

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08549

研究課題名(和文) ERK5を介した内皮間葉転換抑制機構の解明と動脈硬化性疾患予防への応用

研究課題名(英文) Clarification of ERK5-mediated endothelial mesenchymal transition suppression mechanism and its application to the prevention of arteriosclerosis

研究代表者

石澤 有紀 (IZAWA-ISHIZAWA, Yuki)

徳島大学・AWAサポートセンター・准教授

研究者番号：40610192

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)：動脈硬化性疾患におけるERK5活性化と内皮間葉転換(EndMT)の関与を明らかにする目的で研究を実施した。スタチン系製剤やポリフェノール的一种であるケルセチンは、培養血管内皮細胞においてERK5活性化を介して一酸化窒素合成酵素(NOS)の発現を増加させた。NOS発現の増減に一致して、内皮細胞マーカーでありEndMTに関与するVE-カドヘリン発現も上昇させることが明らかとなった。これらの薬物の血管内皮細胞保護効果は、マウスにおいて一酸化窒素合成酵素阻害剤投与によって惹起された血管障害を改善することからも確認された。以上より、ERK5活性化が動脈硬化性疾患発症予防に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粥状動脈硬化や大動脈瘤、大動脈解離、虚血性心疾患、脳卒中など、高血圧や加齢などを基礎疾患とする動脈硬化性疾患は、今なお日本人の主な死亡原因を占めているのが現状である。動脈硬化巣の形成は慢性的に進行するが、それに伴って起こる心血管イベントは予兆なく急激に発症し、致命的な転機をたどることも少なくない。そのため、イベント発症機序を明らかにし、予防戦略を確立することは非常に社会的意義がある。本研究課題では内皮間葉転換に着目し、内皮細胞におけるERK5活性化が動脈硬化性疾患のイベント発症予防に貢献し得る可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：A study was conducted to clarify the involvement of ERK5 activation and endothelial mesenchymal transition (EndMT) in the arteriosclerosis-related diseases. Statins and quercetin, a kind of polyphenol, increased the expression of nitric oxide synthase (NOS) through ERK5 activation in cultured vascular endothelial cells. It was revealed that VE-cadherin expression, which is an endothelial cell marker involved in EndMT, is also increased in accordance with the increase or decrease of NOS expression. The vascular endothelial cell protective effect of these drugs was also confirmed from the improvement of the vascular injury caused by nitric oxide synthase inhibitor administration in mice. From the above, it is suggested that ERK5 activation may contribute to the prevention of the onset of the arteriosclerosis-related diseases.

研究分野：循環薬理学

キーワード：内皮間葉転換 動脈硬化 ERK5 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大動脈硬化症や心筋の線維化、粥腫形成などの動脈硬化性疾患において、血管内皮細胞の内皮間葉転換 (endothelial-to-mesenchymal transition: EndMT) の関与が示唆されている (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013)。例えば乱流刺激 (disturbed flow: DF) や高血糖刺激がアンジオテンシン II、transforming growth factor- (TGF-)などを介して EndMT を誘導することが報告されている (Circ Res 2011) (Cardiovasc Diabetol 2012)。Extracellular signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) は血管内皮細胞において定常流刺激 (laminar shear stress) によって活性化され、一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現増加など内皮機能維持に重要な役割を担っていることが知られている (Circulation 2013)。高血糖や DF 刺激は ERK5 活性を阻害することによって内皮機能障害を惹起する。最新の報告では、定常流刺激が ERK5 の活性化を介して EndMT を抑制することが示されている (Cardiovasc Res. 2015)。申請者は、平成 25 年度日本学術振興会・頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラムにて、米・ロチェスター大学、阿部純一教授 (現テキサス州立大学 MD アンダーソンがんセンター教授) の元に派遣され、ERK5 による内皮保護効果に関する共同研究に携わった。具体的には、ハイスループットスクリーニング法により ERK5 を活性化させる小分子化合物としてスタチン系薬剤および抗マラリア薬などを同定し、これら化合物が ERK5 を直接活性化させ、内皮保護や抗炎症作用に寄与することを報告した (J Immunol 2014)。上記の背景から、EndMT に着目して動脈硬化性疾患の形成機序における ERK5 活性の関与について検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、ERK5 を介した EndMT 抑制の分子機序および動脈硬化性疾患における ERK5 の役割を解明する。また、ERK5 を標的とした既存薬剤を用いて、ドラッグリポジショニング戦略による治療法開発に向けた基盤研究を行う。具体的な研究目的は、以下の通りである。

