

ResveratrolのHepG2細胞での plasminogen activator inhibitor-1 発現に与える影響

宮崎(廣戸)美絵¹, 津田 博子², 石橋 源次¹

¹九州女子大学家政学部栄養学科, ²中村学園大学大学院栄養科学研究科

Effects of resveratrol on expression of plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 cells

Yoshie HIROTO-MIYAZAKI, Hiroko TSUDA, Genji ISHIBASHI

Abstract

The aim of this study was to investigate whether resveratrol affects plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in HepG2 cells, a human hepatoma cell line. Results obtained with real time RT-PCR analysis showed that resveratrol increased PAI-1 mRNA expression to 15.5-fold, and decreased protein S (PS) mRNA expression to 0.2-fold of control. Our study strongly suggests that resveratrol tends to possess pro-coagulant activity from the fact that it up-regulates the expression of anti-fibrinolytic factor, PAI-1, and down-regulates the expression of anti-coagulant factor, PS.

Keywords: resveratrol, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), protein S (PS)

1. はじめに

近年、生活習慣病にともなう血栓症発症の鍵を握る蛋白として、血管内皮細胞や脂肪細胞で産生・分泌される線溶阻害因子plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) が注目されている。PAI-1発現の上昇は、糖尿病患者で問題となるインスリン抵抗性やレニン・アンジオテンシン系の活性化による高血圧と正の相関がみられることから、PAI-1発現抑制は生活習慣病を背景とする血栓症発症を減少させると考えられている^{1,2)}。日本人ではprotein C (PC) 凝固制御系の主要因子であるprotein S (PS) の分子異常による血栓症発症頻度が高いことが報告されているが、PS分子異常者で必ずしも血栓症が発生すると限らないことから、生活習慣を含む環境要因が血栓症発症に深く関係していると考えられている^{3,4)}。食生活を含む生活習慣が関与しているPAI-1とPC凝固制御系だが、その両方に着目した検討や食(食成分)がこれらに及ぼす影響についての報告は少ない。

ブドウ果皮に含まれ赤ワイン中の主要なポリフェノールであるresveratrolは、高脂肪食にかかわらずフランスのように赤ワイン消費量の高い国では冠動脈疾患 (CHD) による死亡数が少ないことの鍵を握る成分として注目され、抗動脈硬化成分として広く認知されている⁵⁾。我々は、resveratrolがPC凝固制御系のなかでPS発現を特異的に転写レベルで抑制することを報告した⁶⁾。

そこで今回は、PAI-1 mRNA発現解析法を確立し、肝細胞でのPAI-1 mRNA発現へのresveratrolの影響を検討することとした。

2. 実験方法

2.1 細胞培養

ヒト肝癌由来株化肝細胞HepG2は理研ジーンバンク (Tsukuba, Ibaragi) から購入した。HepG2細胞 (8.0×10⁵ cells/dish) を60 mm culture dish (BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA) に撒き、10 μg/mL vitamin K1、10% FBS、100 U/mL penicillin、100μg/mL streptomycinを加えたDMEM培地で1日間培養した。FBSを除外したDMEM培地に交換し1日培養後、実験に供した。

2.2 Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

HepG2細胞からtotal RNAをRNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出し、DNase I (RNase-Free DNase Set, QIAGEN)処理を行った。次に、total RNA 1.0μgをoligo dT primer 25 pmol、random 6 mers 50 pmol、PrimeScript Buffer (dNTP mixture、Mg²⁺を含む)、PrimeScript RT Enzyme Mix I (TaKaRa Bio Inc., Ohtsu, Shiga) を含む反応液20・1中で37℃ 15分、85℃ 15秒反応させcDNAを合成した。ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECのcDNAは中川和憲講師 (九州大学大学院医学研究院病理病態学) から提供された。

cDNA 2 μ lを0.4 M sense primer、0.4 M antisense primer、SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa) を含む23 μ lの反応液に添加し、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いて、95 $^{\circ}$ C 5秒、49 $^{\circ}$ C 60秒の反応サイクルを40サイクル行った。用いたprimerは

