

機関番号：32305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590088

研究課題名（和文）ATP分解酵素 CD39 を標的とした新規血管内皮細胞保護薬の開発に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Basic study for development of a novel therapeutic strategy, targeting the extracellular ATP hydrolyzing enzyme, CD39 to protect from vascular endothelial disorder.

研究代表者 松岡 功（MATSUOKA ISAO）

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：10145633

## 研究成果の概要（和文）：

血管内皮細胞のATP分解酵素ecto-nucleoside diphosphohydrolase1（CD39）の発現は、炎症性サイトカインのIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ で低下し、この反応はステロイド性抗炎症薬では予防できず、かえって悪化した。一方、HMG-CoA還元酵素阻害薬は低分子量G蛋白質Rhoの機能を阻害してCD39の発現を上昇させた。CD39を上昇させ内皮機能を保護するためにはRhoの過剰な応答を制御することが有効であると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Vascular endothelial cells express highly active ecto-nucleoside diphosphohydrolase 1 (CD39) that hydrolyzes extracellular ATP and ADP into AMP. CD39 plays a critical role in the regulation of vascular homeostasis. In this study, we found that various inflammatory cytokines including IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , impaired the ATP hydrolysis and CD39 mRNA expression, whereas HMG-CoA reductase inhibitor (statin) caused time- and concentration-dependent increase in ATP and ADP hydrolysis accompanied by an up-regulation of CD39 mRNA expression. Statin-induced up-regulation of CD39 mRNA expression was involved in an inhibition of small G protein Rho function. These results suggest that the inhibition of Rho-dependent signaling is a promising strategy to increase vascular CD39 expression.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：薬学・生物系薬学

キーワード：心血管、炎症、病態生理、細胞内情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

CD39 (ecto-apyrase, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1)は血管内皮細胞の主要なATP分解酵素で、ecto-5'-nucleotidase (CD73)と共同的に細胞外のATPを効率的にアデノシンに変換する。この過程は、ATP受容

体を介する反応を終結させるだけでなく、アデノシン受容体を介する反応に変換する役割を果たしている。細胞外ATPは、この2つの受容体を介する反応の連係により多様な生理作用を媒介している。さらに、内皮細胞上のCD39は血栓形成の制御でも重要な役

割をはたすと考えられている。しかし、虚血や炎症反応がどのように血管内皮細胞の CD39 活性を低下させるか、また CD39 の酵素活性がどのように制御されるかについても不明である。我々は CD39 は侵襲に関連した液性因子、物理化学的因子により発現調節を受けやすく、この変化の分子機構を解析すれば、CD39 の発現調節メカニズムが解明できると考え本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

血管内皮細胞の CD39 を炎症や酸化ストレスなどの侵襲による機能不全から保護することが心血管障害、炎症性疾患の治療につながると考えられる。しかし、血管内皮細胞の CD39 の酵素活性の調節機構やその遺伝子発現の制御機構は明らかにされていない。本研究では血管内皮細胞の CD39 の酵素活性調節機構、細胞外での動態、運命を調べると共に、遺伝子発現の調節機構の解明を試み、CD39 の遺伝子発現の低下を阻止できる薬物、または発現を亢進する薬物療法が可能か検索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト血管内皮細胞の培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、クラボウより入手し専用培地を用いて炭酸ガス培養機(5% CO<sub>2</sub>)で培養した。培養にはコラーゲンでコートした培養皿を用いた。

### (2) 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)の測定

スライドグラス上に培養した細胞を Fura-2-AM で標識し、蛍光顕微鏡下で 340nm および 380nm の励起光による 510nm の蛍光変化を高速蛍光画像処理システムを用いて記録した。

### (3) 遺伝子発現の解析

細胞から抽出した total RNA からランダムプライマーを用いて cDNA を合成した。各 P2X 受容体、P2Y 受容体および細胞外 ATP 分解酵素に特異的なプライマーを用いて、mRNA 含量をサイバークリーン法の real-time PCR で定量した。サンプル間のばらつきは β-アクチンの mRNA 量で補正した。

