

血管壁の増殖、細胞死に関わる **thrombospondin**  
遺伝子の機能と情報伝達  
(研究課題番号 1 1 6 7 0 6 8 3)

平成 1 1 年度～平成 1 2 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C) (2))  
研究成果報告書

平成 1 3 年 3 月  
研究代表者 新 宮 哲 司  
(広島大学医学部助手)

血管壁の増殖、細胞死に関わる **thrombospondin**

遺伝子の機能と情報伝達

(研究課題番号 1 1 6 7 0 6 8 3)

平成 1 1 年度～平成 1 2 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C) (2))

研究成果報告書

平成 1 3 年 3 月

研究代表者 新 宮 哲 司

(広島大学医学部助手)

## はしがき

Thrombospondin (TSP) は、分子量約 145kDa の分子が 3 量体を形成する糖蛋白である。TSP は、これまでヒトおよびマウス他で TSP1, 2, 3, 4, 5 遺伝子がクローニングされており、その遺伝子構造が決定され、TSP ファミリーと近年提唱されるようになった。TSP3, 4, 5 については、蛋白構造が TSP1 および TSP2 とは異なりその機能についてはほとんど未知である。一方、TSP1 および TSP2 は転写調節機構は異なるが、蛋白構造が類似し、その機能について多くの報告を認めるようになった。特に、TSP1 については血小板の  $\alpha$  顆粒に多く存在することから、血液凝固系における一つの補助因子であることがこれまでの多くの研究で明らかになった。ここ近年分子生物学的手法が発達してきたことにより、TSP1 は血小板のみならず、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、単球、マクロファージなど、多くの細胞でその産生が認められ、多機能を有することが考えられるようになった。その中で近年注目されているのは、TSP1、TSP2 の血管新生抑制作用である。

虚血性心疾患は多因子がからむ生活習慣病であり、その危険因子として喫煙、高脂血症、高血圧症、糖尿病などがある。それらの危険因子によって作られる血管内環境状態が標的臓器である血管に影響を及ぼし、血管内皮細胞傷害、血管平滑筋細胞の遊走、増殖、単球からマクロファージへの分化、遊走をきたし、動脈硬化病変が形成されていくことが一般的に認められている。いわゆる Ross らが提唱している動脈硬化症の血管傷害反応説である。この一連の傷害反応の過程において、TSP1 は血管平滑筋細胞に対し、増殖的に作用することが報告されているが一定の見解はなく、また血管内皮細胞に対する機能については不明な点が多い。血管内皮細胞上には TSP1 のレセプターである CD36、 $\alpha$ v $\beta$ 3 インテグリンの発現が認められており、TSP1 の血管新生抑制作用をあわせ考えると、TSP1 は循環器領域、特に動脈硬化症においても血管内皮細胞に対し何らかの機能を有していることが考えられる。

血管内皮機能、あるいは血管平滑筋細胞については、循環器領域の多くの研究者により、多方面から解析されてきている。そのなかにおいて、血管

壁細胞、特に血管内皮機能に及ぼす TSP の影響が明らかにされることで、動脈硬化症、高血圧症をはじめとする循環器領域における血管疾患の病態解明ひいては治療に貢献できるのではないかと期待している。

最後に、ワシントン大学生化学時代に TSP のクローニングとその転写調節の解析に従事でき、現在循環器領域における TSP の機能解析に携わることができるのは、ワシントン大学生化学の Paul Bornstein 教授の協力がなければできないことであり、また血管内皮細胞機能については教室の高血圧研究グループの諸先生方のアドバイスを受け、他にも内外の多くの諸先生方に御指導、御協力を頂き、深謝をしている。この場を借りて御礼申し上げる。

## 研究組織

研究代表者：新宮哲司	(広島大学医学部助手)
研究協力者：梶山梧朗	(広島大学名誉教授)
大島哲也	(広島大学医学部助教授)
松浦秀夫	(広島大学医学部附属病院講師)
山形東吾	(広島大学医学部助手)
小園亮次	(広島大学医学部助手)
片野高広	(広島大学医学部大学院)
桑島利江子	(広島大学医学部大学院)
武生英一郎	(広島大学医学部研究生)
勝本征行	(広島大学医学部研究生)
林 幸三	(簡保ヘルスプラザ総合検診センター所長)
大村裕子	(広島大学医学部事務補佐員)

