

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19523

研究課題名(和文)細胞内代謝系を繋ぐp53分子による動脈硬化の統合的新解釈構築

研究課題名(英文)The role of p53 in atherosclerosis

研究代表者

山口 宗一 (Yamakuchi, Munekazu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：20325814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん抑制遺伝子p53分子の血管炎症調節因子としての役割について検討するものである。腫瘍新生血管の進展には、がん細胞の分泌する血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が重要であるが、グルコースの濃度により低酸素下のVEGF-A産生能、解糖系律速酵素のhexokinase 2の発現が制御されることなどを見出した。がん細胞由来エクソソームについてがん細胞に特有な糖鎖の検討を行った。また、マクロファージのレジオネラ感染モデルで血管の炎症について、mTORとマイクロRNAのシグナルの重要性を報告した。これらの現象にp53が関与しているか検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、動脈硬化発症進展機序の新機軸として、がん抑制遺伝子として知られるp53分子が血管系でどのように働くかを検討したものである。特に生体のエネルギー源であるグルコースが、p53を介して血管内皮細胞に直接、間接的に及ぼす作用について考察するもので、学術的には新規性が高い。生活習慣病がますます増加する現代社会において、グルコースの血中動態、細胞内での代謝が、血管の病的状態(炎症や機能不全)にどのような影響を及ぼすか調べることで、生活習慣病の予防、治療を模索するものであり、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The role of the cancer suppressor gene p53 molecule as a regulator of vascular inflammation was investigated. Vascular endothelial growth factor (VEGF), which is secreted by cancer cells, is important for tumor neovascularization. We found that glucose concentration in culture media restricted the production of VEGF-A and the expression of the rate-limiting enzyme hexokinase 2 under hypoxia. We investigated cancer cell-specific glycoprotein on cancer cell-derived exosomes. The importance of mTOR and microRNA signaling for vascular inflammation in a model of macrophage legionella infection was also reported. The involvement of p53 in these phenomena is under investigation.

研究分野：分子血管細胞学

キーワード：p53 血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) p53 分子の多彩な機能

がん抑制遺伝子 p53 分子は guardian of genome といわれ、半数以上のがんで異常が見られるといわれる重要な細胞内シグナル分子である。p53 は、p53 応答配列 (RRRCWWGYYY (R; A/G, W; A/T, Y; C/T) 配列が 0 ~ 13 bp のスペーサーをはさんで 2 回タンデムに反復した配列) と結合することで、転写因子として働き、活性化 p53 は細胞周期を停止させる。外界の異なるストレスに応答した p53 は、細胞周期調節のみならず、DNA 修復、アポトーシス、老化などの生理機能調節を行っており、多彩な機能を持った multifunctional な分子の一つである。

(2) p53 の血管における作用

血管内皮細胞の p53 分子は内皮機能を制御している。持続的な酸化ストレスは血管内皮細胞の老化を誘導し、p53 発現増加・活性化、Sirtuin1 (SIRT1) 発現低下などが見られるが、SIRT1 の制御はマイクロ RNA の一つ miR-34a が担っていることを報告した。この実験系では血管内皮細胞の p53 がこの miR-34a の発現を誘導していたが、血管の p53 はバラエティーに富んだ刺激応答機構が存在し、その詳細は未知の部分が多い。

2. 研究の目的

p53 による血管の老化の一つの機序として細胞内代謝との関連が考えられている。AMPK や PGC-1 α などの分子を介して p53 はミトコンドリアの代謝の制御をしているという。本研究では、p53 と代謝の関連が血管の炎症の調節因子であるという仮説を立てた。この仮説の検証のために、当初以下の 3 つの点に注目して研究を進めた。

(1) p53 分子による糖代謝の制御: p53 分子と糖代謝関連分子や糖鎖修飾分子の関連を分子の動態と絡めて検討する。

(2) p53 分子の鉄代謝の制御: 鉄代謝は炎症と強く関連があることから、p53 分子が鉄代謝関連分子に及ぼす影響を調べることで、鉄の血管内での新たな働きの解明につながる。

(3) p53 分子と mTOR シグナルの相互作用の制御: mTOR シグナルは、細胞の生存、増殖のみならず、免疫との関連が注目されており、このシグナル経路の重要な分子の動態を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養: 肝臓がん細胞株 HepG2、メラノーマ細胞株 A375、マクロファージ系細胞株 U937 は ATCC より購入した。培養メディウムとして HepG2 と A375 は DMEM-high glucose (10% FBS 添加)、U937 は RPMI1640 (10% FBS 添加) を用いた。U937 は PMA 添加にて 2 日間培養したのちプレートに接着したものを使用した。

