

令和元年6月21日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08501

研究課題名(和文)新規cAMP標的分子“EPAC”の動脈硬化発症における役割

研究課題名(英文)The role of Epac in the development of arteriosclerosis

研究代表者

藤田 孝之(Fujita, Takayuki)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：40468202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：

代表的なセカンドメッセンジャーであるcAMPの標的分子として、近年 Epac (exchange proteins directly activated by cAMP) が報告された。動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞など、多くの重要な疾患の発症の原因である。Epacには2つのアイソフォーム (Epac 1, Epac 2) があるが、本研究では、Epac 1、Epac 2それぞれの欠損マウスを用いて、“Epacの動脈硬化発症における役割”を検討した。Epac 2欠損マウスは動脈硬化が早く進行することが観察され、Epac 2が動脈硬化発症に抑制的にはたらくことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Epacは人体の多くの組織で発現しており、血管においても内皮細胞機能や、血管平滑筋細胞の増殖や遊走などにおいて、様々な作用が報告されている。動脈硬化は多くの重要な疾患の原因である。本研究では、動脈硬化発症におけるEpacの役割を、動物モデルにおいて明らかにした。

本研究ではEpac 2が動脈硬化発症に抑制的にはたらく可能性が示唆された。心筋梗塞、脳梗塞の予防においてEpac 2が重要であることが考えられ、今後の動脈硬化による疾患の予防や治療における分子標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)： cAMP is one of the most important second messengers in the body.

Exchange proteins directly activated by cAMP (Epac), a novel direct effector of cAMP, was discovered in 1998. Arteriosclerosis is an underlying cause of various important diseases, including myocardial infarction and cerebral infarction.

In this study we examined the role of Epac in the development of arteriosclerosis. There are two isoforms of Epac, Epac1 and Epac2. To examine the roles of each isoform, we generated Epac1/apolipoprotein E (Apo-E) double knockout (DKO) mice and Epac2/Apo-E DKO mice. Epac2/Apo-E DKO mice had more arteriosclerotic lesion than Apo-E single KO mice, suggesting that Epac2 may play protective roles in the development of arteriosclerosis.

研究分野：循環器病学 生理学

キーワード：Epac 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞を代表とした人体の寿命、quality of life (QOL) に大きく影響する多くの疾患発症の原因である。血管壁への機械的、化学的ストレスにより血管壁への白血球の浸潤、血管壁を構成する細胞の増殖、代謝産物の沈着などが生じる。動脈硬化は弾力性を失い、進行すると血管の狭窄や破綻をきたすことが、それぞれ重要な血管の血行障害や出血の原因となる。したがって、動脈硬化のメカニズムを解明し、予防法を確立することが強く求められてきているが、いまだ十分な対処方法が確立していない。

cAMP は代表的なセカンドメッセンジャーである。カテコラミンシグナルなどにより励起される心血管系の情報伝達系の主役であり、動脈硬化発症にも関与していると考えられている。cAMP の作用機序は古典的には protein kinase A (PKA) を介するが、近年新規 cAMP 標的分子として Exchange proteins directly activated by cyclic AMP (Epac) が同定された。Epac は GTPase の一つである Rap の GTP 交換因子として働き、Rap を活性化するが、これは PKA に非依存的である。したがって、cAMP はこの Epac を介して、PKA とは違う作用を生じていることが考えられ、多くの研究者の興味を集めている。これまで我々は、心臓や血管における Epac 1 機能の制御が、それぞれ心不全予防や、血管障害後の血管リモデリング (ステント留置後の再狭窄) 予防において有効である可能性を報告してきた (参考文献①、)。その他にも、血管平滑筋の遊走や、内皮細胞機能における、Epac の重要な役割についての報告がみられるが、Epac の動脈硬化発症における役割について、動物実験レベルで検討した報告は未だない。

2. 研究の目的

Epac の動脈硬化発症における役割について、マウス動脈硬化モデルを用いて検討し、Epac の動脈硬化予防・治療のための標的分子としての有用性を、動物実験レベルで明らかにする。Epac には Epac 1、Epac 2 の二つのアイソフォームが存在し、それぞれ様々な組織、細胞における機能が報告されている。Epac 1、Epac 2 それぞれの欠損マウスの動脈硬化病変を、野生型マウスと比較することにより、Epac 機能の抑制が、動脈硬化発症にどのように影響するかを検討する。