- (1) 動脈硬化性疾患モデルマウスにおける ERK5 の役割解明
- (2) 動脈硬化性疾患モデルマウスにおける EndMT の関与の検討
- (3) ERK5 活性誘導薬物 (スタチン系薬剤、ポリフェノール等) の EndMT および動脈硬化性疾患発症への影響検討

3. 研究の方法

以下の通り in vivo および in vitro の実験系を用いて検討した。

- (1) 動脈硬化性疾患発症動物モデルおよび内皮特異的 ERK5 欠損マウスの作製
- (2) 培養細胞における ERK5 活性と EndMT 関連分子の関連探索
- (3) 動脈硬化性疾患発症動物モデルにおけるスタチン系薬剤、ポリフェノール等の効果の検討

4. 研究成果

(1) 動脈硬化性疾患発症動物モデルの作製と薬効評価

乱流刺激による動脈硬化性疾患発症のモデルマウスとして、頸動脈部分結紮術 partial carotid ligase (PCL) モデルを作製した。本マウスでは後頭動脈のみを残し、外頸・内頸動脈を結紮し血流を遮断することで、結紮部直下の分岐部において動脈硬化病変が形成されるモデルである。しかしながら、野生型マウスで十分な動脈硬化病変の形成が再現性を持って観察されるために現在手技等の検討中である。

そこで、別の動脈硬化性疾患発症モデルとして、薬剤誘発性大動脈瘤発症モデルマウスに着目した。Angiotensin II により高血圧を、リジルオキシダーゼ阻害剤である BAPN により中膜脆弱化を引き起こすことで高率に腹部・胸部大動脈瘤を形成することが知られているモデルである。そこに、申請者らのグループでは、内皮細胞障害を惹起する一酸化窒素合成阻害剤 (L-NAME) を投与することで、瘤に加え、大動脈解離や大動脈破裂による死亡例が著明に増加することを明らかにし、新規大動脈解離易発症モデルマウス: LAB モデルとして確立することに成功した。LAB モデルに ERK5 活性化作用が知られているスタチン系薬剤の一つであるピタバスタチンを投与したところ、有意に大動脈解離の発症および破裂による死亡が減少した。また、同様に内皮細胞保護効果が示唆されるポリフェノールの一つである quercetin が大動脈瘤・解離・破裂の発症を抑制することを見出した。

(2) 培養細胞における ERK5 活性と EndMT 関連分子の関連探索

Quercetin による動脈硬化性疾患の発症抑制が内皮保護作用によるものか否か検討するため、培養血管内皮細胞 HUVEC を用いて検討を行った。Quercetin は HUVEC において ERK5 の活性化を上昇させることが明らかとなった。また、その下流である一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現を増加させ、炎症性サイトカインによる細胞接着分子 VCAM-1 の発現を抑制した。一連の細胞内シグナル伝達経路の活性化により、内皮細胞保護効果および抗炎症作用を発揮していることが示唆された。一方、EndMT のマーカーとして内皮細胞間接着分子である VE-cadherin の発現においては、NOS の発現量に比例して変動することが培養細胞を用いた検討によって明らかになった。Quercetin が ERK5 活性化を介して EndMT に関与し、エピジェネティクス修飾に影響を及ぼ

すのではないかと仮説を立て、培養内皮細胞に対する quercetin 長期投与による DNA メチル化パターンの変動について次世代シーケンサーを用いて検討したが、quercetin による有意な DNA メチル化の変化は認められなかった。