(2) 細胞の刺激条件: 細胞の低酸素刺激は 1% の低酸素状態の気体 (1% 酸素、94% 窒素、5% 二酸化炭素) を注入した hypoxia chamber 内で細胞を培養した。LPS 刺激は通常培養条件で行った。

(3) miRNA の強発現、ノックダウン: miR-218 の発現増強には miR-218 precursor oligo、発現抑制には miR-218 antisense oligo、対照として scramble oligo を ThermoFisher 社より購入して、終濃度 10 ~ 40 pM に調整し lipofectamine RNAimax を使用して細胞に導入した。

(4) miRNA、mRNA 発現の定量: 細胞もしくは培養上清から miRNeasy キット (キアゲン社) を用いて RNA を抽出したのち各々の cDNA を作成後、Taqman microRNA assay (ThermoFisher 社) を使用して定量 PCR (qPCR) を行った。内因性コントロールとして、miRNA には U6、mRNA には beta-actin を用いた。

(5) シグナル分子の検討: Rictor、Akt、beta-actin などの蛋白質検出には培養細胞溶解液を使用してウエスタンブロット法にて検出した。抗体は CST 社、Bioscience 社、サンタクルーズ社より適宜購入して使用した。VEGF の蛋白質検出は ELISA 法で行った。また、IL-6 測定は multiplex (BioRad 社) により行った。

(6) 糖鎖解析のためのエクソソーム解析: 培養細胞から放出されたエクソソームは、細胞培養液 100 mL から段階的な超遠心法を行い単離した。

4. 研究成果

以下のいくつかの重要なデータを解析し、一定の成果を得ることができた。

(1) 腫瘍新生血管形成への糖の影響

血管内皮細胞は恒常的に細胞周期が停止しているが、障害を受けると増殖し血管修復が行われる。また、がん細胞は自らの生存増殖のために、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を分泌し、腫瘍新生血管を誘導する。そもそもがん細胞はエネルギーの多くを解糖系に依存する特殊な代謝形態を持つ (ワールブルグ効果)。培養肝細胞癌株の HepG2 を低酸素 hypoxia (酸素濃度 1% 以下) 状態で培養すると、通常酸素 normoxia 状態に比べて VEGF-A の発現が増強し VEGF-A は細胞

液中に分泌される (図 1A)。この時、培養液中の glucose 濃度を通常の 10%程度に減少させると VEGF-A の分泌は増強した (図 1B)。p53 分子は VEGF-A の発現を促進するが、低糖刺激により p53 が活性化して VEGF-A の発現が増強したと考えられる。血管における P53 と VEGF-A の相互作用については今後検討していく予定である。

(2) 解糖系への糖の影響

解糖系の律速酵素であるヘキソキナーゼ (hexokinase) は、代謝の同化、異化を幅広く司るが 4 つのアイソザイムが存在する。このうち hexokinase 2 (HK2) は、がん細胞での過剰発現が報告されておりワールブルグ効果との関連も指摘されている。4.1.の実験において、HepG2 細胞が低酸素状態にさらされると HK2 の発現は増加するが、低糖刺激によりこの HK2 の発現はさらに増強することを見出した。このことは、先の VEGF-A の発現増強の結果から類推して、HK2 の制御機構に、p53 の活性化が絡んでいる可能性を示している。この点についてさらに解析を進める予定である。

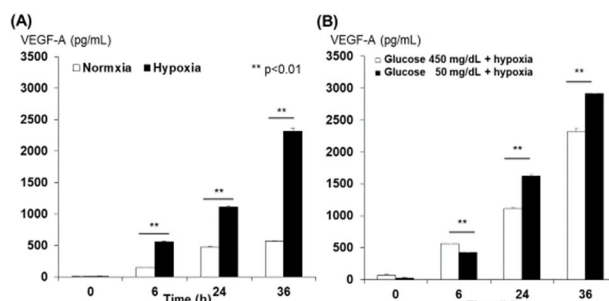


図 1 HepG2細胞で低酸素刺激による VEGF-A 発現誘導がグルコース濃度の低下により増強する。

HepG2 細胞が低酸素状態にさらされると HK2 の発現は増加するが、低糖刺激によりこの HK2 の発現はさらに増強することを見出した。このことは、先の VEGF-A の発現増強の結果から類推して、HK2 の制御機構に、p53 の活性化が絡んでいる可能性を示している。この点についてさらに解析を進める予定である。

(3) 糖鎖についての知見

がん由来の糖鎖に対するレクチンを使用して、特定の糖蛋白を表面糖蛋白としてもつ細胞外小胞を選択的に捕捉する系を立ち上げることができた。がん細胞が放出するエクソソームは、がんの転移、増殖に必須と考えられており、このエクソソームの除去はがん治療の援護射撃となる可能性がある。がん細胞由来のエクソソームには特有の高マンノース型糖鎖が存在しており、これに結合するレクチンについて検討した。このレクチンと結合するエクソソーム膜上の蛋白の同定も行い、これらの結果は、Analytical Biochemistry (2019 年)に掲載された。