### (4) フローサイトメーター解析

薬物を処理した細胞をトリプシン処理で回収し、洗浄後、FITC-標識の抗 CD39 を用いてラベルし、フローサイトメーターを用いて細胞表面蛋白質の発現量を測定した。

### (5) 細胞外アデニンヌクレオチド分解活性の測定

48 穴のマルチプレートに培養し、薬物を処理した細胞に、ATP、ADP および AMP を添加し、37 で種々の時間反応させた。EDTA を最終濃度 10 mM になるように添加し、反応を停止させた。反応液を C18-ODS カラムを装着した HPLC で 260 nm の紫外外部吸収で基質のアデニ

ンヌクレオチドおよびその代謝物を分離・定量して分解を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 血管内皮細胞の ATP 分解酵素活性および ATP 分解酵素遺伝子の発現に及ぼす炎症性サイトカインの作用

HUVEC にインターフェロン(IFN)-γ を 24 時間作用させると、細胞外 ATP 分解酵素の活性が低下した。HUVEC に発現している ATP 受容体および ATP 分解酵素の遺伝子発現の変化を調べた結果、P2X<sub>4</sub> 受容体の発現上昇と共に、CD39 の発現低下が認められた(図1)。さらに、インターロイキン(IL)-1β および腫瘍壊死因子(TNF)-α も細胞外 ATP の分解活性を抑制し、CD39 の mRNA レベルを低下させた(図2)。また、IFN-γ は IL-1β、TNF-α による CD39 の発現低下を増強したが、IL-1β と TNF-α の間には相加作用も認められなかった(図2)。以上のことから、IL-1β、と TNF-α は共通した情報伝達系で、IFN-γ は IL-1β、TNF-α とは異なる機序で CD39 の発現を制御していると考えられた。

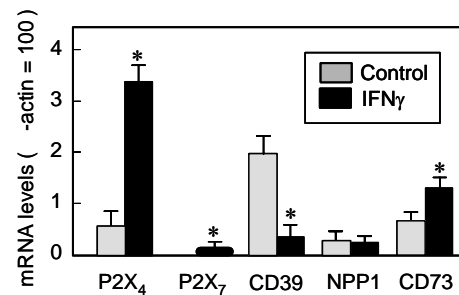


図1 HUVEC の P2X<sub>4</sub> 受容体、P2X<sub>7</sub> 受容体、CD39、NPP1、CD73 遺伝子発現に及ぼす IFN-γ の作用。HUVEC を IFN-g (10 ng/ml) で処理し、RNA を抽出した。遺伝子発現はリアルタイム RT-PCR で測定した。平均±SEM, n = 4-5, \* P>0.05

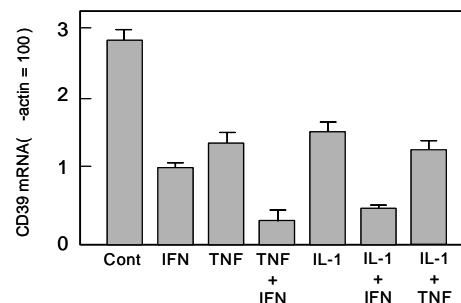


図2 HUVEC の CD39 遺伝子発現に及ぼす IFN-γ、TNF-α、IL-1β の作用。HUVEC を IFN-γ、TNF-α、IL-1β (各 10 ng/ml) で処理し、RNA を抽出した。遺伝子発現はリアルタイム RT-PCR で測定した。平均±SEM, n = 4

