

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19590847  
 研究課題名（和文）新規血管新生抑制因子バソヒビンによる血管内皮の老化と細胞死の抑制  
 研究課題名（英文）Inhibition of cellular senescence and death by a novel angiogenic inhibitor, vasohibin-1 in vascular endothelial cells  
 研究代表者  
 宮下 浩輝（MIYASHITA HIROKI）  
 東北大学・加齢医学研究所・助教  
 研究者番号：80302222

研究成果の概要：血管新生抑制因子vasohibin-1は血管内皮細胞に細胞死を起こすのではなく、逆に抗細胞死・抗老化作用など内皮細胞の生存や恒常性維持に重要な役割を演じていること、その抗細胞死・抗老化作用は長寿遺伝子SIRT1を介していることを明らかにした。この研究をさらに進めることによって内皮細胞の老化によって生じる動脈硬化(心疾患や脳血管疾患の原因)を抑制できることが期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：バソヒビン, 血管新生抑制因子, アポトーシス, 細胞の老化

## 1. 研究開始当初の背景

我々が発見したvasohibin-1はVEGFなどの血管新生刺激に反応して血管内皮細胞が自ら産生・分泌し、自らに作用して血管新生を抑制する極めてユニークな分泌タンパクである。そのユニークさゆえにvasohibin-1には血管新生抑制作用以外の機能があるのでは

ないかと予想された。

## 2. 研究の目的

一般に、血管新生抑制因子は内皮細胞の細胞死を促進することによって細胞増殖を抑制する。しかし、vasohibin-1遺伝子を安定導入したマウス内皮細胞では、血管新生は抑制

されるが細胞死は増加せず、逆にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>などの種々の細胞ストレスに対して細胞死が抑制されること。一方、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において vasohibin-1 siRNA で vasohibin-1の発現をノックダウンすると内皮細胞は老化した内皮に特徴的な大型で平坦な形態を呈し、細胞老化の指標である senescence-associated β-galactosidase(SA-β-gal)陽性細胞も増加することを見出した。

以上の結果は血管新生抑制因子として単離・同定された vasohibin-1は血管内皮細胞に対して抗細胞死・抗老化作用など血管内皮細胞の恒常性維持に重要な役割をも有していることを強く示唆している。

現在、日本人の死因の2位の心疾患と3位の脳血管疾患はともに血管の障害が基盤にある疾患である。これらの血管障害による疾患は動脈硬化がそのおもな原因であり、動脈硬化の本体である血管内皮細胞の老化と死を抑制することがこれらの疾患による死を抑制できると考えられる。この研究の目的は血管内皮細胞において vasohibin-1がどのようなメカニズムで抗老化・細胞死作用を発揮するのかを明らかにすることと vasohibin-1によって動脈硬化を抑制できるかを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (in vitro の解析)

1、 vasohibin-1 が SIRT1 の発現を制御していることを明らかにしているが、 vasohibin-1 が実際に SIRT1 の活性にも影響を与えるかを ELISA を用いて vasohibin-1 を過剰発現、またはノックダウンした HUVEC で解析する。

2、 vasohibin-1 をノックダウンした HUVEC に現在、構築中の SIRT1 の発現ベクターを導入することで細胞の老化をレスキューできるか検討する。

3、 vasohibin-1 を過剰発現、またはノックダウンした HUVEC で老化に重要な遺伝子 p21, p16, Rb, ATM/ATR や、 SIRT1 で脱アセチル化される p53, PPAR-γ, FOXOs などについてもタンパクレベルやリン酸化による活性化の変化ウエスタンブロットや免疫染色で検討する。

4、 vasohibin-1 のレトロウイルスベクターを HUVEC に感染させ、 vasohibin-1 を過剰発現し、継代時に倍化時間を計算したり SA-β-gal 染色を行い vasohibin-1 が老化を抑制できるかを検討する。さらに培養中の細胞の形態観察や vasohibin-1、 SIRT1、 p53 などのウエスタンブロットや免疫染色でも評価する。