## 研究経費

平成11年度	3,400 千円
平成12年度	400 千円
計	3,800 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

#### 英文原著

1. Ryoji Ozono, Toshiyuki Matsumoto, Tetsuji Shingu, Tetsuya Oshima, Yasuhiro Teranishi, Masayuki Kambe, Hideo Matsuura, Goro Kajiyama, Zhi-Qin Wang, Alan F. Moore, Robert M. Carey. Expression and localization of angiotensin subtype receptor proteins in the hypertensive rat heart. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278: R781-R789, 2000
2. Yuji Yasunobu, Kozo Hayashi, Tetsuji Shingu, Togo Yamagata, Goro Kajiyama, Masayuki Kambe. Coronary atherosclerosis and oxidative stress as reflected by autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and oxysterols. *Atherosclerosis* 155: 445-453, 2001
3. Rieko Kuwashima, Takahiro Kuwashima, Eiichiro Takeo, Masayuki Katsumoto, Yasushi Toyota, Kozo Hayashi, Hideo Matsuura, Tetsuji Shingu. Thrombospondin 1 induces apoptosis of human endothelial cells (HUVECs) through activation of p38 mitogen activated protein kinase (MAPK). *J. Am. Coll. Cardiol.* 37 (Suppl. A): 283A, 2001

#### 和文原著・総説

1. 片野高広、新宮哲司、桑島利江子、豊田康嗣、武生英一郎、大田和子、勝本 征之、松浦秀夫、梶山梧朗、林 幸三 7-ketocholesterol は p38 mitogen-activated protein kinase を介して血管内皮細胞にアポトーシスを誘導する *THERAPEUTIC RESEARCH* 21・10 : 2361-2368, 2000
2. 桑島利江子、新宮哲司、松浦秀夫 各種降圧薬の脂質代謝・動脈硬化への影響 利尿薬 *The Lipid* 12・1 : 37-42, 2000

### (2) 口頭発表

#### ・国際学会

1. Eiichiro Takeo, Hiroshi Yoshida, Tetsuji Shingu, Takahiro Katano, Rieko Kuwashima, Yasushi Toyota, Hideo Matsuura, Goro Kajiyama. Sweet elements of Siraitia

- grosvenori inhibit oxidative modification of low density lipoprotein. First conference on Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Omni Interlocken Hotel, Denver, Colorado, May 20-22, 2000
2. Takahiro Katano, Tetsuji shingu, Rieko Kuwashima, Yasushi Toyota, Eiichiro Takeo, Hideo Matsuura, Goro Kajiyama, Kozo Hayashi. 7-ketocholesterol induces apoptosis of human endothelial cells by activating p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). First conference on Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Omni Interlocken Hotel, Denver, Colorado, May 20-22, 2000
  3. Rieko Kuwashima, Takahiro Kuwashima, Eiichiro Takeo, Masayuki Katsumoto, Yasushi Toyota, Kozo Hayashi, Hideo Matsuura, Tetsuji Shingu. Thrombospondin 1 induces apoptosis of human endothelial cells (HUVECs) through activation of p38 mitogen activated protein kinase (MAPK). 50th Annual Scientific Session, American College of Cardiology, Orange Convention Center, Orlando, Florida, March 18-21, 2001

