

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790783

研究課題名(和文) 基底膜分子パールカン欠損による新規大動脈解離モデルマウスを用いた分子病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of aorta dissection using perlecan deficient mice.

研究代表者

野中 里紗 (NONAKA, RISA)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90614248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：基底膜分子パールカンを欠損した大動脈組織は、内皮依存性弛緩機能の低下を引き起こすことを示し、大動脈組織における内皮型NO合成酵素(eNOS)の発現低下を引き起こすことを示した。パールカン遺伝子の発現を人為的に低下させた大動脈内皮細胞も、eNOSの発現低下を示し、この低下したeNOSの発現は、組み換えパールカンの存在下で回復すること示した。これらより、パールカン欠損大動脈は、内皮依存性弛緩機能の低下で示されたような内皮機能低下を引き起こし、この機能低下は、eNOS発現の減少に起因することが明らかとなった。そして、パールカンは大動脈内皮のeNOS遺伝子発現維持に役割を果たしていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：A deficiency of perlecan, a basement membrane component, in aorta tissue caused a decrease in endothelium-dependent relaxation function, and a reduced expression of endothelial NO synthase (eNOS) in aortic tissue. In addition, knockdown of perlecan in Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) also showed reduced expression of eNOS. The reduced expression of eNOS was recovered in the presence of recombinant perlecan protein. These data suggest that the deficiency of perlecan in the aortic tissue leads to endothelial dysfunction, as represented by a reduction in endothelium-dependent relaxation. This dysfunction is due, at least partly, to a reduction in eNOS expression. In summary, our results showed that perlecan plays a role in maintaining the eNOS gene expression, and therefore in the endothelium-dependent relaxation function in the aorta.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞外マトリックス 基底膜分子パールカン 大動脈内皮機能

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス分子であるパールカンは、基底膜を構成する構造タンパク質である一方、様々な細胞内シグナルを修飾・制御する多機能細胞外マトリックスとして知られている。パールカンの完全欠損は、軟骨異形成による呼吸不全のため周産期致死性であるが (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al., 1999)、軟骨特異的にパールカンを発現させ生存可能としたコンディショナルノックアウトマウスを作成することにより (Tsumaki et al., 1999; Xu et al., 2010; Ishijima et al., 2012)、様々な組織におけるパールカンの役割を解析することが可能となった。大動脈組織におけるパールカンは、内皮細胞および平滑筋細胞から産生され、内皮と中膜構造維持だけでなく血管病変の進行にも重要であることが知られている。作成したパールカンコンディショナルノックアウトマウスの解析から、パールカン欠損大動脈の約 15% で大動脈解離を発症することを観察した。大動脈解離の病態機序研究は、中膜平滑筋層の断裂が起こることから、中膜層の弾性線維構成分子や血管平滑筋細胞を中心に研究が行われている。ヒト結合組織遺伝性疾患であるマルファン症候群、Ehlers-Danlos syndrome (EDS) 症候群等において、動脈瘤や動脈解離の合併が認められ、その病態機序に細胞外マトリックス分子の重要性が知られている。しかし、基底膜分子と大動脈解離の関連についての報告はない。大動脈解離の発症要因の大半は不明であるが、大動脈壁の脆弱化だけでなく、高血圧が重大な危険因子である。形態学的変化による要因の他、血圧のようなメカニカルストレスに対する反応性の変化も重要である。

2. 研究の目的

本研究では、パールカンコンディショナルノックアウトマウスを用いて、パールカン欠損血管における大動脈解離の発症原因を探索すると共に、パールカンの心血管系機能における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) パールカン欠損大動脈における弾性線維の形態学的観察

パールカンコンディショナルノックアウトマウスおよび対照マウスから摘出した胸部大動脈から切片を作成し、エラスチカワンギーソン染色をおこなった。

(2) パールカン欠損が血管収縮・弛緩機能に与える影響の検討

パールカンコンディショナルノックアウトマウスおよび対照マウスから摘出した胸部大動脈から大動脈リングを作製し、大動脈リング張力試験法をおこなった。弛緩機能に関し、内皮に作用して NO 遊離を起し弛緩作用を示すアセチルコリンと内皮に作用せ