3. 研究の方法

Epac 1 または Epac 2 欠損マウスと、マウス動脈硬化モデルである Apo E 欠損マウスとを掛け合わせることで、Epac 1-Apo E、Epac 2-Apo E のダブルノックアウトマウスをそれぞれ作製する。これらのマウスにおける動脈硬化発症の程度を Apo E シングルノックアウトマウスと比較検討することにより、Epac 1、Epac 2 の欠損が、動脈硬化発症にどのように影響するかを検討する。大動脈の動脈硬化巣は Oil red O 染色で可視化し、その面積を検討する。

またマウスの血液検査を行うことで、腎機能障害や脂質異常症など、動脈硬化のリスクファクターとなる病態への影響についても評価する。

4. 研究成果

Epac 1-Apo E、Epac 2-Apo E のダブルノックアウトマウスを作製し、33 週齢まで飼育したうえで大動脈の動脈硬化巣の面積を測定し、Apo E シングルノックアウトマウスと

比較検討した。

図1、図2に示すとおり、Epac 2-Apo Eダブルノックアウトマウスは Apo E KOと比較して、大動脈の面積に対する動脈硬化の面積の割合が、より大きく (Male: $P < 0.05$ 、Female: $P < 0.1$, $N = 8-13$) 動脈硬化がより進行していることが明らかになった。このことから、Epac 2は動脈硬化の伸展に抑制的に働いている可能性が考えられた。