・国内全国総会

1. 片野高広、林 幸三、新宮哲司、安信祐治、久賀祥男、武生英一郎、大田和子、野村克彦、豊田康嗣、松浦秀夫、梶山梧朗 培養血管内皮細胞に対する oxysterols の apoptosis 誘導能の検討 平成11年度(第31回)日本動脈硬化学会総会 ワールドコンベンションセンターサミット 宮崎、平成11年6月24日・25日
2. 野村克彦、山形東吾、村岡裕司、寺川宏樹、平尾秀和、福田幸弘、武生英一郎、片野高広、豊田康嗣、林 幸三、新宮哲司、松浦秀夫、梶山梧朗 冠攣縮性狭心症患者における冠表在血管および冠抵抗血管の低用量アセチルコリンへの反応性の特徴について 平成11年度(第31回)日本動脈硬化学会総会 ワールドコンベンションセンターサミット 宮崎、平成11年6月24日・25日
3. 豊田康嗣、林 幸三、武生英一郎、野村克彦、片野高広、大田和子、新宮哲司、平賀敬己、大谷晴美、松浦秀夫、梶山梧朗、神辺真之、佐藤俊孝 CETP 遺伝子 TaqIB 多型の血清 CETP および脂質に及ぼす影響 平成11年度(第31回)日本動脈硬化学会総会 ワールドコンベンションセンターサミット 宮崎、平成11年6月24日・25日

4. 武生英一郎、新宮哲司、豊田康嗣、片野高広、桑島利江子、大田和子、松浦秀夫、梶山梧朗、久賀祥男、林 幸三 ウサギ内膜障害モデルにおけるプラバスタチンの新生内膜肥厚抑制効果について～組織 ACE 活性との関係～ 平成11年度日本動脈硬化学会冬期大会 ワールドコンベンションセンターサミット 宮崎、平成11年11月25日・26日
5. 片野高広、新宮哲司、桑島利江子、豊田康嗣、武生英一郎、大田和子、松浦秀夫、梶山梧朗、林 幸三 7-ketocholesterol の培養血管内皮細胞における apoptosis 誘導シグナルの検討～p38 MAPK 活性化の関与について 平成12年(第32回)日本動脈硬化学会総会 東京ベイホテル東急 東京、平成12年6月1日・2日
6. 武生英一郎、吉田 博、新宮哲司、豊田康嗣、片野高広、桑島利江子、大田和子、松浦秀夫、梶山梧朗 羅漢果エキスの抗酸化作用について 平成12年(第32回)日本動脈硬化学会総会 東京ベイホテル東急 東京、平成12年6月1日・2日
7. 安信祐治、加藤芳朗、新宮哲司 各種疾患を有する高齢者における血清脂質、その他動脈硬化危険因子についての検討—頸部超音波を用いて 平成12年(第32回)日本動脈硬化学会総会 東京ベイホテル東急 東京、平成12年6月1日・2日

・国内全国研究会

1. 片野高広、新宮哲司、桑島利江子、豊田康嗣、武生英一郎、大田和子、勝本征之、松浦秀夫、梶山梧朗、林 幸三 7-ketocholesterol、25-hydroxycholesterol による血管内皮細胞の apoptosis 誘導情報伝達系の検討 第5回高血圧と動脈硬化研究部会 サンケイ会館 サンケイホール(5F) 東京、平成12年6月3日

## 研究成果

### 【目的】

#### ①科学研究費の交付を希望する期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

平成7年度より行ってきた「Thrombospondin (TSP) 遺伝子の血管壁細胞における機能」という研究課題について追試を行う。これまでの研究では、血管平滑筋細胞として A10 細胞を用い、内皮細胞として HUVEC を用いて検討し、TSP1 は平滑筋細胞では増殖を促進し、内皮細胞では抑制することが遺伝子導入実験によっても判明した。しかし、TSP2 の血管壁細胞における機能については未だ明らかではない。本研究期間では、TSP の血管平滑筋細胞・内皮細胞における上記の機能を引き続き TSP 遺伝子過剰発現細胞を用いることによって追試する。特に TSP1 の血管内皮細胞における増殖抑制機能に注目し、それが近年細胞増殖制御機構の主流と考えられているアポトーシス（細胞死）によるものかいなかを解明する。また、平滑筋細胞では増殖促進、内皮細胞では増殖抑制という相反する機能を有し、各細胞種での TSP1 の及ぼす情報伝達機構への影響が異なることが考えられる。そこで、TSP1 遺伝子過剰発現血管平滑筋細胞、内皮細胞を用いそれぞれの細胞内における増殖系シグナルあるいはアポトーシス関連シグナルの発現と活性について検討する。