PS:5'-CCTACTATCCTGGTTCTGGAATTG-3' (sense)、5'-GCACTGTGTTGTTACCAGAAACC -3' (antisense)、 β -actin : 5'-CTGGACTTCGAGCAAGAGAT-3' (sense)、5'-CGTCACACTTCATGATGGAG-3' (antisense)、PAI-1 primer (表1) であり、株式会社ジーンネット (Fukuoka, Fukuoka) に依頼して作成した。目的遺伝子の発現量は内部標準物質 β -actinを用いて標準化した。

2.3 Real time PCR産物の確認

Real time PCR産物を5% polyacrylamide gelで電気泳動後、染色し、LAS-3000で撮影後にサイズを確認した。

2.4 統計処理

実験データは平均値 \pm 標準偏差で表した。値のばらつきは標準偏差を平均値で除して%表示した変動係数 (CV) で評価した。平均値の差の検定は一元配置分散分析後、Dunnett法による多重比較検定を行った。解析にはSPSS統計パッケージ(Ver. 17.0 J)を使用し、危険率 $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

3. 実験結果

3.1 Real-time RT-PCR法によるPAI-1 mRNA発現解析系の確立

HepG2のPAI-1 mRNA発現解析を行うために、表1に示すような3種類のprimer pairを設計しreal time PCR法の確立を試みた。血管でのPAI-1発現に比べ肝臓では低いことが報告されていることから⁷⁾、HUVECのcDNAをpositive controlとして用いた。Real-time RT-PCR法は、PCR産物量を測定しCt値を求めて増幅速度論に基づきmRNAから合成したcDNA量の定量解析を行う方法である。cDNA量が多いとCt値は小さくなり、cDNA量が少ないとCt値は大きくなる。また、融

表1 PAI-1 primer配列

Name	Primers	Nucleotide numbers	Base pairs
primer I	5'-CCACTTCTTCAGGCTGTTCC-3' (S)	550-569	256
	5'-AGTGCTGCCGTCTGATTTGT-3' (A)	550-569	
primer II	5'-TGCCCATGATGGCTCAGA-3' (S)	813-830	84
	5'-GCAGTTCAGGATGTCGTAGTAATG-3' (A)	896-872	
primer III	5'-TCCAGCAGCTGAATTCCTG-3' (S)	64-82	102
	5'-GCTGGAGACATCTGCATCCT-3' (A)	165-146	

解曲線分析により増幅産物の確認を行うことができ、特異的な単一の断片が増幅している場合には、通常、融解曲線はシングルピークとなる。

3.1.1 Primer Iによる検討

Primer Iを用い95 $^{\circ}$ C 30秒処理後、95 $^{\circ}$ C 5秒、49 $^{\circ}$ C 60秒の反応サイクルを40サイクル行った。HUVECとHepG2の増幅曲線やCt値 (HepG2 : 34.0, HUVEC : 34.3) に差はなく、融解曲線では複数のピークがみられた。PCR後に反応溶液をゲル電気泳動に供したが、PCR産物は確認できなかった。さらに、アニーリング温度を49 $^{\circ}$ Cから60 $^{\circ}$ Cに変更して検討したが、同様の結果となった (データ示さず)。

3.1.2 Primer II、primer IIIによる検討

Primer II、primer IIIを用いPCR反応 (95 $^{\circ}$ C 30秒処理後、95 $^{\circ}$ C 5秒、X $^{\circ}$ C 60秒の反応サイクルを40サイクル) を行った。アニーリング温度X $^{\circ}$ Cは55 $^{\circ}$ Cと60 $^{\circ}$ Cにて実施した。アニーリング温度による増幅曲線の差はみられず (図1)、いずれのprimerでもHUVECのCt値がHepG2より