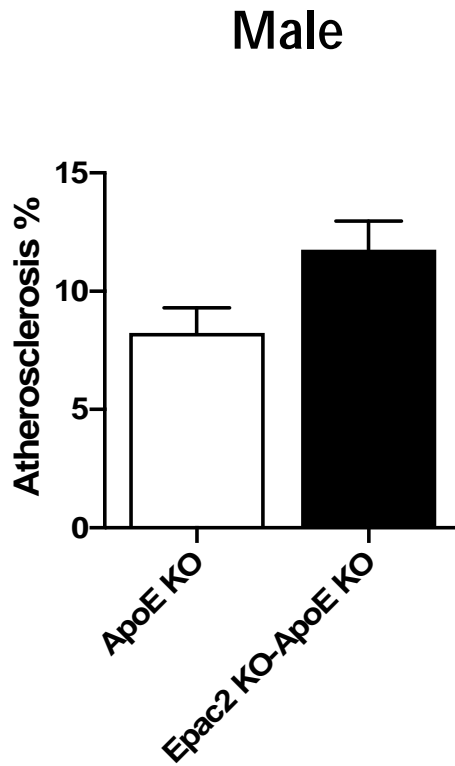


図 1

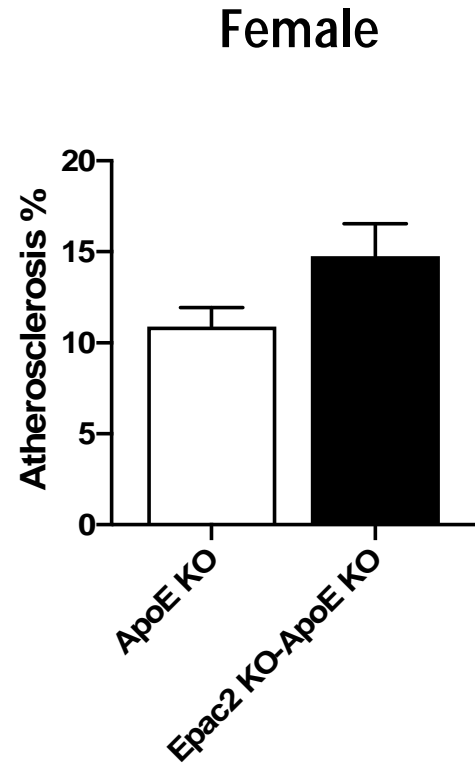


図 2

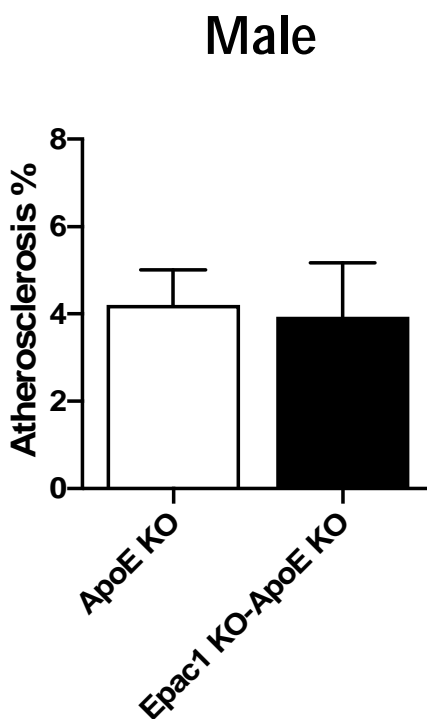


図 3

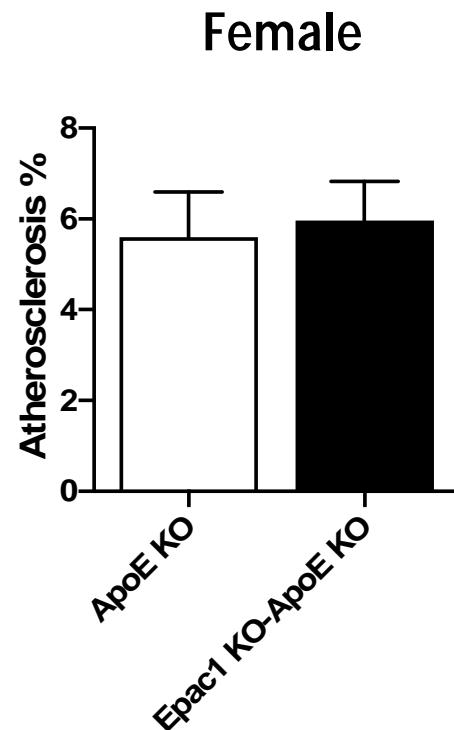


図 4

これに対し、図3、図4に示す通り、Epac 1-Apo E ダブルノックアウトマウスの動脈硬化巣の進行度は Apo-E シングルノックアウトマウスと比較して、明らかな違いを認めず、全身における Epac 1 の欠損は、動脈硬化の伸展に大きな影響を与えないことが考えられた。我々はこれまで Epac 1 が、血管平滑筋細胞の遊走を制御し、血管障害後の新生内膜の形成にも関与している事を、細胞実験、動物実験において観察していたが、少なくとも今回用いた Apo E 欠損による動脈硬化モデルにおいては、Epac 1 の欠損は動脈硬化の進展に大きな影響を与えないことが示唆された。

Epac は全身様々な臓器での機能が報告されており、血管局所での作用のみならず、様々な動脈硬化の危険因子に影響している可能性もある。これを踏まえ、本研究で有意差の認められた、Epac 2-Apo E ダブルノックアウトマウスと Apo-E シングルノックアウトマウスのオスマウスについて血液検査を行い、動脈硬化の危険因子である腎機能障害、脂質異常症の程度を評価した。図5～8に示す通り、BUN、クレアチニン (CRE)、総コレステロール (T-CHO)、LDL - コレステロール (LDL-C) に、両群間で有意差を認めず、Epac 2 欠損による動脈硬化の増悪は、腎機能や脂質異常症の病態を介したものではないことが示唆された。