#### ②当該分野におけるこの研究計画の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

TSP1 (TSP2) 遺伝子の血管壁内での諸機能を総合して解明しようとするところに学術的な特色がある。本研究ではこれまでの研究成果を基盤に、特に TSP1 の血管内皮細胞における増殖抑制機能に注目し、その増殖抑制機能をアポトーシス誘導作用という最近の観点から捉えようとするところ、また増殖促進と増殖抑制（アポトーシス）の相反する機能を情報伝達機構の相違として捉えようとするところに独創的な点があると考えられる。予想される結果とし、これまでの研究成果の検証として、TSP1 は血管平滑筋細胞においては増殖を促進させ、増殖促進シグナルとして、インテグリン $\alpha v\beta 3$  を介した FAK (Focal Adhesion Kinase) のリン酸化から Ras-MAPK のリン酸化経路の活性化が予想される。ま

た、血管内皮細胞においてはアポトーシスが誘導され、そのレセプターおよびシグナル経路の中核側は不明だが、PI3 kinase の活性化が考えられ、おそらく末梢では CPP32 の活性化が予測される。しかし、TSP1 には TGFβ1 活性化機能があり、二相性作用を示す活性型 TGFβ1 濃度に留意する必要があると考えられる。

### ③国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

TSP 遺伝子ファミリーは今日まで 5 遺伝子がクローニングされ、研究代表者も TSP1, 2, 3 のクローニングの研究に従事してきた。ここ約 5 年間で TSP1 の機能については各分野で明らかにされつつあり、特に腫瘍学の分野では重要な役割を担っていることが判明してきた。すなわち、TSP1 は腫瘍の浸潤、転移に抑制的に機能しているのではないかと考えられている。その基盤となっている研究は、TSP1 が血管新生を抑制するという研究成果である。研究代表者はそれを血管内皮細胞における機能として増殖抑制として捉え、本研究ではそれをアポトーシスの誘導として検証しようとしている。また、その情報伝達機構においては、内皮細胞の細胞間接着を TSP1 が抑制し、その情報伝達シグナルに PI3 kinase の活性化が報告されている。本研究ではその研究成果をアポトーシスに応用し、PI3 kinase の活性化とともにアポトーシスの末梢シグナルである CPP32 の活性化を測定することで TSP1 のアポトーシス誘導機能を立証する。

### 着想に至った経緯

1. 1991 年から 1994 年の間に TSP1, 2, 3 のクローニング、および転写調節の解析に従事した。
2. 培養内皮細胞、腫瘍において TSP1 あるいは TSP2 が血管新生を抑制することと、動脈硬化病変の進展に内皮細胞傷害が引き金となることに、TSP1 あるいは TSP2 が内皮細胞に対して抑制的に作用することの共通性を考えた。
3. 培養平滑筋細胞において TSP1 は増殖的に作用することも加味すると、TSP1 は動脈硬化病変に対して、負の方向に作用している可能性があるのではないかと考えた。
4. 動脈硬化病変の病態に TSP 遺伝子がいかに関与しているかを解明することにより、動脈硬化の予防あるいは成立した動脈硬化病変の進展抑制に対す

る一つの治療法の開発につながるのではないかと考えた。

## 【方法】

### 1. 発現ベクターの作製

- 1) プラスミド発現ベクター：マウス TSP1 および TSP12 の cDNA を pBK CMV (Stratagene) に組み込んだ。
- 2) アデノウィルス発現ベクター： pcDNA3(Invitrogen)の発現プラスミドベクターに wild type あるいは mutant TSP1 cDNA を一旦組み込み、CMV プロモーターと共に再び TSP1 cDNA を切り出した。pXCJL-2 に CMV promoter-TSP1 cDNA の発現ユニットを組み込み、E1, E3 欠損 Ad5pJM17 と共に 293 細胞に Cotransfection し、組み換え Adenovirus 粒子を作製する。(pXCJL-2, pJM17 共に Microbix 社、カナダ)

### 2. Mutant vector の作製

ジスルフィド結合により 3 量体を形成している 2 つのシステインをグリシンに変異させた遺伝子断片を PCR 法より作製した。Sequencing により変異を確認した。上記 pBK CMV 発現ベクターあるいは pXCJL-2 に組み込む。

### 3. 細胞培養

ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC)

ウシ大動脈由来内皮細胞 (BAEC)

