、いくつかの内膜肥厚遺伝子の同定に成功している。その研究後、静脈グラフト狭窄発症例8例について、採取した内膜肥厚部位の静脈壁に、MAPKAPK3 や FHL5 が高率に発現していることが判明した(図7)。これらの遺伝子発現が、術後だけでなく、すでに術前から存在しているものなのかどうかを今後解析してゆく必要があると考え、下記の臨床研究を開始している。

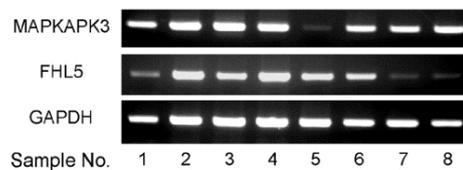


図7. 重症下肢虚血患者の静脈グラフト不全(狭窄)発生部位における内膜肥厚関連mRNA発現

②静脈グラフト狭窄発症例におけるRNA解析：

臨床現場でグラフト用に採取した静脈の残余片を倫理委員会の承認のもと、患者さんの同意を得て収集し、静脈壁に発現しているmRNAやmicroRNAを解析する臨床研究(UMIN000019121)を2015年1月から開始し、実際に非常に長期間(おおむね20年以上の患者が多い)にわたって糖尿病に罹患し、透析を受けたり、脂質異常を伴うような背景の異なる患者さんの下肢表在静脈検体を収集している。その検体のうち、非糖尿病非透析、非糖尿病透析、糖尿病非透析、糖尿病透析の組み合わせで、RNAを抽出し、mRNAおよびmicroRNAのマイクロアレイを行う予定であり、現在、症例を蓄積しつつ、質の良好なRNA抽出方法の確立を行っている。今後、継続して取り組み、血管病患者において、非常に長い期間にわたって、各種のストレスに暴露された静脈がどのような変化を生じ、その変化がどのように調節されているのかを明らかにしてゆくとともに、ラットで得られたようなPAI-1やmiR132, miR34aの発現状態を解析してゆく予定である。

(4) 結果に対する考察

①内皮細胞老化指標としてのPAI-1

本研究で最も重要な所見のひとつは、PAI-1が老化内皮細胞で上昇することであり、これまで動脈内皮でいわていた現象を静脈内皮でも同様の現象があることが示唆された点である。静脈内皮細胞のPAI-1上昇は、静脈

血栓症発症に直接関わる分子であることから、高齢者における深部静脈血栓症の予防につながる重要な成果であると考えられる。この研究が開始された2年後に、動脈内皮において PAI-1 は SIRT1 の epigenetic なコントロールを受けているという論文が中国から発表され、まさに本研究の題名そのものを先に証明されたことが明らかとなった。¹²⁾ その報告によると、SIRT1 は PAI-1 promoter 領域の DNA に結合し、その領域においてヒストン H4K16 のアセチル化を抑えて、PAI-1 の産生を抑制しているという。なお、本研究では、中国の報告と異なり、SIRT1 が PAI-1 と同様のトレンドを示していたことから、静脈内皮では中国からの動脈内皮と異なるメカニズムがあるのかも調べる必要があると考えられた。

② マイクロ RNA 解析結果とその意義

miR 132 と miR 34a について、SIRT1 と関連性が報告されていることに着目し、今回の解析対象に含めた。miR132 は増殖因子 (FGF や VEGF)、miR34a は炎症性ストレスに関連して上昇することが既に報告されており、⁹⁻¹¹⁾ そのため、basic FGF、VEGF-A などの増殖因子や、NFκB p65、MCP-1、IL-8 などの炎症性マーカーの mRNA 発現も調査したが、ラットにおける大腿静脈において、4 群間に有意な差異を認めなかった。

今回の実験系において、miR132 や miR34a の変化は、PAI-1 mRNA の発現とは逆に動いており、これらがどのように関係しているのか、非常に興味深い。今後、分子機序の解明が必要と考えている。さらに、これら miR132 や miR34a は、静脈内皮機能の指標として有用となる可能性が示唆され、さらなる精度向上をはかるべく研究を進める必要があると考えている。