#### (in vivo の解析)

1、 vasohibin-1 null マウスで胎生致死のマウスについては胎生致死の時期、胎児の形態学的特徴や血管系をはじめ全身臓器の病理学的・免疫組織学的検索を行う。 vasohibin-1 null マウスでうまれてくるものについては外見の形態、各臓器の外見の形態、病理組織学的検索を行う。特に動脈硬化については大動脈を取り出し、それらを oil red O 染色することにより動脈硬化(動脈硬化部位は oil red O 染色で赤く染まる)の進行の評価を行う。さらに申請者が in vitro での実験から得た vasohibin-1 は生存・老化に関与するという結果から、老化に伴って発症が増加するがん、自己免疫疾患、神経変性疾患などの発生についても検討していく。さらに動脈硬化の自然発症マウスである ApoE ノックアウトマウスとの交配も進行中で、現在 vasohibin-1 と ApoE のダブルヘテロマウスが得られており、これらを交配して得られる vasohibin-1 wild, ApoE null マウスと vasohibin-1 null, ApoE null マウスに高脂肪・高カロリー食を与え 8-12 週後に屠殺し、大動脈を取り出し動脈硬化の進行について解析する。さらに動脈硬化部位での

vasohibin-1 や SIRT1 などの免疫組織学的な解析も行う。血液も採取し血中のコレステロール、中性脂肪、血糖などの解析も行う。

2、vasohibin-1 トランスジェニックマウスについてはドキシサイクリンにより Vasohibin-1 の発現を厳密にコントロールできるマウスを作製中である。このマウスは pTre Vasohibin-1 マウスを pTet-On マウスと交配し、Vasohibin-1(+) rtTA-Advanced (+) マウスを得る。この段階のマウスはそれぞれ Vasohibin-1 を高発現しないが、ドキシサイクリンをマウスに与えるとドキシサイクリンが rtTA-Advanced に結合し、その複合体が pTre Vasohibin-1 のプロモーター部位に作用し、Vasohibin-1 を高発現するトランスジェニックマウスとなる。現在、pTet-On マウスは完成しており pTre Vasohibin-1 マウスは genotyping 解析中である。pTre Vasohibin-1 の誕生後、pTre Vasohibin-1 マウスと pTet-On マウスを交配し得られた vasohibin-1 トランスジェニックマウスにドキシサイクリンを与え vasohibin-1 を高発現したマウスと与えない vasohibin-1 を通常量発現しているマウスにおいて vasohibin-1 ノックアウトマウスと同様に動脈硬化進行や、老化に伴って発症が増加するがんなどの発生についても検討していく。vasohibin-1 ノックアウトマウスと同様に動脈硬化進行や、老化に伴って発症が増加するがん、などの発生についても検討していく。ApoE ノックアウトマウスと交配し、vasohibin-1 transgenic, ApoE null マウスと vasohibin-1 wild, ApoE null マウスに高脂肪・高カロリー食を与え 8-12 週後に屠殺し、大動脈を取り出し動脈硬化の進行について解析する。血液も採取し血中のコレステロール、中性脂肪、血糖などの