サブコンフルエントに培養した細胞に用量依存的に発現ベクターあるいは TSP1 蛋白を添加、あるいは時間経過実験では発現ベクター $10^9$  pfu/ml,  $5 \mu\text{g/ml}$  ( $10 \text{ nM}$ ) TSP1 蛋白を添加した。また、p38 MAPK の阻害剤、SB203580 ( $10 \mu\text{M}$ ) は 30 分前に添加した。アポトーシス検出は、24 時間培養後、細胞内情報伝達系の評価実験では示された時間経過培養後、細胞質抽出を行った。

### 4. 遺伝子導入法

- 1) プラスミド発現ベクター：Lipofectin, Lipofectamin (いずれも GIBCO-BRL) を用いて導入した。
- 2) アデノウィルス発現ベクター：感染導入。

## 5. 過剰発現の確認

導入遺伝子の過剰発現確認のため、Alk-Phos™ 検出システム(Amersham)を用いた non-RI Northern blot 法により mRNA を、ECL™ Western blotting 検出システム (Amersham)を用いて蛋白を評価した。

## 6. 導入効率の測定

プラスミド発現ベクターの導入実験の場合、実験毎に pGL3 あるいは pCMV βgal を共同導入し導入効率を補正する。pGL3 では Luciferase Assay System (Promega)を用い試料を調整し、ルミノメーターにより測定する。pCMV βgal ではβ-galactoside を基質にしてβ-galactosidase 活性を吸光度計で測定する。

## 7. 細胞増殖能

細胞数を WST-1 Cell Counting Kit (Dojin)を用い、また DNA 合成をビオチン標識 BrdU (Roche) の取り込みにより評価する。

## 8. アポトーシス

細胞より DNA を抽出し、TACS APOPTOTIC DNA LADDERING KIT (TREVIGEN)によりビオチン標識後、アガロースジェルで展開、DNA Ladderを検出し、UV サンプル撮影解析装置 FasIII+DF20+Quantity One (TOYOBO)で解析した。また、DNA fragmentation の定量評価を Burton の変法あるいは抗ヒストン抗体を用いた Cell Death Detection キット (Roche) により行った。

## 9. 細胞内情報伝達

- 1) p42/44 MAPK 活性 (リン酸化 p42/44 MAPK) : 細胞抽出液を抗 p42/44 MAPK 抗体で免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロッティングを行った。
- 2) Akt-1 活性 (リン酸化 Akt) : 細胞抽出液を抗リン酸化 Akt を用いてウエスタンブロッティングを行った。
- 3) p38 MAPK 活性 : 細胞抽出液を抗 p38 MAPK で免疫沈降し、ATF-1 を基質として反応後、ウエスタンブロッティングを行った。

## 10. 役割分担

発現ベクターの作製、細胞培養、遺伝子導入、アポトーシスの検出、総括 : 新宮 哲司  
細胞内情報伝達の評価 : 片野高広

### 【研究結果の概要】

1. 培養内皮細胞 (HUVECs) においては stable transfection cells は作製不可能であった。
2. Transient transfection において Lipofectin および Lipofectamin を用いてプラスミド発現ベクターを導入したが、導入効率がいずれも 20%以下であった。(Figure 1)
3. TSP1 蛋白添加により、TSP1 は HUVECs においてアポトーシスを誘導した。(DNA ladder; Figure 2, TUNEL; Figure 3 a & c)
4. TSP1 蛋白添加によるアポトーシス誘導は用量依存性であった。(Cell Death Detection キットを用いた定量評価; Figure 4)
5. TSP1 蛋白添加により、リン酸化 Akt は増加した。(Figure 5)
6. TSP1 蛋白添加により、リン酸化 p42/44 は不変であった。(Figure 6)
7. TSP1 蛋白添加により、p38 MAPK は 5 ~ 10 分で誘導され、120 分まで持続していた。(リン酸化 ATF-2; Figure 7)