ずに弛緩作用を示す外因性 NO 様物質の二トロブルシドナトリウムを用いて検討をした。

上記の弛緩機能検討に対し、内皮特異マーカーである von Willebrand factor および内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の RNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。また、eNOS のタンパク質発現は、ウェスタンブロット法を用いて解析した。

(3) パールカン発現と eNOS 発現の関連の検討

ヒト大動脈内皮細胞 (HAECs) にパールカン siRNA およびコントロール siRNA を処理し、ノックダウン HAECs を作製した。パールカンおよび eNOS の RNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

パールカン分子のヘパラン硫酸鎖の関与を検討する為、HAECs へのヘパリナーゼ処理によりヘパラン硫酸鎖を除去後、1, 12, 24 時間後の eNOS の RNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

eNOS 発現においてパールカン分子が重要であることを示す為、組み換えパールカンをコートしたプレート上に、パールカン siRNA 処理した HAECs を播種し、36 時間後の eNOS の RNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) パールカン欠損大動脈における弾性線維の形態学的観察

パールカン欠損および対照マウスの大動脈のエラスチカワンギーソン染色を行った結果、パールカンコンディショナルノックアウトマウスおよび対照マウスの大動脈組織の弾性板に有意な変化は認められなかった。

Control

Perl KO

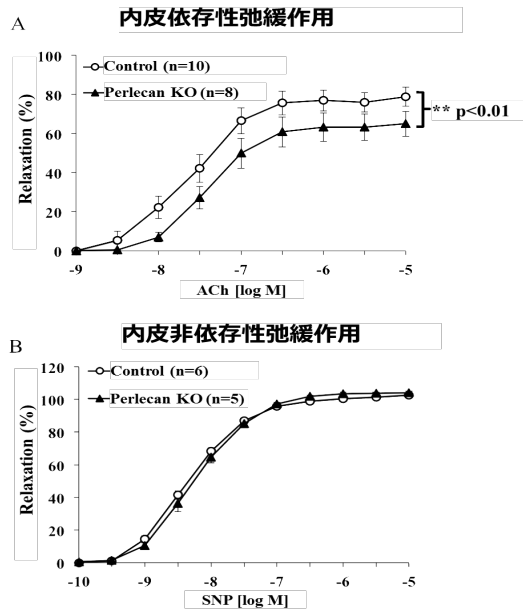


(図 1) パールカン欠損大動脈における弾性線維の形態学的観察

(2) パールカン欠損が血管収縮・弛緩機能に与える影響の検討

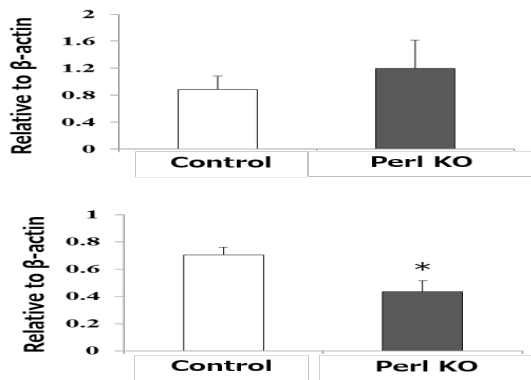
アセチルコリンを用いた内皮依存性弛緩機能を検討した結果、パールカン欠損大動脈のアセチルコリンによる弛緩機能は、対照大動脈と比較し、有意に低下した (図 2 -A)。一方、外因性 NO 様物質である二トロブルシドナトリウムを用いた内皮非依存性弛緩機能を検討した結果、パールカン欠損大動脈の二トロブルシドナトリウムによる弛緩機能は、対照大動脈の弛緩機能と比較し、変化は認め