(4) mTORC2 による炎症制御

mTOR シグナル伝達系は、エネルギー代謝を制御する重要な役割を持つ。がん細胞の代謝においてもがん遺伝子 c-Myc や p53 分子と強調して働いている。一方、血管内皮の生存維持にも mTOR による制御機構が重要であり、mTOR シグナルは各々の細胞において環境に応じた活性機構があると考えられる。敗血症など細菌感染症では、血管炎症も惹起されついに全身炎症、多臓器不全に至る。レジオネラ菌は自然界に生息するグラム陰性桿菌で、肺胞マクロファージに感染し肺炎を引き起こす。レジオネラ属を代表する *Legionella pneumophila* による単球マクロファージの感染において mTORC2、マイクロ RNA の一つ miR-218 の関与を発見した。

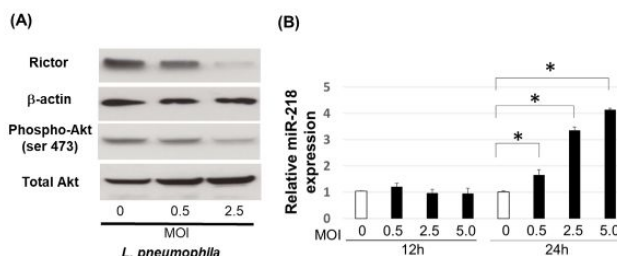


図 2 U937細胞で *L. pneumophila* 感染により、Rictor 発現の抑制・AKT リン酸化減弱と miR-218 発現の誘導が見られた。

ヒトマクロファージ培養細胞株の U937 に *L. pneumophila* を感染させると、MOI (菌量) 依存性に mTORC2 複合体の主要分子 Rictor の発現が減少した (図 2A)。 *Legionella pneumophila* 感染により、U937 の miR-218 レベルは増加していた (図 2B)。また、Rictor 遺伝子の 3' 非翻訳領域には miR-218 の結合部位が存在し、miR-218 を U937 に強発現すると Rictor の発現は抑制された (図 3A)。さらに、Rictor のノックダウンでは U937 のサイトカイン産生が増強しており、また miR-218 のノックダウンでは Rictor 発現の増強によると考えられるサイトカイン産生能の減弱が確認できた (図 3B)。

これら一連の結果は、mTORC2 の炎症制御、miRNA による mTOR シグナル制御の可能性を示唆している。この知見は、Biochem Biophys Res Commun. (2019 年)に掲載された。今後は p53 分子がこの現象にいかに関与しているかを明らかにし、血管内皮細胞での働きについても合わせて検討していく予定である。