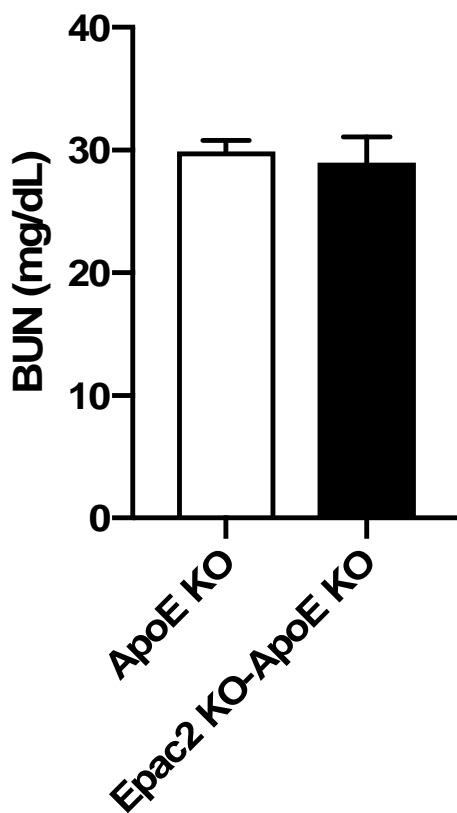


図5

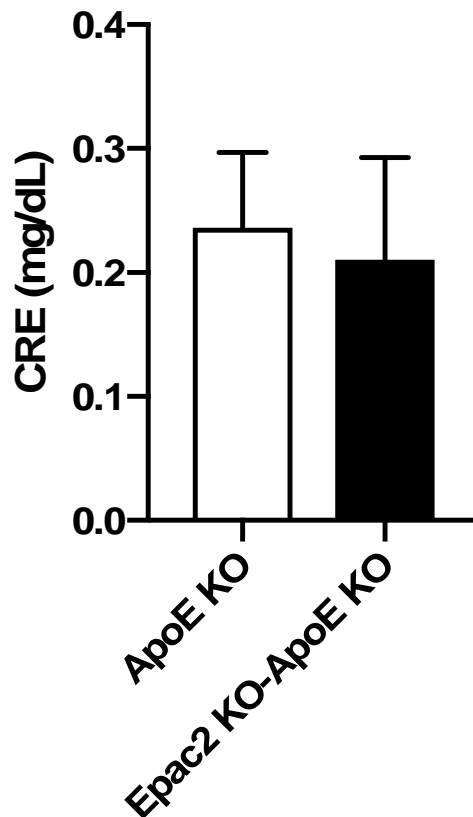


図6

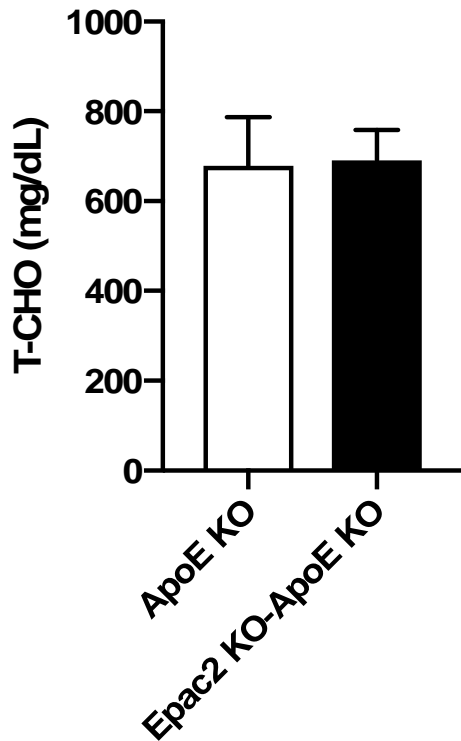


図 7

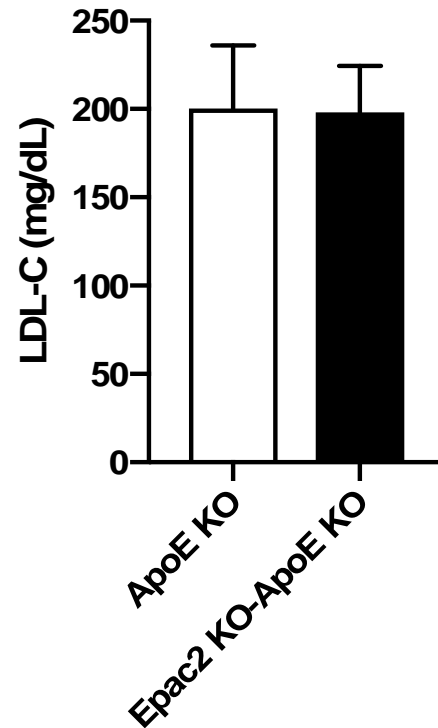


図 8

以上の様に本研究では Epac 2 の欠損により、動脈硬化の進行促進が観察され、Epac 2 が動脈硬化発症に抑制的に機能している可能性が示唆された。心筋梗塞、脳梗塞の予防において Epac 2 が重要であると考えられ、動脈硬化による疾患の予防や治療における分子標的としての可能性が示唆された。Epac 2 機能を保つことが、動脈硬化の管理において重要であることが考えられた。また今後更なる検討から、Epac 2 の抗動脈硬化作用のメカニズムを明らかにし、Epac 2 の作用部位を確認することで、より効率的にその抗動脈硬化作用を治療に役立てることが可能になると考えられる。

<引用文献>

①S. Okumura et al. Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses、 J Clin Invest (2014)、 124: 2785-2801。

Y. Kato et al. Epac1 Deficiency Attenuated Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Formation. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology (2015)、 35(12): 2617-2625。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。