(3) ERK5 欠損マウスの作製

ERK5 の内皮特異的のノックアウトマウスおよび線維芽細胞特異的のノックアウトマウスを作製した。血管内皮細胞において ERK5 を欠失したマウスは血管形成に異常をきたし、胎生致死となることが明らかとなった。よって、ヘテロ欠損マウスを用いて検討を行っている。一方、線維芽細胞特異的のノックアウトマウスでは、ホモ欠損で生存していることから、血管内皮細胞における ERK5 の重要性が確認された。引き続き、当マウスを用いて動物モデルの作製および薬効評価を行っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- (1) Kondo M, Imanishi M, Izawa-Ishizawa Y, Ikeda Y (他 11 名、7 番目、査読あり) Xanthine Oxidase Inhibition by Febuxostat in Macrophages Suppresses Angiotensin II-Induced Aortic Fibrosis. *Am J Hypertens.* 32(3):249-256. (2019) doi: 10.1093/ajh/hpy157.
- (2) Izawa-Ishizawa Y, Imanishi M, Ikeda Y (他 12 名、1 番目、査読あり) Development of a novel aortic dissection mouse model and evaluation of drug efficacy using in vivo assays and database analyses. *J Hypertens.* 37(1):73-83. (2019) doi: 10.1097/HJH.0000000000001898.
- (3) Hamano H, Mitsui M, Imanishi M, Izawa-Ishizawa Y, Ikeda Y (他 14 名、11 番目、査読あり) Irinotecan-induced neutropenia is reduced by oral alkalization drugs: analysis using retrospective chart reviews and the spontaneous reporting database. *Support Care Cancer.* 27(3):849-856. (2019) doi: 10.1007/s00520-018-4367-y.
- (4) Imanishi M, Izawa-Ishizawa Y, Ikeda Y (他 13 名、2 番目、査読あり) Nitrosonifedipine, a photodegradation product of nifedipine, suppresses pharmacologically induced aortic aneurysm formation. *Pharmacology.* 102(5-6):287-299. (2018) doi: 10.1159/000492577.
- (5) Horinouchi Y, Ikeda Y, Imanishi M, Izawa-Ishizawa Y (他 9 名、6 番目、査読あり) Renoprotective effects of a factor Xa inhibitor: fusion of basic research and a database analysis. *Sci Rep.* 8(1):10858. (2018) doi: 10.1038/s41598-018-29008-2.
- (6) Hamano H, Ikeda Y, Izawa-Ishizawa Y, Imanishi M (他 8 名、5 番目、査読あり) The uremic toxin indoxyl sulfate interferes with iron metabolism by regulating hepcidin in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 33(4):586-597. (2018) doi: 10.1093/ndt/gfx252.
- (7) Niimura T, Zamami Y, Izawa-Ishizawa Y, Imanishi M, Ikeda Y (他 16 名、4 番目、査読あり) Hydrocortisone administration was associated with improved survival in Japanese patients with cardiac arrest. *Sci Rep.* 7(1):17919. (2017) doi: 10.1038/s41598-017-17686-3.
- (8) Sato S, Zamami Y, Izawa-Ishizawa Y (他 14 名、12 番目、査読あり) Meta-analysis of the efficacies of amiodarone and nifekalant in shock-resistant ventricular fibrillation and pulseless ventricular tachycardia. *Sci Rep.* 7(1):12683. (2017) doi: 10.1038/s41598-017-13073-0.
- (9) Ikeda Y, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Imanishi M (他 11 名、6 番目、査読あり) Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice. *Sci Rep.* 7(1):10621. (2017) doi: 10.1038/s41598-017-11089-0.
- (10) Oshima K, Ikeda Y, Izawa-Ishizawa Y (他 11 名、8 番目、査読あり) Iron suppresses erythropoietin expression via oxidative stress-dependent hypoxia-inducible factor-2 alpha inactivation. *Lab Invest.* 97(5):555-566. (2017) doi: 10.1038/labinvest.2017.11.
- (11) Fukunaga Y, Izawa-Ishizawa Y, Ikeda Y (他 7 名、2 番目、査読あり) Topical application of nitrosonifedipine, a novel radical scavenger, ameliorates ischemic skin flap necrosis in a mouse model. *Wound Repair Regen.* 25(2):217-223. (2017) doi: 10.1111/wrr.12510.
- (12) Ikeda Y, Imao M, Izawa-Ishizawa Y (他 10 名、7 番目、査読あり) Iron-induced skeletal muscle atrophy involves an Akt-forkhead box O3-E3 ubiquitin ligase-dependent pathway. *J Trace Elem Med Biol.* 35:66-76. (2016) doi: 10.1016/j.jtemb.2016.01.011.

〔学会発表〕(計 26 件)

- (1) 鈴木琴子、石澤有紀他 薬剤誘発性大動脈瘤または大動脈解離モデルマウスに対するケルセチンの効果 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年
- (2) 石澤有紀他 動脈硬化性疾患発症に対するケルセチンの効果 第 257 回徳島医学会 2018

