

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19406

研究課題名(和文)新規の接着因子、JCADの血栓症への影響の解明

研究課題名(英文)The role of JCAD, an adhesion molecule of endothelial cell, in regulating thrombosis

研究代表者

原 哲也 (Hara, Tetsuya)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：70547504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1. JCADが血栓形成を制御していることをJCAD^{-/-}マウスを用いて、直接的に明らかにした。下大静脈結紮モデルという、DVTモデルを用いて血栓を作製した。JCAD^{-/-}マウスでは血栓サイズが野生型マウスと比較して、大型化することが明らかになった。

2. 培養細胞を用いて、JCADの血栓形成にかかわる分子メカニズムを明らかにした。培養ヒト血管内皮細胞(HUVECなど)において、分子細胞学的検討の結果、JCADはVEGF刺激によるERKシグナル活性化を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：1. We assessed the role of JCAD in the regulation of thrombus formation. Using IVC ligation model, we compared the DVT size between WT mice and JCAD knock out mice. JCAD knock-out mice exhibited significantly larger thrombus size compared to WT mice.

2. We then assessed the molecular mechanism of JCAD in thrombus formation. Western blotting analysis revealed that JCAD regulate the ERK signaling cascade in HUVEC after the VEGF (vascular endothelial growth factor) stimulation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：深部静脈血栓症

1. 研究開始当初の背景

(1) 接着因子による血管内皮機能の制御と血栓症の関連

血管内皮には vascular endothelial (VE)-cadherin を代表とする、種々の接着因子が発現しており、血管内皮機能(血管透過性、抗血栓能、血管拡張能等)を制御し、動脈硬化をはじめとする、さまざまな病態に深く関与している。申請者と研究グループは血管内皮特異的接着因子 (endothelial cell-selective adhesion molecule, ESAM) を独自に同定し、その研究を通じて、血管内皮細胞間の接着の異常が、動脈硬化進展 (Inoue, Hara et al, Microvasc Res. 2010)、腫瘍転移 (Cangara, Hara et al, Microvasc Res 2010)、蛋白尿 (Hara, et al, Microvasc Res. 2009) などの病態に深く関与することを示してきた。血栓モデルにおいても、接着因子であるセレクチンが血栓形成に関わることが報告されており (Nature. 1992, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015)、血管内皮細胞の接着を制御する分子は、血栓症にも影響を及ぼすことが判明している。

(2) 新規の血管内皮接着因子、JCAD とは

近年、遺伝子解析に基づいた新規心血管病関連遺伝子の検索が広く行われている (ヒトゲノムワイド関連研究: GWAS)。いくつかの候補遺伝子において、より詳細な基礎研究が進んでおり、心血管病の機序解明や新規治療法開発が進行している。JCAD (junctional protein associated with coronary artery disease、旧名 KIAA1462) は、ヒトゲノムワイド研究にて、心筋梗塞と相関を示すことが報告された (Eur Heart J. 2011, Nat Genet. 2011)。それと同時期に、我々の研究グループは新規接着因子の同定、という全く異なる生化学的アプローチから、独自に JCAD を同定した (BBRC, 2011)。JCAD は血管内皮細胞に発現し、VE-Cadherin 依存的に細胞接着部位に局在することを報告したが、JCAD の機能は不明である。そのような中で、近年のトロンビン刺

激後のリン酸化蛋白の網羅的解析で、この JCAD が偶然同定された (Blood.