(2) 炎症性サイトカインによる CD39 発現低下の作用機

IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$  など炎症性サイトカインの作用は NF $\kappa$ B により核内に伝達され、転写レベルで細胞機能に影響することが知られている。しかし、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$  による CD39 遺伝子発現の低下は、NF $\kappa$ B 阻害薬や、NF $\kappa$ B 経路を阻害するステロイド性抗炎症薬では抑制できなかった。その他、MAPキナーゼ経路(p42/p44 ERK, p38, JMK)の阻害薬、PKC 阻害薬、Src チロシリン酸化酵素阻害薬でも影響されなかった。一方、IFN- $\gamma$ は JAK - STAT 経路を活性化し、炎症性のリモデリングを生じることが知られているが、IFN- $\gamma$ による CD39 発現低下は JAK キナーゼ阻害薬の AG409 や、STAT1 阻害薬の Epigallocatechin gallate で阻害された。以上の結果から、IFN- $\gamma$ は JAK - STAT 経路を活性化して CD39 の機能低下をもたらす。IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$  など炎症性サイトカインは NF $\kappa$ B 以外の経路で CD39 の発現を抑制することが明らかになった。IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$  の作用機序の解明は内皮機能を保護する上で重要な課題であると思われる。

(3) CD39 発現上昇をもたらす因子の解析。

様々なサイトカインや、ホルモンなど生体内の液性因子や、糖代謝や脂質異常を改善する薬物を用いて CD39 の発現上昇をもたらす因子を検討した結果、コレステロール合成を阻害し、高脂血症の治療薬として用いられる HMG-CoA 還元酵素阻害薬が血管内皮細胞の ATP 分解酵素活性を上昇させることを見出した。今回、検討したフルバスタチン(Fluva)、シンバスタチンおよびプラバスタチンともに用量依存的に ATP 分解酵素活性を上昇させた(図3)。

次に、Fluva を用いて、血管内皮細胞の ATP 分解酵素の遺伝子発現に及ぼす作用を検討した。HUVEC には CD39、NPP1 および CD73 の発現が認められた。Fluva を処理した細胞では CD39 の発現が著明に上昇した。また、FITC で標識した抗 CD39 抗体を用いて FACS で解析した結果、フルバスタチンは細胞表面の CD39 発現量を著明に増大させることが認められた(図4)。

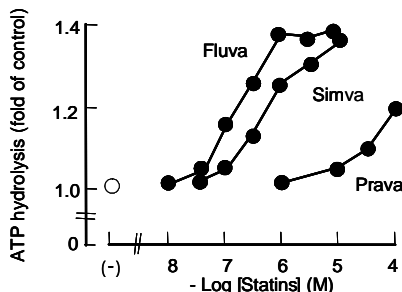


図3 HUVEC の ATP 分解酵素活性に及ぼす HMG-Co-A 還元酵素阻害剤の影響作用。HUVEC を種々の濃度のフルバスタチン(Fluva)、シンバスタチン(Simva)、プラバスタチン(Prava)で 24 時間処理し、ATP 100  $\mu$ M と 10 分間反応させ、分解活性を測定した。

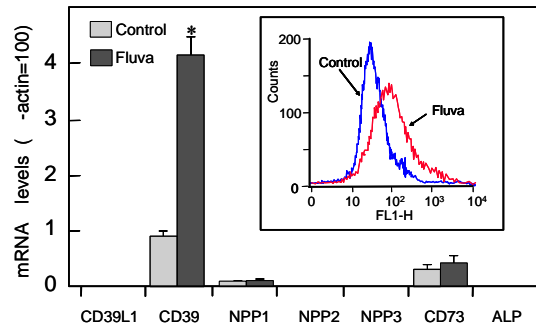


図4 HUVEC の ATP 分解酵素遺伝子発現に及ぼすフルバスタチンの作用。HUVEC を Fluva (1 $\mu$ M) で 24 時間処理し、RNA を抽出した。CD39L1、CD39、NPP1-3、CD39、ALP の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で測定した。mRNA 量は、 $\beta$ -actin の値を 100 として表した。平均 $\pm$ SEM 挿入図: Fluva (1 $\mu$ M) で 24 時間処理した細胞の CD39 表面抗原の変化を FACS で測定した。n = 4、\* P > 0.05

(4) HMG-CoA 還元酵素阻害薬による CD39 の発現上昇機構

Furva を用いて、HMG-CoA 還元酵素阻害剤がどのようにして CD39 の発現上昇を起すか検討した。Fluva による CD39 遺伝子の発現上昇は、時間依存的および用量依存的に顕著になった(図5)。RNA の上昇機構には転写の促進と、mRNA の安定性の増加のいずれかが関与すると考えられる。そこで、RNA 合成阻害薬の DRB を用いて、CD39 遺伝子の細胞内での安定性を測定した結果、CD39 の発現上昇は、Fluva で変化しなかった。一方、核内の RNA を調整し、検討した結果、Fluva により転写活性が上昇していることが認められた。