### 【研究結果に対する結論】

今回の研究結果から、TSP1 は血管新生、あるいは内皮細胞に対して抑制、障害を及ぼし、その現象がアポトーシスにより引き起こされることが明らかとなった。そのアポトーシス誘導作用の細胞内情報伝達に、p38 MAPK の活性化が少なくとも一部には関与していることが判明した。しかしながら、研究開始当初認められた p38 MAPK と p42/44 MAPK とのクロストークは再現性が認められなかった。また、内皮細胞においては増殖系細胞内情報伝達の一つである p42/44 MAPK の活性は認められなかったが、survival signal の一つとされている Akt の活性を上昇させた。これらの結果は、TSP1 は血管内皮細胞においては増

殖系に作用することはなく、障害性に作用し、その二次的応答として survival signal の一つである Akt が活性化されるのではないかと考えられた。

#### 【今後の研究の展開に関する計画】

1. TSP1 は血管内皮細胞においても産生されており、パラクリン、オートクリン的に作用していることが想定される。従って、今回の実験結果は主として蛋白添加実験であるため蛋白産生以降の細胞内制御を無視している。それらを解決するために、プラスミド発現ベクターを用いることは不適切であることが判明したため、出来るだけ早くアデノウィルス発現ベクターを用いた実験系を確立することが必死と考えられる。それにより変異ベクターの導入も可能となり、TSP1 の欠損下における内皮細胞機能が評価可能となる。
2. 今回の検討では、細胞死の情報伝達機構で p42/44 MAPK、Akt-1、p38 MAPK のいわゆる中流領域のシグナルしか検討できていない。細胞死に p38 MAPK を介することが判明したので、今後 caspase カスケードを含めた下流領域あるいは受容体近傍の上流領域の検討も必要と考えられる。
3. TSP1 蛋白構造上には細胞結合部位がいくつか存在することが報告されており、単一受容体により TSP1 の機能は説明できないことが考えられる。その中でも、TSP1 蛋白の構造上、CD36 結合部位、N 末端のプロテオグリカン結合部位および $\alpha v \beta 3$  インテグリン結合部位が、血管内皮細胞において存在し、細胞死の誘導に関連する受容体の決定およびそれら受容体の活性化がどのような情報伝達を介して機能を発揮するかを検討する必要がある。
4. 最終的には TSP1 を含めた TSP 遺伝子ファミリーが動脈硬化性疾患の病態解明、あるいは広く血管新生に関係する疾患の病態解明において如何に関わっているだけでなく、それら疾患の治療開発にいかに応用すべきかを検討する必要がある。

Figure 1

Transfection of pBK CMV/TSP1 cDNA (2 mg/ml) with pCMV bgal (2 mg/ml). Transfected cells are stained as blue. 2ml of Lipofectamin and 20 ml of PLUS Reagent were added in serum free medium and incubated for 3 hours for transfection. Transfection efficiency was about 10%.

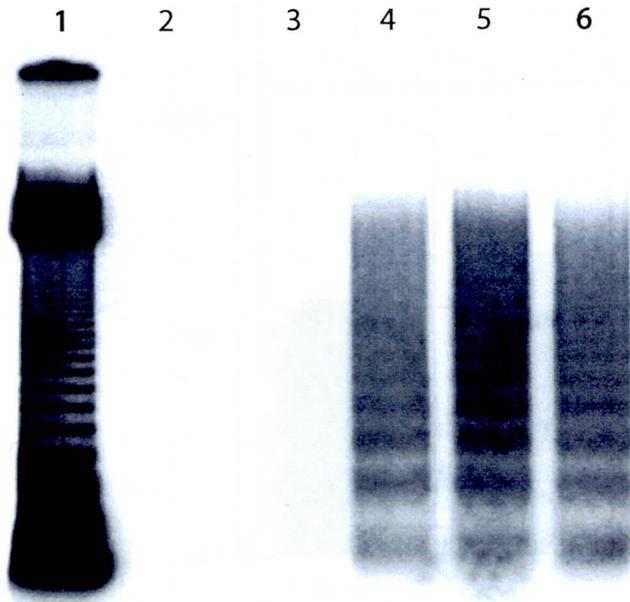


Figure 2

DNA fragmentation in HUVECs in response to TSP1.