解析も行う。

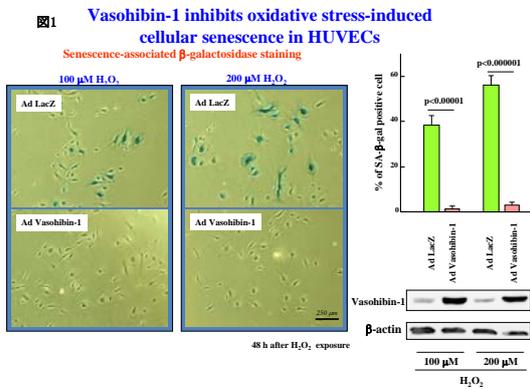
#### 4. 研究成果

vasohibin-1 が過酸化水素水や血清飢餓などの細胞ストレスによる内皮細胞の老化を抑制することを示した (図 1)。SIRT1 [silent information regulator 2 (Sir2)の哺乳類のホモログ]は長寿遺伝子とも呼ばれ酵母と線虫において Sir2 を過剰発現させると寿命が延長し、ノックアウトすると寿命が短縮することが知られている。長寿遺伝子 SIRT1 が HUVEC において vasohibin-1 の発現増加に伴い増加し、逆に vasohibin-1 の発現減少に伴い減少すること (図 2)、SIRT1 の強力な活性物質で赤ワインなどに多く含まれるポリフェノールの一種であるレスベラトロールが vasohibin-1 の発現をノックダウンにより老化した内皮細胞をレスキューすることを示した (図 3)。

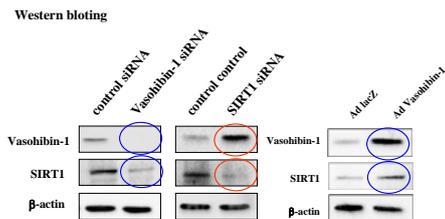
vasohibin-1 の細胞ストレスによる細胞老化抑制作用は SIRT1 をノックダウンすることにより低下することを示した (図 4)。このことから vasohibin-1 は内皮細胞の老化を SIRT を介して抑制することが示唆された。

in vivoの解析ではvasohibin-1ヘテロマウス同士の交配によりvasohibin-1ノックアウトマウスを得ようと試みた。277匹のF1マウスが得られ、wild 32.1%, hetero 61.0%, null 6.9%であった。生まれたnullは外見上は異常はみられなかったが、メンデルの法則より胎生致死が起きていることは明らかであり、今後は胎生致死の時期、血管系をはじめ全身臓器の病理学的・免疫組織学的検索を行う。vasohibin-1と動脈硬化の関連の研究は現在、vasohibin-1とApoEのダブルヘテロマウスが得られており、今後これらを交配して得られるvasohibin-1 null, ApoE nullマウスに高脂肪・高カロリー食を与え動脈硬化の進行について解析する。vasohibin-1トランスジェニッ

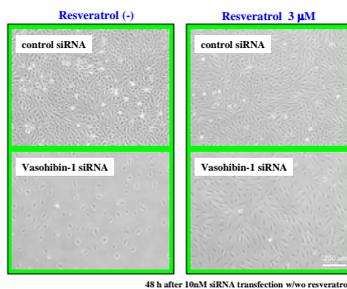
クマウスについてはドキシサイクリンにより Vasohibin-1の発現を厳密にコントロールできるマウスが完成したところである。



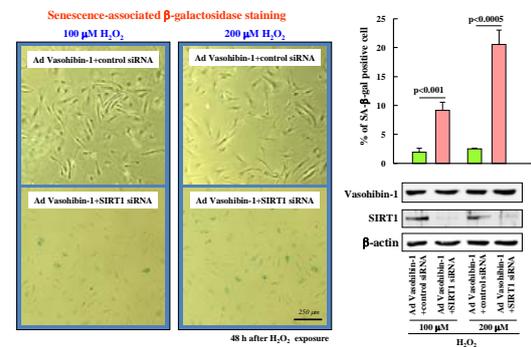
**図2 The relation between Vasohibin-1 and SIRT1 in HUVECs**



**図3 Resveratrol inhibits cellular senescence induced by knock-down of Vasohibin-1 in HUVECs**



**Knock-down of SIRT1 abrogates the protective effect of Vasohibin-1 against stress-induced premature senescence in HUVECs**



## 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)

Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, Kobayashi M, Watanabe K, Sonoda H, Ohta H, Fujiwara T, Shimosegawa T, Sato Y. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood*. 113, 4810-4818. 2009. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

宮下浩輝、佐藤靖史. Vasohibin-1 is involved in the maintenance of vascular endothelial cells 第16回血管生物医学学会 2008年12月1日 金沢

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮下 浩輝 (MIYASHITA HIROKI)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：80302222

### (2) 研究分担者

佐藤 靖史 (SATO YASUFUMI)

東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：50178779

### (3) 連帯研究者

なし