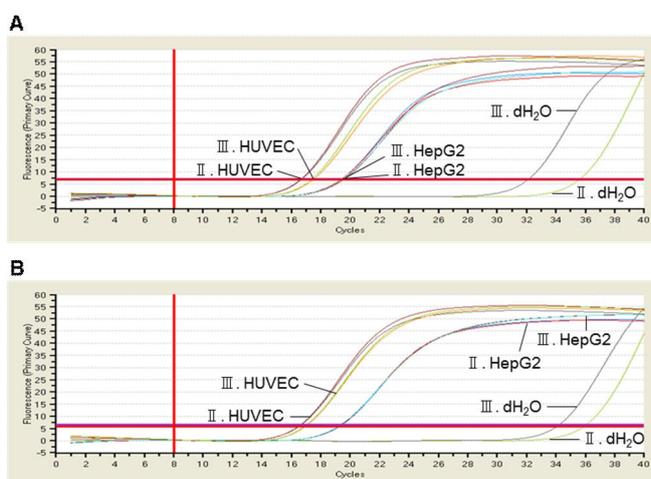


図1 PAI-1 primer II, primer IIIの増幅曲線

(A) アニーリング温度55 $^{\circ}$ C、(B) アニーリング温度60 $^{\circ}$ C。II, primer II; III, primer III。

小さかった。Primer IIのCt値のCVはアニーリング温度55 $^{\circ}$ Cで小さく、primer IIIでは60 $^{\circ}$ Cで小さかった (表2)。融解曲線ではアニーリング温度の違いに関わらず、鮮明なピークが観察された。電気

表2 PAI-1 primer II, primer IIIのアニーリング温度によるCt値の変化

Annealing temperature		55 $^{\circ}$ C			60 $^{\circ}$ C		
		Ct値	SD	CV	Ct値	SD	CV
primer II	HepG2	19.2	0.0	0.1	19.3	0.0	0.2
	HUVEC	16.7	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0
primer III	HepG2	19.5	0.1	0.4	19.2	0.0	0.1
	HUVEC	17.3	0.1	0.4	16.9	0.0	0.0

n=3

泳動結果では、アニーリング温度60 °C、primer IIではPAI-1 mRNA由来の84 bpのPCR産物の他に非特異的PCR産物が観察された。一方、primer IIIでは非特異的PCR産物は観察されず、102 bpのPCR産物のみを確認した（データ示さず）。

以上の結果から、アニーリング温度60 °C、primer IIIの条件がPAI-1解析に最適であると考え、この条件での増幅産物の塩基配列決定を北海道システム・サイエンス株式会社に委託し、目的の塩基配列と一致することを確認した。

3.2 ResveratrolのPAI-1発現への影響

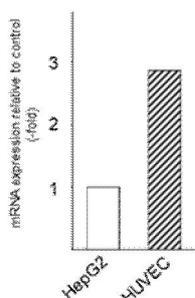


図2 HepG2とHUVECでのPAI-1 mRNA発現

HepG2でのPAI-1発現量はHUVECの約3分の1であった（図2）。肝細胞でのPAI-1 mRNA発現は、interleukin-6 (IL-6) や tumor necrosis factor- α (TNF- α)によって上昇することが報告されている⁷⁻¹⁰。そこで、HepG2細胞に1~5

ng/mL IL-6、5~10 ng/mL TNF- α を添加し、24時間後のPAI-1 mRNA発現への影響を解析したところIL-6、TNF- α によりPAI-1 mRNA発現はともに上昇する傾向を示し、10 ng/mL TNF- α でコントロールの1.2倍まで上昇し

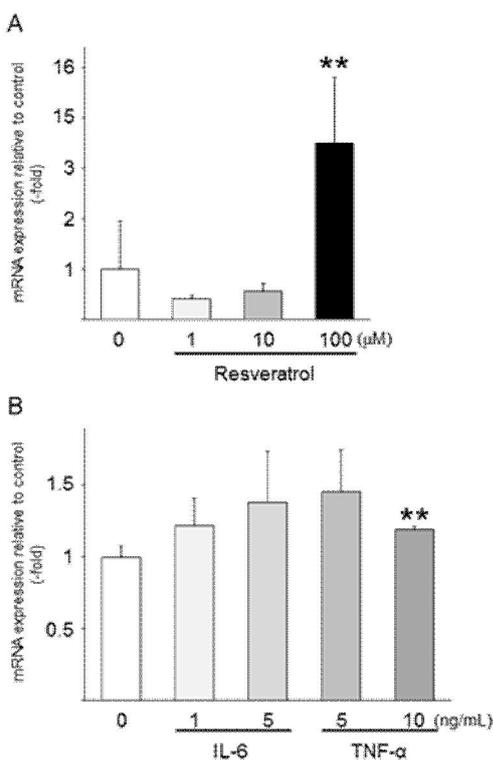


図3 PAI-1 mRNA発現への影響

Values represent the mean \pm SD of the results of 3 culture dishes. **p<0.01 vs control.