lane

- 1: Maker
- 2: No TSP1
- 3: 1 µg/ml TSP1
- 4: 2 µg/ml TSP1
- 5: 5 µg/ml TSP1
- 6: 10 µg/ml TSP1

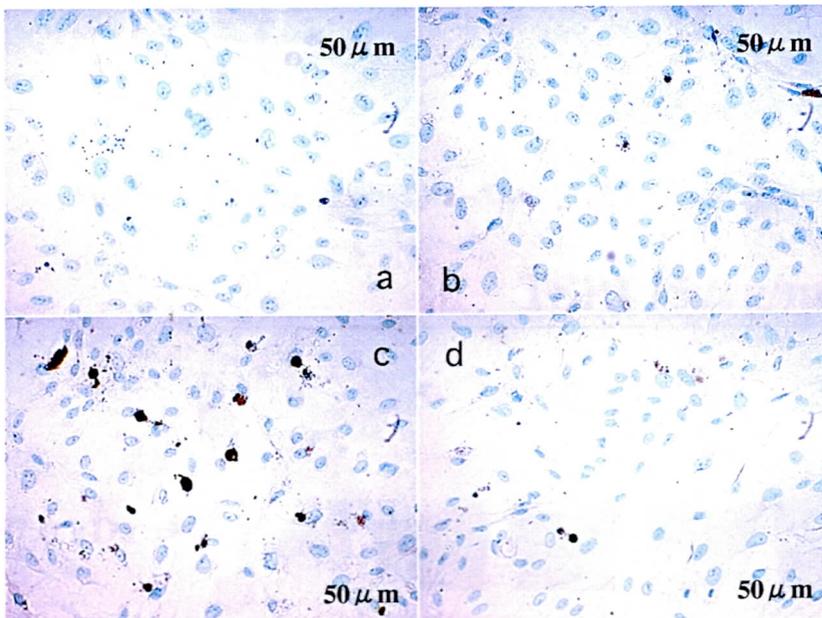


Figure 3

Induction of apoptosis in HUVECs by 5 µg/ml of TSP1.