られず、NO に対する血管平滑筋の反応性は、保持されている（図 2 -B）。パールカン欠損大動脈は内皮依存性弛緩機能の低下していることがわかった。

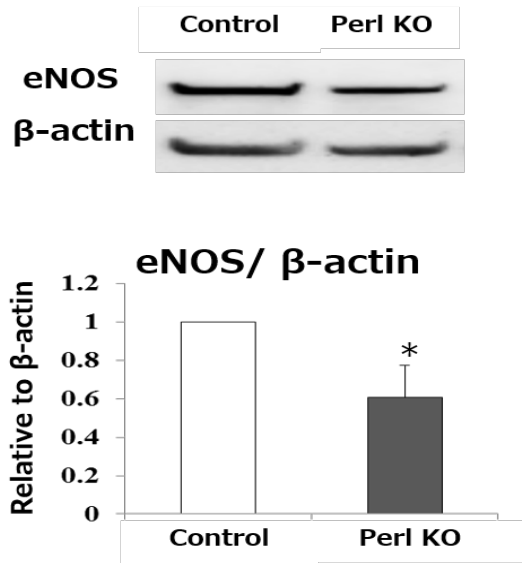


(図 2) 内皮依存性弛緩作用の検討

パールカン欠損大動脈の内皮依存性弛緩機能の低下が認められたこと、NO に対する反応性は保持されていたことから、内皮からの NO 遊離低下が考えられた。内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の発現検討をした結果、パールカン欠損大動脈における eNOS の RNA 発現が、対照大動脈と比較し、有意に低下していた。この時、内皮特異マーカーである von Willebrand factor の RNA 発現には有意な変化は認められなかった (図 3)。また、eNOS タンパク質発現をウェスタンブロット法により検討した結果、パールカン欠損大動脈における eNOS タンパク質発現も、対照大動脈と比較し、有意に減少していた (図 4)。パールカン欠損大動脈において eNOS の発現が有意に低下していることがわかった。



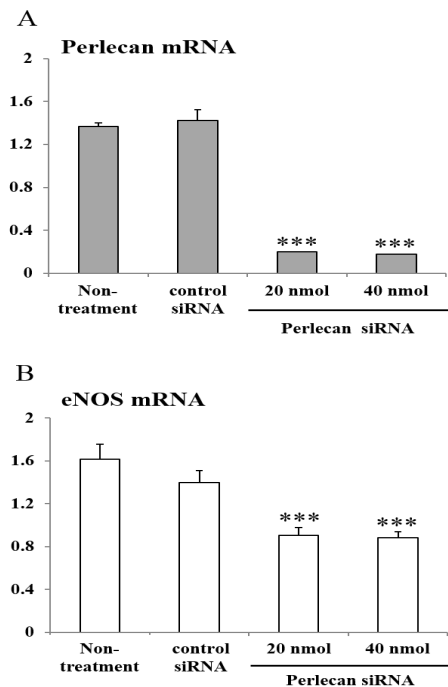
(図 3) 両表現型マウス大動脈組織における von Willebrand factor と eNOS の RNA 発現



(図 4) 両表現型マウス大動脈組織における eNOS のタンパク質発現

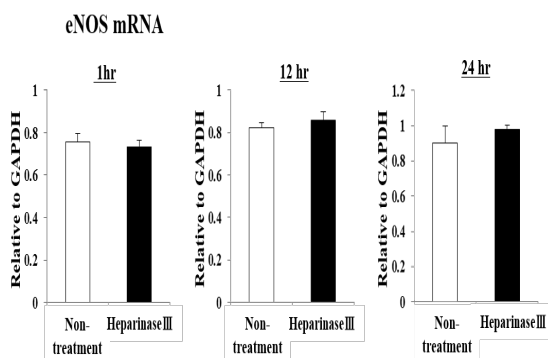
(3) パールカン発現と eNOS 発現との関連の検討

パールカン発現と eNOS 発現との関連を検討する為、ヒト大動脈内皮細胞 (HAECs) にパールカン siRNA を処理し、パールカンノックダウン HAECs を作製した。HAECs にパールカン siRNA を処理することで、パールカンの RNA 発現が約 90%、有意に減少することを確認した (図 5 -A)。同条件下、eNOS の RNA 発現を解析した結果、パールカン siRNA 処理により eNOS の RNA 発現が約 50%、有意に減少した (図 5 -B)。パールカン発現の減少は、eNOS 発現を減少させることがわかった。