Fluva による CD39 遺伝子発現の増加はメバロン酸により解除されたことから、HMG-CoA 還元酵素阻害作用に起因すると考えられた。また、このメバロン酸の作用は、ファルネシルピロリン酸ではなく、ゲラニルゲラニルピロリン酸で再現できた。このことから、ゲラニルゲラニルピロリン酸で修飾される低分子量 G 蛋白質、Rho や Rac の関与が考えられた。実際、Rho を阻害する C3 毒素は HUVEC の CD39 遺伝子発現を増加させた。

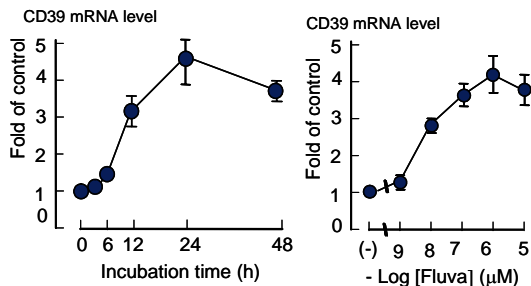


図5 HUVEC の CD39 遺伝子発現に及ぼす Fluva の作用。左: Fluva (1 $\mu$ M) 作用の経時変化。右: Fluva (1 $\mu$ M) の用量作用曲線。平均 $\pm$ SEM, n = 3

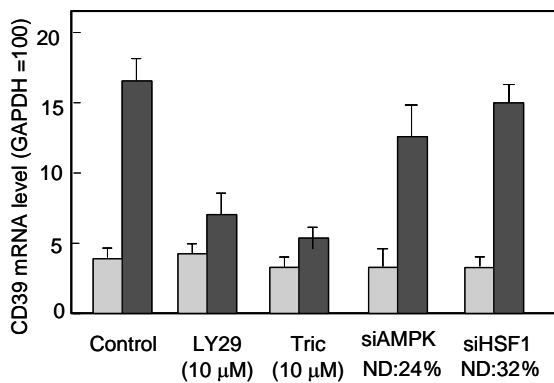


図 6 Fluva の CD39 遺伝子発現上昇に及ぼす LY294002 (LY29)、Triciribine (Tric)、AMP kinase siRNA (siAMPK)、HSF1 siRNA (siHSF1) の作用。HUVEC を薬物で処理し、RNA を抽出した。遺伝子発現はリアルタイム RT-PCR で測定した。siRNA の標的遺伝子ノックダウン (ND) 効率を % で示した。平均  $\pm$  SEM, n = 4-5

HMG-CoA 還元酵素阻害薬は血管内皮細胞において様々な細胞内情報伝達系を活性化させて転写因子の活性を変動させることが報告されている。中でも内皮機能保護に関与することが示唆されているものに、AMP キナーゼ (AMPK) や、熱ショック因子 (heat shock transcription factor 1 [HSF1]) が知られているが、siRNA を用いて AMPK のサブユニットや HSF1 の発現をノックダウンしても Fluva による CD39 の発現上昇は影響されなかった。一方、PI3 キナーゼ阻害薬の LY294002 や、Akt 阻害薬の Triciribine は、Fluva による CD39 の発現上昇を阻害した。以上の結果から、PI3 キナーゼ-Akt シグナル経路が CD39 の遺伝子発現に関与する可能性が示唆された (図 6)。