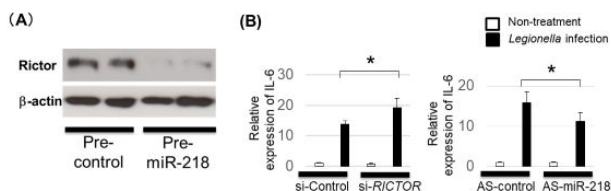


図 3 Rictor は miR-218 の標的分子の一つである。 *L. pneumophila* 感染による IL-6 産生は、Rictor のノックダウンにより増強、miR-218 のノックダウンにより減弱する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aryal Bibek, Yamakuchi Munekazu, Shimizu Toshiaki, Kadono Jun, Furoi Akira, Gejima Kentaro, Komokata Teruo, Hashiguchi Teruto, Imoto Yutaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Therapeutic implication of platelets in liver regeneration ?hopes and hues	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Expert Review of Gastroenterology & Hepatology	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17474124.2018.1533813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aryal Bibek, Yamakuchi Munekazu, Shimizu Toshiaki, Kadono Jun, Furoi Akira, Gejima Kentaro, Komokata Teruo, Koriyama Chihaya, Hashiguchi Teruto, Imoto Yutaka	4. 巻 2019
2. 論文標題 Predictive Value of Diminished Serum PDGF-BB after Curative Resection of Hepatocellular Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/1925315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koriyama Toyoyasu, Yamakuchi Munekazu, Takenouchi Kazunori, Oyama Yoko, Takenaka Hiroyoshi, Nagakura Takumi, Masamoto Izumi, Hashiguchi Teruto	4. 巻 508
2. 論文標題 Legionella pneumophila infection-mediated regulation of RICTOR via miR-218 in U937 macrophage cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 608 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aryal Bibek, Yamakuchi Munekazu, Shimizu Toshiaki, Kadono Jun, Furoi Akira, Gejima Kentaro, Komokata Teruo, Hashiguchi Teruto, Imoto Yutaka	4. 巻 2018
2. 論文標題 Deciphering Platelet Kinetics in Diagnostic and Prognostic Evaluation of Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/9142672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamakuchi Munekazu, Hashiguchi Teruto	4. 巻 7
2. 論文標題 Endothelial Cell Aging: How miRNAs Contribute?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 170 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm7070170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aryal Bibek, Yamakuchi Munekazu, Shimizu Toshiaki, Kadono Jun, Furoi Akira, Gejima Kentaro, Takenouchi Kazunori, Komokata Teruo, Hashiguchi Teruto, Imoto Yutaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Bivalent property of intra-platelet VWF in liver regeneration and HCC recurrence: A prospective multicenter study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Biomarkers	6. 最初と最後の頁 51 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/CBM-190168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aryal Bibek, Yamakuchi Munekazu, Hashiguchi Teruto, Imoto Yutaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Intra-platelet Serotonin as a Biomarker in HCC Recurrence: When Time Matters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2384 ~ 2385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.30696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Mika, Harada Yoichiro, Suzuki Takehiro, Fukushige Tomoko, Yamakuchi Munekazu, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Hori Kanji, Maruyama Ikuro	4. 巻 580
2. 論文標題 Application of high-mannose-type glycan-specific lectin from Oscillatoria Agardhii for affinity isolation of tumor-derived extracellular vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 21 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2019.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 波野 史典, 山口 宗一, 前之園 隆一, 入来 泰久, 二宮 雄一, 市来 仁志, 政元 いずみ, 大石 充, 堀内 正久, 橋口 照人, 丸山 征郎
2. 発表標題 心房細動アブレーション治療における可溶性トロンボモジュリンと循環miRNAの動態
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 篤人, 山口 宗一, 吉村 明子, 古城 剛, 小濱 祐行, 竹之内 和則, 大山 陽子, 政元 いずみ, 高嶋 博, 橋口 照人
2. 発表標題 親子間で病型の異なるフォン・ヴィレブランド病の一家系
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 英昭, 山口 宗一, 松本 和久, 竹之内 和則, 大山 陽子, 橋口 照人, 井本 浩
2. 発表標題 大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術前後での末梢血、凝固系の検討
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会第51回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口宗一、郡山豊康、清水利昭、竹之内和則、大山陽子、政元いずみ、橋口照人
2. 発表標題 レジオネラ菌感染におけるマクロファージ様細胞U937のmicroRNAを介した応答機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口宗一、竹之内和則、大山陽子、橋口照人
2. 発表標題 Regulation of von Willebrand factor release in endothelial cells
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Takagi, Kentaro Machida, Takahiro Matsuyama, Kota Sakaue, Kiyotaka Kondo, Munekazu Yamakuchi, Teruto Hashiguchi, Hiromasa Inoue
2. 発表標題 miR-375 attenuated innate immune response in bronchial epithelial cell through modulate of JAK2-STAT1 pathway
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Munekazu Yamakuchi, Koichi Takagi, Takahiro Matsuyama, Kiyotaka Kondo, Akifumi Uchida, Shunsuke Misono, Kazunori Takenouchi, Yoko Oyama, Hiromasa Inoue, Teruto Hashiguchi
2. 発表標題 The role of IL-13 in regulating pulmonary artery endothelial cell migration
3. 学会等名 the 40th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichi Takagi, Munekazu Yamakuchi, Takahiro Matsuyama, Shunsuke Misono, Teruto Hashiguchi, Hiromasa Inoue
2. 発表標題 IL-13 enhances mesenchymal transition of pulmonary artery endothelial cells through down-regulation of miR-424 and miR-503 in vitro
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 山口宗一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Cardio-Coagulation	5. 総ページ数 5
3. 書名 バイオマーカーを理解する von Willebrand因子	

1. 著者名 山口宗一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューロサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 細胞 p53分子と血管炎症のかかわり	

1. 著者名 山口 宗一, 郡山 豊泰, 清水 利昭, 竹之内 和則, 大山 陽子, 政元 いずみ, 橋口 照人	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨床検査医学会	5. 総ページ数 12
3. 書名 臨床病理 miRNAによる自然免疫制御機構	

1. 著者名 山口 宗一, 橋口 照人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本臨床化学会	5. 総ページ数 8
3. 書名 臨床化学 検査医学へつながるmiRNA研究	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸山 征郎 (Maruyama Ikuro) (20082282)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授 (17701)	
研究分担者	大山 陽子 (Oyama Yoko) (20583470)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	
研究分担者	竹之内 和則 (Takenouchi Kazunori) (30646758)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究分担者	橋口 照人 (Hashiguchi Teruto) (70250917)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	郡山 豊泰 (Koriyama Toyoyasu) (60723616)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・臨床検査技師 (17701)	