③ 本研究成果の今後の発展性

生活習慣病によって血管内皮機能が低下して、動脈硬化症や静脈血栓症、あるいは静脈グラフト機能不全をきたす患者の多くは、糖尿病歴 20 年以上で高血圧症や脂質異常症、喫煙さらに腎不全などを併発している頻度が非常に高い。さらに、高齢化、あるいは、サルコペニアといった変化が血管病を複雑化している。即ち、各種の酸化ストレスや炎症性ストレスに年単位あるいは数十年単位に暴露されており、そうした血管では、本研究でおこなってきた比較的単純なモデルでは再現に限界があると考えられる。今後は、今回で得られたいくつか有望な内皮細胞老化のマーカー蛋白やマイクロ RNA が、実際に血管病の患者の静脈片でどのように発現しているのかを臨床例で測定し、解析していく必要があると考えている。その意味で、2015 年より、下肢動脈バイパス術を行う際に使用した静脈グラフトで、余剰片があった場合にその静脈片をあらかじめ患者さんに

同意を得て採取し、mRNA や miRNA を抽出・解析する前向き臨床研究 (UMIN000019121) を行っているところであり、その研究において、PAI-1 や SIRT1, miR132, miR34a などを解析しています。それらについて、今後学会や誌上で国際社会に発信していく予定である。

<引用文献>

- 1) Zhou S, Chen HZ, Wan YZ, et al. Repression of P66shc expression by SIRT1 contributes to the prevention of hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Cir Res* 2011;109:639-48.
- 2) Kumar A, Hoffman TA, Dericco J, et al. Transcriptional repression of Kruppel like factor-2 by the adaptor protein p66shc. *FASEB J* 2009;23:4344-52.
- 3) Kim CS, Kim YR, Naqvi A, et al. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc.
- 4) Wallitt EJ, Jevon M, and Hormick PI. Therapeutics of vein graft intimal hyperplasia: 100 years on. *Ann Thoracic Surg* 2007;84:317-23.
- 5) Ishikawa M, Sasajima T, and Kubo Y. Re-endothelialisation in autogenous vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996; 11; 105-11.
- 6) Shimizu N, Azuma N, Nishikawa T, et al. Effect on vein graft intimal hyperplasia of nuclear factor-κB decoy transfection using the second generation of HVJ vector. *J Cardiovasc Surg* 2007;48; 463-70.
- 7) Azuma N, Duzgun SA, Ikeda M, et al. Endothelial cell response to different mechanical forces. *J Vasc Surg.* 2000; 32;784-94.
- 8) Azuma N, Akasaka N, Kito H, et al. Role of p38 MAP kinase in endothelial cell alignment induced by fluid shear stress. *Am J Physiol* . 2001;280 ; H189-197.
- 9) Strum JC, Johnson JH, Ward J, et al. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of Sirt1. *Mol Endocrinol* 2009; 23; 1876-84.
- 10) Fan W, Fang R, Wu X, et al. Shear-sensitive microRNA-34a modulates flow-dependent regulation of endothelial inflammation. *J Cell Sci* 2015; 128;70-80.
- 11) Badi I, Burba I, Ruggeri C, et al. MicroRNA 34a induces vascular smooth muscle cells senescence by SIRT1 downregulation and promotes the expression of age-associated

pro-inflammatory secretory factors. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2015;70:1304-11.

- 12) Wan YZ, Gao P, Zhou S, et al. SIRT1-mediated epigenetic downregulation of plasminogen activator inhibitor-1 prevents vascular endothelial replicative senescence. Aging Cell 2014;13: 890-9.

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 1 件)

- ① Nakanishi K, Saito Y, Azuma N, Sasajima T. et al. Cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein activation by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 and four-and-a-half LIM domain 5 plays a key role for vein graft intimal hyperplasia. J Vasc Surg 2013;57: 7-14
DOI: 10.1016/j.jvs.2012.06.082.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 菊地 信介、東 信良、他、重症虚血肢に対する足関節動脈バイパスにおける静脈グラフト内膜肥厚発生関連因子、第 46 回日本心臓血管外科学会総会、2016 年 2 月 16 日、名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med-surgery.jp/study/kiso-01>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 信良 (AZUMA, Nobuyoshi)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：30250559

(4) 研究協力者

中西 啓介 (NAKANISHI, Keisuke)
菊地 信介 (KIKUCHI Shinsuke)
齊藤 幸裕 (SAITOH Yukihiro)