

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09515

研究課題名(和文)血管内皮接着因子、JCADによるプラーク不安定化機序の解明 - 血管新生に注目して -

研究課題名(英文) Role of JCAD in the pathogenesis of plaque destabilization

研究代表者

川合 宏哉 (Kawai, Hiroya)

神戸大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：20346266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：A) *in vitro*の培養血管内皮細胞を用いたJCADの血管新生の役割の解明 HUVECにおいて、JCADのノックダウンにより、細胞増殖能が低下し、tube formationも低下する、という結果をえた。
(B) *in vivo*におけるJCADの血管新生における役割の解明 tumor growth modelによる生体内での腫瘍血管新生能 JCADのノックアウトマウスでは血管新生が減少し、さらにSMA陰性の未熟な血管新生がおこることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のヒトゲノムワイド関連研究(GWAS)により、心筋梗塞と関連する因子として、JCAD(旧名K1AA1462)が新規に同定された。しかしながら、JCADが心筋梗塞の発症を制御する分子機構は全く明らかになっていない。JCADは血管内皮細胞の接着因子であることから、血管新生を制御していることが推測される。本研究の成果により、JCADと心筋梗塞との関連が明らかとなれば、将来的にはJCADをターゲットとした新たな治療戦略の確立や、JCAD遺伝子多型によるテーラーメイド医学への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：(A) We investigated the role of JCAD in the pathogenesis of angiogenesis *in vitro*. In HUVEC cells, knock-down of JCAD induced the significant decrease of Tube formation, viability assessed by WST-1.

(B) Role of JCAD in the angiogenesis *in vivo*. We used tumor growth model, and compared the angiogenesis between JCAD^{-/-} mouse and WT mice. We observed significant decrease of tumor angiogenesis and impaired angiogenesis maturation assessed by SMA staining.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血管新生

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

1. 研究開始当初の背景

1) JCAD (Junctional protein associated with Coronary Artery Disease) とは

近年のヒトゲノムワイド関連研究 (GWAS) により心筋梗塞と有意な相関がある分子として、新たに JCAD (Junctional protein associated with Coronary Artery Disease, 遺伝子名 KIAA1462) が同定された (Nat Genet. 2011, Eur Heart J. 2011)。それゆえ、この JCAD 分子の機能を制御する、という治療戦略は、新たな心筋梗塞の予防、治療法として非常に有望である。この JCAD 分子の機能を制御するためには、その生理的機能や心筋梗塞発症への分子機構の解明が必須である。

これらのゲノムワイド研究と同時期に我々の共同研究グループである古瀬研究室から、新規接着因子の同定という、培養細胞を用いた生化学的アプローチでも JCAD が同定された (Biochem Biophys Res Commun. 2011)。この報告では JCAD の遺伝子配列の解明や、JCAD が VE-Cadherin と共局在し、その発現も VE-Cadherin 依存性であることが報告されている。VE-Cadherin は、血管新生において非常に重要な役割を持ち、VE-Cadherin^{-/-}マウスは胎生致死となる (Development. 1999)。一方、我々の研究グループはすでに JCAD^{-/-}マウスの作成に成功しているが、野生型マウスと同様に繁殖し、肉眼的な奇形などはない。それゆえ、JCAD は血管発生 (Vasculogenesis) には影響しないが、病的血管新生 (Angiogenesis) を制御しているのではないかという着想を得た。

2) 血管新生と動脈硬化プラークの不安定化、および JCAD との関連性

血管新生は動脈硬化の進展や、動脈硬化プラークの不安定化に重要な役割を果たしていることが知られている。Vasa Vasorum という血管周囲の微小血管が、動脈硬化プラーク内へ血管新生により進展し、プラーク内への炎症細胞浸潤や、プラーク内出血の原因となる。

VE-Cadherin は膜貫通蛋白であるが、一方、JCAD 蛋白は膜貫通ドメインを持たず、細胞膜上には発現しない。それゆえ、JCAD は VE-Cadherin の機能を制御している裏打ち蛋白ではないかと着想した。細胞外部からの血管新生刺激を感知した VE-Cadherin が細胞内にシグナルを伝達する際に、この JCAD が何らかの役割を果たし、血管発生と血管新生を区別して、生後の病的な血管新生を制御し、vasa vasorum の血管新生を介して心筋梗塞の発症に関与する、という仮説をたて、これを証明するために以下の in vivo in vitro の実験系を駆使した以下の研究計画を建てた。

2. 研究の目的

JCAD は血管新生を制御することにより、動脈硬化病変の進展や不安定性に影響することを明らかにするために、以下の研究を行う。

1. 培養血管内皮細胞に JCAD の発現を siRNA によりノックダウンさせ、tube formation 等の血管新生能への影響を in vitro で明らかにする。
2. JCAD ノックアウトマウスの aorta を用いた ring assay や tumor growth model により、in vivo における JCAD の血管新生への影響を明らかにする。
3. JCAD が血管新生を制御する分子機構を培養血管内皮細胞において解明する。
4. JCAD/ApoE ダブルノックアウトマウスを作製し、vasa vasorum の変化や、動脈硬化プラークの量や不安定性を病理学的に解析し、JCAD の動脈硬化への影響を明らかにする。
5. 日本人においても JCAD の一塩基多型が冠動脈疾患と関連することを明らかにする。

