

平成 23 年 3 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790539
研究課題名（和文） eNOS 阻害物質 ADMA の産生酵素 PRMT の血管内皮細胞過剰発現マウスの解析
研究課題名（英文） Analysis of endothelium-targeted PRMT-overexpressed mice

研究代表者
竹田 光男（TAKEDA MITSUO）
京都府立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：50433256

研究成果の概要（和文）：一酸化窒素（NO）は、血管内皮細胞の恒常性を維持し、強力な抗動脈硬化作用を有す。NO は、血管内皮細胞で一酸化窒素合成酵素(eNOS)により産生される。一方、ADMA は、内因性の eNOS 阻害物質である。ADMA は高脂血症、糖尿病、慢性腎疾患（CKD）で上昇し、CKD で動脈硬化が促進される重要な一因であると考えられる。ADMA は、protein arginine N-methyltransferases (PRMT)によりその合成が促進される。今回 ADMA の血管内皮における恒常的な過剰産生が、生体内において血管の内皮細胞の機能にどのような影響を与えるのか解明するために、Tie2-Promoter を用いてマウス PRMT-1 を内皮細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成し、そのマウスにおける脈硬化病変や血管老化の促進の有無を調べ、ADMA の血管系に及ぼす影響を解析した。結果、同マウスにおいては血清中の ADMA 濃度が増加し、また、逆に NO 濃度が低下していることを確認した。同マウスを、ApoE 欠損マウスと交配、ダブルノックアウトマウスを作成したところ、ApoE 欠損マウスと比較し、動脈硬化病変形成が促進された。同マウスの血管内皮細胞において、eNOS/NO 系が抑制されることを確認した。同マウスにストレプトゾトシンによる糖尿病モデル作成したところ、その血管内皮細胞において、内皮細胞の機能不全（接着因子・サイトカイン・ケモカインの発現増加）が促進された。以上より、ADMA は血管内皮細胞の eNOS/NO 系を抑制し動脈硬化に促進的に働くことがわかった。

研究成果の概要（英文）:Endothelial Nitric Oxide (NO) has been shown to maintain EC function to prevent atherosclerosis. NO is produced by endothelial NO synthase. ADMA (asymmetric dimethylarginine) acts as an endogenous NO inhibitor and its level increases in hyperlipidemia, hyperglycemia, and chronic renal disease. However, the effect of increased ADMA synthesis on endothelial function was not clear. ADMA was synthesized by protein arginine N-methyltransferases (PRMT). We generated the transgenic mice in which PRMT was over-expressed in endothelium-specific manner using Tie-2 promoter (Tie2-PRMT-Tg) to study the effect of increased ADMA in endothelium. We found that ADMA level in the serum increased to 3.8-fold, whereas NO level decreased to 42%, compared to the control. Tie2-PRMT-Tg were crossed with ApoE-deficient mice (ApoE-KO) to generate Tie2-PRMT-Tg/ApoE-KO mice. At 8 weeks after Western diet, the Tie2-PRMT-Tg/ApoE-KO shows attenuated atherosclerosis, compared to ApoE-KO. ¹¹⁷⁷Ser phosphorylation level of eNOS

in the PRMT-Tg/ApoE-KO was decreased. Furthermore, streptozotocine-induced hyperglycemia induced synthesis of MCP and TNF α -mRNA in in PRMT-Tg/ApoE-KO was ~3 fold higher than ApoE-KO. Thus, PRMT-Induced ADMA inhibited NO to promote endothelial dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：eNOS, PRMT, ADMA, 血管内皮細胞、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素（NO）は、アセチルコリン誘導性血管拡張、血管平滑筋増殖の阻害、血管内皮細胞での接着因子産生抑制や、サイトカイン産生の低下を介して、強力な抗動脈硬化作用を有している。NOは、血管内皮細胞において、血流シエアストレスにより活性化された一酸化窒素合成酵素(eNOS)が L-arginine を基質として産生する。一方、ADMA(asymmetric dimethylarginine)は、内因性の eNOS 阻害物質であることが明らかとなってきた。ADMA は高脂血症、糖尿病のほか、慢性腎疾患（CKD）で上昇することが近年明らかとなってきており、CKD で動脈硬化が促進される重要な一因と考えられる。

一方、ADMA は、protein arginine N-methyltransferases (PRMTs)によりその合成が促進される。すなわち、PRMT はタンパク質のアルギニン残基にメチル基を付加する酵素である PRMT の作用過剰により、アルギニンがメチル化されたタンパク質が増

加し、その蛋白の分解により、遊離メチルアルギニン残基が多く産生され、その一部が、ADMA であるが、それが血中に放出される。

2. 研究の目的

ADMA の血管内皮における恒常的な過剰産生が、生体内において血管の内皮細胞の機能にどのような影響を与えるのか解明する

3. 研究の方法

Tie2-promoter を用いてマウス PRMT-1 を内皮細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成し、そのマウスが実際に血清中の ADMA が増加し、また、逆にNO が低下していることを確認し、同マウスにおいて、また、ApoE 欠損マウスと交配しダブルノックアウトマウスを作成することで、動脈硬化病変が見られるかどうかを調べ、ADMA による eNOS/NO 系の恒常的阻害がいかなる影響を血管系に及ぼすか解析する。また、高血糖、高脂血症、慢性腎疾患の疾患モデル動物の血管内皮細胞において、また動脈硬化、老化血管の血管内皮細胞において、