- a: No TSP1
- b: SB203580 (10 µM)
- c: 5 µg/ml of TSP1
- d: TSP1+SB203580

Figure 4 Induction of apoptosis in HUVECs in dose-response to TSP1

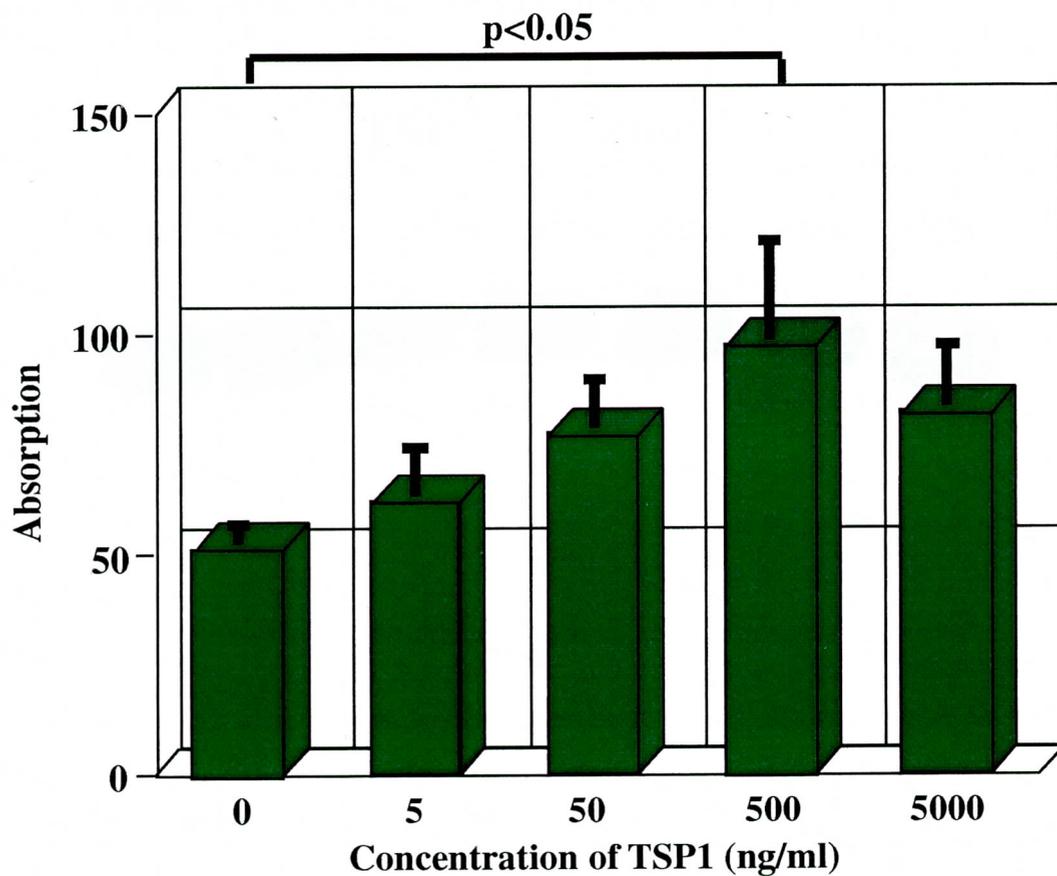


Figure 5 Change in phospho-Akt of HUVECs in response to TSP1

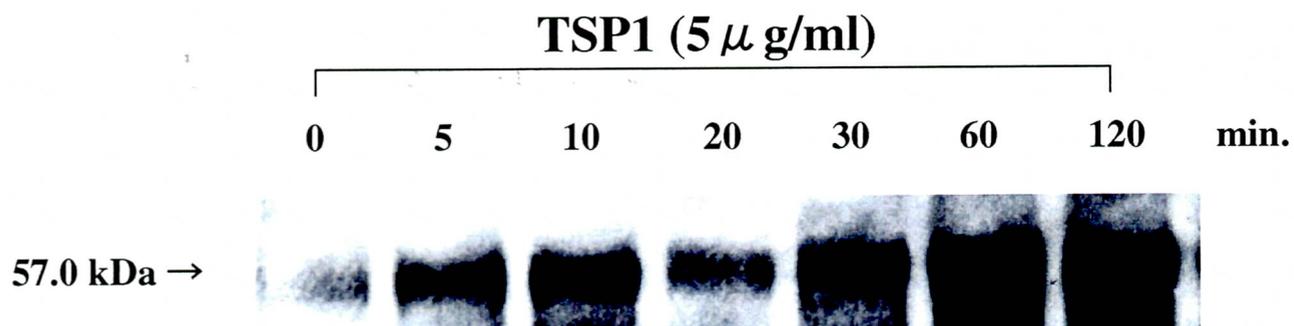


Figure 6 Change in phospho-p44/42 MAPK of HUVECs in response to TSP1

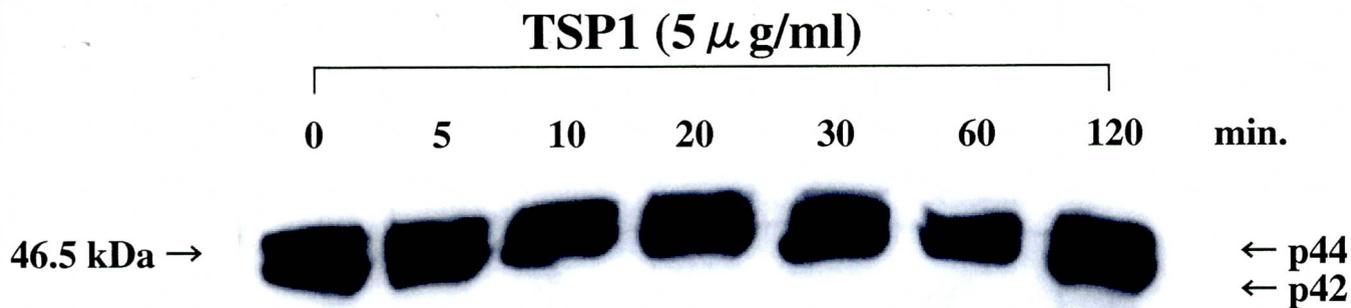


Figure 7 Change in p38 MAPK activity of HUVECs in response to TSP1