(招待講演) 2018年

- (3) 石澤有紀 新規大動脈解離モデルマウスの開発と予防薬の探索 第4回しこくオープンイノベーションワークショップ in 徳島 (招待講演) 2018年
- (4) 今西正樹、石澤有紀他 線維芽細胞特異的 ERK5 欠損は腫瘍血管構造を変化させ腫瘍組織増大を促進させる 日本循環薬理学会 2018年
- (5) Yuki Izawa-Ishizawa 他 Nitrosonifedipine Ameliorates Neurological Symptoms and Prolongs the Survival in Malignant Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. Society for Neuroscience Annual Meeting 2018 (国際学会) 2018年
- (6) Yoshito Zamami, Yuki Izawa-Ishizawa 他 Search for drugs that attenuate the antitumor effect of bevacizumab using adverse event database. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology; WCP2018 (国際学会) 2018年
- (7) Yuki Izawa-Ishizawa 他 The effect of quercetin on aortic aneurysms in mice. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology; WCP2018 (国際学会) 2018年
- (8) 石澤有紀他 マウス大動脈瘤形成に対するケルセチンの効果 第256回 徳島医学会学術集会 (平成29年度冬期) 2018年
- (9) 石澤有紀他 ケルセチンによる動脈硬化性疾患発症に対する予防効果の検討 第27回日本循環薬理学会 2017年
- (10) 鍵本優有、石澤有紀他 急性大動脈解離易発症マウスにおける quercetin の効果 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2017年
- (11) 座間味義人、石澤有紀他 有害事象自発報告データベースを切り口としたベバシズマブの抗腫瘍効果を減弱させる薬剤の探索研究 医療薬学フォーラム 2017/第25回クリニカルファーマシーシンポジウム 2017年
- (12) Yuki Izawa-Ishizawa 他 Nitrosonifedipine, a Novel Antioxidant, Ameliorates Neurological Symptoms and Prolongs the Survival in a Malignant Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. European Meeting of Hypertension and Cardiovascular Protection (国際学会) 2017年
- (13) Masaki Imanishi, Yuki Izawa-Ishizawa 他 The effects of febuxostat on angiotensin II-induced vascular remodeling. European Meeting of Hypertension and Cardiovascular Protection (国際学会) 2017年
- (14) 石澤有紀他 ケルセチンの内皮保護作用を介したマウス大動脈解離発症に対する効果. 第90回日本薬理学会年会 2017年
- (15) 石澤有紀他 ケルセチンによるマウス大動脈解離発症予防効果の検討. 第46回日本心臓血管作動物質学会 2017年
- (16) 今西正樹、石澤有紀他 Angiotensin II 誘発性血管リモデリングに対する febuxostat の効果. 第46回日本心臓血管作動物質学会 2017年
- (17) 石澤有紀他 ニトロソニフェジピンは虚血性皮弁モデルにおいて皮弁壊死を抑制する. 第26回日本循環薬理学会 2016年
- (18) 細岡真由子、石澤有紀他 Quercetin による血管内皮細胞保護効果の検討. 第130回日本薬理学会近畿部会 2016年
- (19) Kazuma Ota, Yuki Izawa-Ishizawa 他 Disruption of hypoxia-inducible factor-1a deteriorates renal ischemia-reperfusion injury through dysregulation of Kv2.2-induced apoptosis in tubules. ASN KIDNEY WEEK 2016 (国際学会) 2016年
- (20) Yutaka Fukunaga, Yuki Izawa-Ishizawa 他 Topical Application of Nitrosonifedipine, a Novel Free Radical Scavenger, Ameliorate the Ischemic Skin Flap Necrosis. Plastic Surgery THE MEETING 2016 (国際学会) 2016年
- (21) 福永豊、石澤有紀他 虚血性皮弁壊死モデルにおける抗酸化薬ニトロソニフェジピンの壊死抑制効果. 第25回日本形成外科学会基礎学術集会 2016年
- (22) 今西正樹、石澤有紀他 脳卒中後の神経症状増悪に対するニトロソニフェジピンの効果. 第46回日本神経精神薬理学会年会 2016年
- (23) 石澤有紀他 ケルセチン代謝産物 Q3GA の血管内皮細胞に対する短期及び長期効果の検討. 第129回日本薬理学会近畿部会 2016年
- (24) Yuki Izawa-Ishizawa 他 The effects of pitavastatin, a lipid-lowering agent, against aortic dissection model mice induced by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide/16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan (国際学会) 2016年
- (25) Yasumasa Ikeda, Yuki Izawa-Ishizawa 他 The new insight of iron on tissue damage in metabolic disorders. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide/16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan (国際学会) 2016年
- (26) Yasumasa Ikeda, Yuki Izawa-Ishizawa 他 The Involvement of Iron Supplementation on Erythropoietin Expression. Experimental Biology 2016 (国際学会) 2016年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：池田 康将

ローマ字氏名：IKEDA, Yasumasa

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学系）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60432754

研究分担者氏名：今西 正樹

ローマ字氏名：IMANISHI, Masaki

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：00734344

(2)研究協力者

研究協力者氏名：阿部 純一

ローマ字氏名：ABE, Jun-ichi

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。