このような反応は HUVEC だけでなく、動脈由来内皮細胞、微小血管由来内皮細胞でも認められたことから、血管内皮細胞の共通した応答であると考えられた。CD39 は内皮細胞のほかでマクロファージにも発現しているが、その発現はフルバスタチンで影響されず、CD39 発現上昇は内皮細胞に特異的であることも判明した。さらに、炎症性サイトカインによる CD39 の down-regulation とフルバスタチンによる up-regulation は、ラットを用いた in vivo の実験系でも大動脈や腸間膜動脈などの動脈標本において認められた。HMG-CoA 還元酵素阻害薬はコレステロール合成阻害のみならず、様々な因子を介して循環器系疾患の治療、予防に有効であることが示されている。CD39 の発現上昇作用は HMG-CoA 還元酵素阻害薬の多面的作用の重要なメカニズムである考えられる。今後は CD39 の発現上昇を別の機序で活性化できる手段が開発できれば有用な循環器系疾患治療薬になると考えられた。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文、査読有〕(計 7 件)

Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, et al, Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *J Biol Chem* 285, 2010, 4387-4397

Shikama Y, Hu H, Ohno M, Matsuoka I, Shichishima T, Kimura J, Transcripts expressed using a bicistronic vector pIRESHyg2 are sensitized to nonsense-mediated mRNA decay. *BMC Mol Biol* 11, 2010, 42-51

Matsuoka I, Ito M, Negative regulatory mechanism of phospholipase C signaling triggered by G protein-coupled receptor. *日本薬理学雑誌* 134, 2009, 254-258

Maeda S, Sakamoto K, Matsuoka I, Iwamoto T, Kimura J, Lysophosphatidylcholine increases Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger expression via RhoB-geranylgeranylation in H9c2 cells. *J Pharmacol Sci* 109, 2009, 565-572

Kimura J, Ono T, Sakamoto K, Ito E, Watanabe S, Maeda S, Shikama Y, Yatabe MS, Matsuoka I, Na<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup> exchanger expression and its modulation. *Biol Pharm Bull* 32, 2009, 325-331

Tang Y, Matsuoka I, Ono T, Inoue K, Kimura J. Selective up-regulation of P2X<sub>4</sub>-receptor gene expression by interferon- $\gamma$  in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 107, 2008, 419-427

Ito M, Matsuoka I, Regulation of purinergic signaling by prostaglandin E<sub>2</sub> in murine macrophages. *J Pharmacol Sci*, 107, 2008, 443-450

## 〔学会発表〕(計 9 件)

Matsuoka I, Ito M, The P2Y<sub>13</sub> receptors mediate murine macrophage chemotaxis toward extracellular ADP, 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月横浜

Ito M, Matsuoka I, Mode of inhibitory action of Prostaglandin E<sub>2</sub> on UDP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in J774 macrophages. 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月横浜

伊藤 政明、蓬田 伸一、松岡 功、 HEK293 細胞における細胞外 ATP 合成酵素の性質について。

第 122 回日本薬理学会関東部会 2010 年 6 月、静岡

Matsuoka I, Ito M, Yomogida S, Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular endothelial ecto-nucleotidase activities.

第 83 回日本薬理学会年会 2010 年 3 月、大阪

Ito M, Matsuoka I, Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on UDP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in human P2Y<sub>6</sub> receptor expressed 1321N1 cells.

第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月、大阪

Matsuoka I, Ito M

Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced negative regulation of Gq/11-phospholipase C signaling in macrophages

第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 横浜

Ito M, Matsuoka I,

Inhibition of P2Y<sub>6</sub> receptor-induced Ca<sup>2+</sup> signaling by prostaglandin E<sub>2</sub> in murine J774 macrophages.

Fukuoka Purine 2009, 2009 年 7 月, 福岡

Matsuoka I, Ito M, Yomogida S

Regulation of isoprenyl transferase activity by signals from heterotrimeric G protein-coupled receptors.

The XXXVI international congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月, 京都

松岡功、伊藤政明、蓬田伸一、ATP 受容体を介する細胞応答における細胞外 ATP 分解酵素 Nucleotide triphosphate diphosphohydrolase 1 の役割  
第 118 回日本薬理学会関東部会, 2008 年 6 月, 東京

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.takasaki-u.ac.jp/dept/yaku/labo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡 功 (MATSUOKA ISAO)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号:10145633

(2)研究分担者

蓬田 伸一 (YOMOGIDA SINNICHI)

高崎健康福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号:90250802