た（図3B）。次に、resveratrolがPAI-1 mRNA発現に影響を及ぼすか検討した。Resveratrolは1、10 μ Mでは影響を与えなかったが、100 μ MではPAI-1 mRNA発現を15.5倍まで有意に上昇させた（図3A）。

3.3 ResveratrolのPS発現への影響

HepG2細胞に1~100 μ M resveratrol、1~5 ng/mL IL-6、5~10 ng/mL TNF- α を添加し、24時間後のPS mRNA発現を検討した。Resveratrolは100 μ MでPS mRNA発現をコントロールの0.2倍まで抑制した。一方、IL-6やTNF- α はPS mRNA発現に影響を与えなかった（図4）。

4. 考察

Resveratrolの肝細胞でのPAI-1 mRNA発現への影響を検討するために、real-time RT-PCR法によるPAI-1 mRNA発現解析方法の確立を試みた。3種類のprimer pair (primer I、primer II、primer III)を作成し、HepG2とHUVECのcDNAを用いて検討を行った。Primer IではHepG2とHUVECのCt値に差が見られず、アニーリング温度条件を変更しても全くPCR産物が増幅していなかった。一方、primer IIやprimer IIIでは増幅曲線や融解曲線分析から目的サイズのPCR産物の増幅が示唆された。

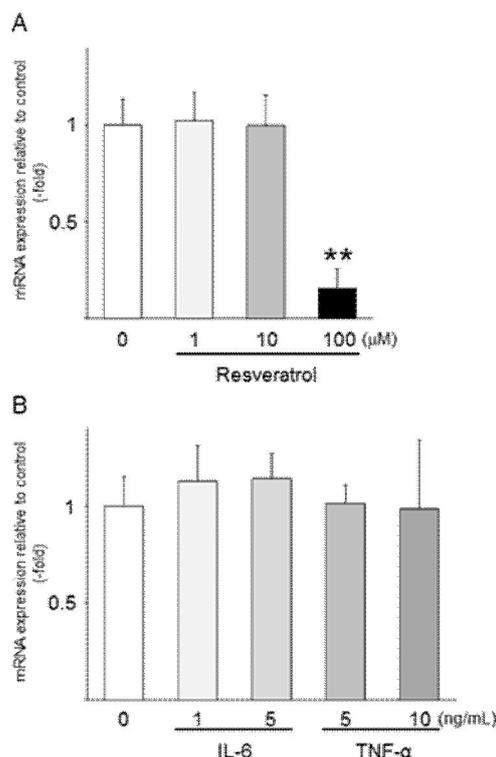


図4 PS mRNA発現への影響

Values represent the mean \pm SD of the results of 3 culture dishes. **p<0.01 vs control.

しかし、電気泳動の結果からアニーリング温度60℃、primer IIでは非特異的PCR産物が観察されたが、アニーリング温度60℃、primer IIIでは特異的PCR産物のみが増幅され、増幅産物の塩基配列が目的の塩基配列と一致したことから、PAI-1 mRNA発現解析はprimer IIIを使用してアニーリング温度60℃で行うことにした。

肝臓でのPAI-1発現量は、他の臓器に比べ非常に少ないことが報告されている⁷⁾。今回の検討では、HepG2でのPAI-1発現はHUVECの約3分の1と予想以上の発現量だった。赤ワインに含まれるresveratrolは従来から疾病予防などの有益な機能が報告されており、TNF- α による脂肪細胞のPAI-1 mRNA発現上昇を抑制し、肥満による血栓傾向を緩和することが報告されている¹¹⁾。我々は、resveratrolがHepG2のPS発現を抑制し、向血栓性に作用する可能性を示してきた⁶⁾。今回の検討では、resveratrol、TNF- α 、IL-6をHepG2に添加し、24時間後のPAI-1とPS mRNA発現への影響を検討した。TNF- α は10 ng/mLでコントロールの1.2倍までPAI-1 mRNA発現を上昇させ、IL-6は濃度依存的な上昇傾向を示したが、いずれもPS mRNA発現には影響を与えなかった(図3B、4B)。一方、resveratrolは100 μ MでPAI-1 mRNA発現を15.5倍まで有意に上昇させたが、PS発現を0.2倍まで抑制した(図3A、4A)。