3. 研究の方法

JCAD が血管新生を制御し、これを介して動脈硬化プラークの不安定化を制御していること

を明らかにするため、以下の研究を行う。(1) in vitro の培養血管内皮細胞を用いた JCAD の血管新生の役割の解明 (migration assay, tube formation 等)、(2) in vivo における JCAD の血管新生における役割の解明 (生理的脈管形成、tumor growth model による腫瘍血管新生能)、(3) JCAD が血管新生を制御する分子メカニズムの解明、(4) JCAD/ApoE ダブルノックアウトマウスの作製と、これを使用した vasorum の評価及び動脈硬化プラーク不安定性の評価、さらに(5) JCAD 遺伝子多型の日本人における冠動脈疾患との関連 を明らかにする。

4 . 研究成果

(A) in vitro の培養血管内皮細胞を用いた JCAD の血管新生の役割の解明

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対して siRNA や transfection 法を用いた JCAD のノックダウンや過剰発現を誘導し、(1) WST-1 アッセイによる細胞増殖能、(2) wound healing model による細胞遊走能、(3) tube formation による血管新生能を比較検討し、JCAD は血管新生を制御していることを明らかにする。HUVEC において、JCAD のノックダウンにより、細胞増殖能が低下し、tube formation も低下する、という結果を得た。

(B) in vivo における JCAD の血管新生における役割の解明

(B-1) JCAD^{-/-}マウスの生理的脈管形成への影響

作製された JCAD^{-/-}マウスは少なくとも胎生致死はおこらず、肉眼上は野生型と変化を認めなかった。生理的な血管発生に異常がないことを確認するために、マウス網膜血管の解剖を FITC の静脈投与後の摘出眼球において組織学的に検討したが、明らかな差を認めなかった。

(B-2) tumor growth model による生体内での腫瘍血管新生能 (原哲也、川合宏哉)

JCAD^{-/-}マウスと野生型マウスに対してメラノーマ癌細胞 (B16F10) 及び肺腺癌細胞株 (LL/2) を皮下注射し、その増殖を経時的に 2 日毎に観察し、その増殖速度を比較する。2 週間後に安楽死させ、腫瘍組織を取り出し、血管内皮細胞のマーカーである CD31 染色によって腫瘍内の血管新生の程度を評価する。新生血管の成熟度を比較するために、平滑筋アクチン (SMA) との二重染色も行い、SMA を伴わない未熟な血管新生の割合も比較検討する。結果、JCAD ノックアウトマウスでは腫瘍の増殖スピードの低下を認め、組織学的な解析の結果、腫瘍内への新生血管が減少していた。さらに SMA 染色による新生血管の成熟度を評価したが、こちらも JCAD ノックアウトマウスでは低下していた。すなわち、JCAD ノックアウトマウスでは腫瘍への血管新生の低下、さらに血管の成熟度の低下によって、腫瘍の増殖が低下する。

(C) JCAD が血管新生を制御する分子メカニズムの解明

(A)-(B) の in vitro 及び in vivo の解析によって JCAD が血管新生を制御することが明らかになれば、血管内皮の接着因子である JCAD がどのような分子機序で血管新生を制御しているかを検討する。VEGF 刺激による tube formation が JCAD のノックダウンにより低下したという予備実験の結果から JCAD は VEGF 刺激による血管新生のシグナルカスケードを制御している可能性が高く、VEGF を介した血管新生の制御機構に焦点をあてて解析を行う。培養ヒト血管内皮細胞 (HUVEC など) に siRNA 等を用いて JCAD 特異的なノックダウンや過剰発現を誘導し、トロンピン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる影響を分子細胞学的に検討した。VEGF 刺激による ERK のリン酸化は JCAD の特異的なノックダウンにより抑制されたが一方、AKT のリン酸化経路は抑制されなかった。また JCAD 特異的なノックダ

ウンにより VEGFR のリン酸化とその発現レベル自体も抑制された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. **Hara T**, et al. Progression of calcific aortic valve sclerosis in WHHLMI rabbits. *Atherosclerosis*. 2018, 2018;273:8-14.
2. Jaffer FA, **Hara T**. PET/MR Illumination of Atherosclerosis Pathobiology: How a Nanobody Becomes Somebody. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018; in press.
3. **Hara T**, et al. Targeted Disruption of JCAD/KIAA1462, a Coronary Artery Disease-associated Gene Product, Inhibits Angiogenic Processes in Vitro and in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1667-1673.
4. Tsuda S, Shinohara M, Oshita T, Nagao M, Tanaka N, Mori T, **Hara T**, Irino Y, Toh R, Ishida T, Hirata KI. Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B₄ pathway by high-density lipoprotein in macrophages. *Sci Rep*. 2017;7:12989.
5. Nagao M, Toh R, Irino Y, Nakajima H, Oshita T, Tsuda S, **Hara T**, Shinohara M, Ishida T, Hirata KI. High-density lipoprotein protects cardiomyocytes from oxidative stress via the PI3K/mTOR signaling pathway. *FEBS Open Bio*. 2017;7:1402-1409.
6. Tanaka N, Irino Y, Shinohara M, Tsuda S, Mori T, Nagao M, Oshita T, **Hara T**, Toh R, Ishida T, Hirata KI. Eicosapentaenoic Acid-Enriched High-Density Lipoproteins Exhibit Anti-Atherogenic Properties. *Circ J*. 2018;82:596-601.
7. Monguchi T, **Hara T**, Hasokawa M, Nakajima H, Mori K, Toh R, Irino Y, Ishida T, Hirata KI, Shinohara M. Excessive intake of trans fatty acid accelerates atherosclerosis through promoting inflammation and oxidative stress in a mouse model of hyperlipidemia. *J Cardiol*. 2017;70:121-127.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：原 哲也

ローマ字氏名：HARA TETSUYA

所属研究機関名：神戸大学医学部附属病院

部局名：循環器内科

職名：助教

研究者番号（8桁）：70547504

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。