ADMA の増加を介した、eNOS/NO 系の機能不全があることが明らかとなりつつあるが、そのような病態において、PRMT の過剰発現が起こっていないか動物モデルを作成し調べる。

4. 研究成果

1) トランスジェニックマウスの確立と解析
血管内皮細胞特異的発現トランスジェニックベクターである、pTie2-Promoter の 3 ‘下流に FLAG タグを付けたマウス PRMT-cDNA をつないだ Construct を作成し、マウス受精卵に Microinjection を行い、定法通りトランスジェニックマウスを作成した。PRMT の発現を血管内皮細胞が豊富な、肝部分切除による生検サンプルでウエスタンブロットを行い、最も多く PRMT の発現している 3 ラインを確認し、それらを維持できた。また、同マウスにおいて PRMT の血管内皮細胞特異的な発現を免疫組織染色にて確認しえた。同マウスでは、解剖学的に、大きな変異が無かった。同マウスにおいて、ADMA の血中濃度がコントロールとくらべ 3.5 倍に増加し、また尿中・血中の NO 代謝産物、NO_x がそれぞれ 48%、36% 減少していた。6 か月零の大動脈組織において、内膜、中膜平滑筋細胞層の肥厚がみられ、外膜の炎症性変化もみられた。また、ウエスタンブロットで大動脈標本で eNOS のリン酸化が、コントロールマウスと比較し減少していることを見出した。大動脈内皮細胞において接着因子の発現が亢進し、Masson Trichrom 染色にて血管中膜層における線維化の亢進がみられた。また、8-OH-dG 染色・DHE 染色にて中膜平滑筋細胞層において、活性酸素の産生が亢進した。さらに、TNF α 、IL-1 β 、MCP-1 などの炎症性のサイトカインの発現も real-time-PCR でコントロールと比べ最大 2.8 倍程度まで増加が見られた。さらに、遊離

大動脈標本について、アセチルコリン負荷における大動脈弛緩反応を調べたところ、コントロールと比較し、68% の減少がみられた

2) 初代培養内皮細胞系の確立と解析

血管内皮細胞の初代培養系を大動脈の Explant 法で樹立し解析を行ったところ、eNOS の 1177Ser リン酸化、NO の産生が顕著に低下し、また、VEGF に対する増殖、遊走活性反応が減弱していた。低酸素(1%酸素)暴露における Apoptosis が促進された。また Fluid Shear Stress 暴露による、eNOS のリン酸化、NO 産生が、コントロールと比較し抑制された。さらに、アンギオテンシン II 刺激における NADPH-Oxidase の活性化、及び活性酸素の産生が増強していた。さらにアンギオテンシン負荷後の p21、27、53 の発現が蛋白レベルで 2 倍程度までそれぞれ上昇し、さらに senescence-associated β -galactosidase 染色陽性細胞も ~2.5 倍まで増えていた。アンギオテンシン II 負荷による炎症性サイトカイン(IL-1,TNF)や線維化促進性の成長因子 (TGF β ,CTGF)の発現も ~3 倍まで上昇が見られた。

3) PRMT 血管内皮細胞過剰発現マウスを低酸素暴露したところ、肺の中膜層の肥厚により誘導される肺高血圧症が顕著に増悪し、個体死亡にいたる期間が半分程度に短縮していた。

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 1 件)

1) Matsunaga S, Okigaki M, Takeda M, Matsui A, Honyo S, Katsume AA, Kishita E, Jishan C, Kurihara T, Adachi Y, Mansukhani A, Kobara M,

Matoba Y, Tatsumi T, Matsubara H. Endothelium-targeted overexpression of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 46(5):663-673, 2009

〔学会発表〕（計2件）

1) Matsunaga S, Tatsumi T, Okigaki M, Kishita E, Kimata M, Honsyo S, Takeda M, Nishikawa S, Matoba S, Kobara M, Matsubara H. Overexpression of Tie2-promoted Activated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells enhances Angiogenesis and Induces Cardioprotective Effect via Src-Akt-Hif1 α Signaling Pathway in Mice Myocardial Infarction **American Heart Association 2007** Nov4-7, Orlando, USA

2) Takeda Mitsuo, Tetsuya Tatsumi, Mitsuhiko Okigaki, Shinsaku Matsunaga, Susumu Nishikawa, Miyuki Kobara, Hiroaki Matsubara, Overexpression of Tie-2-Promoted Activated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells Enhances Mature Neovascularization via Akt Signaling Pathway in Mice Hindlimb Ischemia **American Heart Association 2007** Nov4-7, Orlando, USA

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 光男 (TAKEDA MITSUO)

京都府立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：50433256