Resveratrolは血管内皮細胞でのtissue factor 発現や^{12,13,14)}、thrombinによる血小板の活性化を抑制することが報告されており¹⁴⁾、血栓形成に対して防衛的に作用すると考えられている。しかし今回の研究から、resveratrolは肝細胞での凝固制御因子のPS mRNA発現を抑制するだけでなく、線溶阻害因子のPAI-1 mRNA発現を上昇させ、血栓形成に対して促進的に作用する可能性があることが示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、細胞培養等で御協力頂きました津田博子教授の研究室の方々、ならびに、ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECのcDNAを御提供頂きました九州大学大学院医学研究院病理病態学の中川和憲講師に深謝いたします。

参考文献

1) T. Hoekstra, J. M. Geleijnse, E. G. Schouten and C. Kluit, *Thromb Haemost* 91 (5), 861-872 (2004).

- 2) H. R. Lijnen, M. C. Alessi, B. Van Hoef, D. Collen and I. Juhan-Vague, *J Thromb Haemost* 3 (6), 1174-1179 (2005).
- 3) H. Tsuda, S. Hattori, S. Tanabe, H. Iida, M. Nakahara, S. Nishioka, M. Fujise, S. Kinoshita, K. Okubo and N. Hamasaki, *Ann Clin Biochem* 36 (Pt 4), 423-432 (1999).
- 4) S. Kinoshita, H. Iida, S. Inoue, K. Watanabe, M. Kurihara, Y. Wada, H. Tsuda, D. Kang and N. Hamasaki, *Clin Biochem* 38 (10), 908-915 (2005).
- 5) D. K. Das and N. Maulik, *Mol Interv* 6 (1), 36-47 (2006).
- 6) Y. Hiroto, K. Tadokoro, T. Tsuda, E. Nakazono, K. Ohnaka, R. Takayanagi, N. Hamasaki and H. Tsuda, *Thromb Res* 127 (1), e1-7 (2011).
- 7) M. S. Sawdey and D. J. Loskutoff, *J Clin Invest* 88 (4), 1346-1353 (1991).
- 8) J. Dong, S. Fujii, D. Goto, T. Furumoto, T. Kaneko, T. A. Zaman, Y. Nakai, T. Mishima, S. Imagawa and A. Kitabatake, *Hypertens Res* 26 (9), 723-729 (2003).
- 9) J. Dong, S. Fujii, S. Imagawa, S. Matsumoto, M. Matsushita, S. Todo, H. Tsutsui and B. E. Sobel, *Am J Physiol Cell Physiol* 292 (1), C209-215 (2007).
- 10) M. Okazaki, Y. Iwasaki, H. Jing, M. Nishiyama, T. Taguchi, M. Tsugita, Y. Taniguchi, M. Kambayashi and K. Hashimoto, *Endocr J* 55 (6), 967-975 (2008).
- 11) G. C. Yen, Y. C. Chen, W. T. Chang and C. L. Hsu, *J Agric Food Chem* 59 (2), 546-551 (2011).
- 12) U. R. Pendurthi, J. T. Williams and L. V. Rao, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (2), 419-426 (1999).
- 13) A. Di Santo, A. Mezzetti, E. Napoleone, R. Di Tommaso, M. B. Donati, G. De Gaetano and R. Lorenzet, *J Thromb Haemost* 1 (5), 1089-1095 (2003).
- 14) B. Olas, B. Wachowicz, A. Stochmal and W. Oleszek, *Nutrition* 21 (2), 199-206 (2005).

(原稿受付 2012年12月17日)