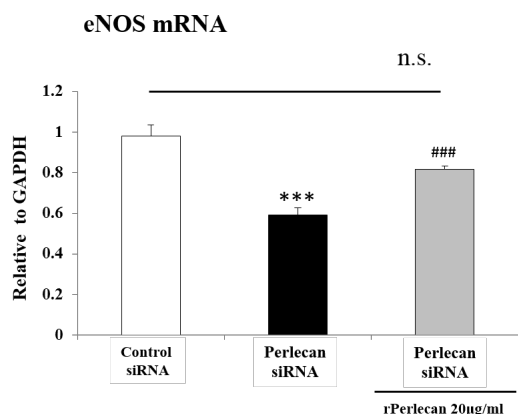
(図 5) パールカン siRNA 処理 HAECs におけるパールカンと eNOS の RNA 発現

パールカン分子のヘパラン硫酸鎖が eNOS 発現に影響を与えるか検討する為、HAECs にヘパリナーゼ を処理することでヘパラン硫酸鎖を除去し、継時的な eNOS の RNA 発現の変化を検討した。ヘパリナーゼ 処理 HAECs のヘパラン硫酸鎖の除去は、蛍光免疫染色法にて確認した。ヘパラン硫酸鎖除去後、1, 12, 24 時間後の eNOS の RNA 発現を検討した結果、ヘパリナーゼ未処理 HAECs の eNOS の RNA 発現と有意な差は認められなかった (図 6)。ヘパラン硫酸鎖の欠損は、eNOS の RNA 発現に影響を与えないことがわかった。



(図 6)ヘパリナーゼ 処理後の eNOS の RNA 発現は変化しない。

eNOS 発現にパールカン分子が重要であることを検討する為、組み換えパールカンを用いてレスキュー実験を行った。組み換えパールカンをコートしたプレート上に、パールカン siRNA 処理した HAECs を播種し、36 時間後の eNOS の RNA 発現を検討した結果、組み換えパールカンの存在下において、パールカン siRNA 処理により減少した eNOS の RNA 発現が、コントロール siRNA 処理 HAECs と同等レベルまで回復した。パールカンは、eNOS の発現に影響を与えることが分かった。(図 7)



(図 7)組み換えパールカン存在下、パールカン siRNA 処理により減少した eNOS の RNA 発現は回復する。

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 1 件)

Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega, Hiroyuki Daida, Takao Okada, Takako Sasaki, and Eri Arikawa-Hirasawa

Perlecan deficiency causes endothelial dysfunction by reducing the expression of endothelial nitric oxide synthase.

Physiological Reports, 査読有, 2015, 3(1), e12272

[学会発表](計 5 件)

野中 里紗, 家崎 貴文, Susana de Vega, 山田 吉彦, 平澤 (有川) 恵理, 大動脈内皮細胞におけるヘパラン硫酸プロテオグリカン、パールカンの機能解析、第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11 - 14 日) 福岡国際会議場・福岡マリンメッセ

野中 里紗, 家崎 貴文, Susana de Vega, 山田 吉彦, 平澤 (有川) 恵理, ヘパラン硫酸プロテオグリカン、パールカンの内皮依存性血管拡張における役割、第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3 - 6 日) 神戸ポートアイランド

Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa, The role of the extracellular matrix protein Perlecan in the arterial wall., Experimental Biology 2014 (2014 年 4 月 26-30 日) San Diego, USA

野中 里紗, 家崎 貴文, Susana de Vega, Aurelien Kerever, 山田 吉彦, 平澤 (有川) 恵理, 大動脈構造や機能におけるパールカンの役割、第 46 回日本結合組織学会・第 61 回マトリックス研究会合同学術集会、2014 年 6 月 7-8 日、ウインク愛知

Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega., Aurelien Kerever, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa, Role of Perlecan in the Structural Integrity and Function of the Aorta., Gordon Research Conference on proteoglycan, 2014 年 7 月 6-11 日、New Hampshire, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

野中 里紗 (Nonaka Risa)

順天堂大学・医学研究科・ポスドク

研究者番号：90614248