2014;123:e22-36)。すなわち、JCAD は血管内皮における、トロンビン刺激による血栓形成カスケードを制御することで、心筋梗塞を含む、血栓症の発症に関与しているのではないかと着想した。

本研究では、血管内皮細胞の新規接着因子である、JCAD の血栓症の制御機構を解明する。本研究成果によって、将来的には (1) JCAD をターゲットとした血栓症の新たな治療法の開発、(2) 各症例における JCAD の一塩基多型 (SNP) の有無に応じた、DVT や左房内血栓治療戦略の決定 (治療強度や期間を個別に設定) を可能とするテーラーメイド医学への応用が期待できる。

2. 研究の目的

1. JCAD が血栓形成を制御していることを JCAD^{-/-}マウスを用いて、直接的に明らかにする。

各種血栓モデル (DVT モデル、動脈血栓モデル) を作製し、JCAD^{-/-}マウスでは血栓サイズが野生型マウスと比較して、大型化、ないしは縮小することを証明する。

分子イメージングを用いて、炎症細胞浸潤、炎症活性、血栓関連分子の発現を生体下で比較検討する。

2. 培養細胞を用いて、JCAD の血栓形成にかかわる分子メカニズムを明らかにする。

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ビン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる分子 (組織因子、PAI-1 など) の変化を分子細胞学的に検討する。

3. 研究の方法

JCAD が血栓症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) JCAD^{-/-}マウスと野生型マウスに血栓を作製し、その血栓サイズの差を明らかにする。

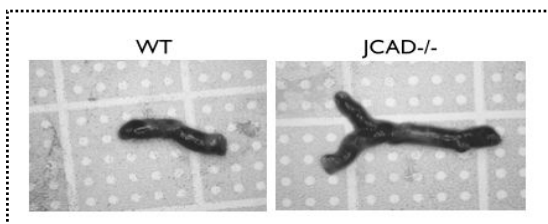
(2) 分子イメージングを用いて、生体下に JCAD^{-/-}マウスと野生型マウスにおいて、血栓での炎症活性、炎症性細胞浸潤、各種血栓関連因子の発現を比較検討する。

3) 培養血管内皮細胞に JCAD のノックダウン及び過剰発現を誘導し、JCAD が血栓形成を制御する分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1). JCAD^{-/-}マウスを用いた血栓症の発生における JCAD の影響の解明

我々と共同研究グループは 独自に JCAD を同定し、血管内皮の接着部位に発現することを報告した。さらに、JCAD^{-/-}マウスの作成にも既に成功している。その JCAD^{-/-}マウスにおいて、下大静脈に DVT を作成したところ、JCAD^{-/-}マウスでは大型の DVT が作成された。すなわち、JCAD は抗血栓的に働く分子であることが生体で明らかとなった。



(2). 培養細胞を用いた JCAD の血栓形成にかかわる分子メカニズムの解明

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、トロンビ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。

(3). 生体血栓イメージングモデルの開発

蛍光顕微鏡による血栓形成過程を観察する中で、我々は偶然、血流低下状態においては、光感作物質の投与なしでも、蛍光顕微鏡観察に伴う光照射によって血栓形成が秒単位で形成されることを発見した。具体的にはマウスの大腿静脈を皮膚切開により露出し、中枢部を外科的に結紮する。結紮後も大腿静脈には複数の分枝が存在するため、それらを介して血流自体は遮断されず、血流低下のみが起こる。その状態で蛍光顕微鏡において大腿静脈を観察すると、秒単位で血栓が形成されていく過程が観察される。これは、蛍光顕微鏡による励起光照射という観察行為そのものが、血栓形成のトリガーとなるため、誘発と観察が同時に可能となる、画期的な生体イメージング法である。今後は、このモデルを用いて深部静脈血栓症の病態解明をすすめていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Hara T, Tsukada N, Okano M, Ishida T, Hirata KI, Shiomi M. Progression of calcific aortic valve sclerosis in WHHLMI rabbits. *Atherosclerosis*. 2018, in press.
2. 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.

3. 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.
4. **Hara T**, Monguchi T, Iwamoto N, Akashi M, Mori K, Oshita T, Okano M, Toh R, Irino Y, Shinohara M, Yamashita Y, Shioi G, Furuse M, Ishida T, Hirata KI. 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.
5. 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.
6. *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. *TH; Co-first author and corresponding author.

〔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：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 哲也 (HARA TETSUYA)
 神戸大学 大学院医学研究科 助教
 研究者番号：70547504

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()