

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19417

研究課題名(和文) Caveolin-Cavinシステムの機能解析による肺高血圧症発症機序の解明

研究課題名(英文) Cavin-Caveolin system in the mechanism of pulmonary hypertension

研究代表者

中西 直彦 (Nakanishi, Naohiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10637911

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)：細胞膜カベオラ構成蛋白であるCaveolin-1 (Cav1) は肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の原因遺伝子の一つである。Cav1はPAHの遺伝子異常として最も頻度の高いBMPR2と密接な関係しているが、肺高血圧症における役割は明らかではない。

Cav1はBMPR2を介して肺動脈血管内皮細胞におけるSmad1/5/9、Aktのリン酸化を調節し、またCavinファミリーはこのCav1とBMPR2の関連を制御し、肺高血圧症発症に重要な役割を持つ可能性が示唆された。本研究結果は、Caveolin-Cavinシステムが肺高血圧症の進展抑制に対する治療ターゲットとなる可能性を示しているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Emerging evidence suggests that caveolin-1 (Cav1) is associated with pulmonary arterial hypertension. Caveolin regulates caveolar formation and functions together with Cavin. Although Cav1 associated with BMPR2, the role of Cav1 in the mechanism of the development of pulmonary hypertension (PH) has not been well-known.

Cav1 knockout mice revealed pulmonary hypertension. Low-dose FK506 that is reported as activator of BMPR2 reversed pulmonary hypertension in Cav1 knockout mice. Cav1 knockdown in pulmonary arterial endothelial cells (PAEC) suppressed the phosphorylation of Smad 1/5/9 that is a downstream of BMPR2 signaling pathway. Low-dose FK506 reversed the inhibition of Smad 1/5/9 phosphorylation in the PAEC, suggesting that Cav1 regulates the Smad signaling via BMPR2. In addition, overexpression of Cav1 decreased BMPR2 expression, which is reversed by Cavin-1. These findings suggest the possibility that Cavin-Caveolin system has a role in the development of PH through BMP signaling.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺高血圧症 カベオラ カベオリン キャビン BMPR2

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、肺血管の内膜と中膜の肥厚、血栓などにより肺血管抵抗が上昇し、低酸素血症、右心不全を経て死亡する予後不良な疾患である。以前は平均生存期間が2.8年と非常に予後が短かったが、PGI₂の持続投与と製剤であるエポプロステノールが登場し、その後も内服薬としてエンドセリン受容体拮抗薬やPDE-5阻害薬が治療に使われるようになり、患者の生存率はかなり改善した。しかしながら、症状の出現時にはすでにかなりの器質的変化が進んでしまっており、重症例においてはいまだ肺移植以外の有効な治療法がないのが現状である。また、現在の治療は肺動脈の拡張による肺動脈圧低下が主体の治療法であり根治的治療とはならず、積極的に肺血管内膜肥厚を縮小させることにより血管リモデリングを改善させる新たな治療法が必要とされている。

BMP/Smadシグナルを中心としたいくつかの遺伝子変異(BMPR2, ALK1, Smad9など)がPAH発症に重要であることが、近年の研究で明らかになっている。例えば、遺伝性PAHの約70%にBMPR2の遺伝子変異があり、家族歴のない特発性PAHと診断された例でさえも、約20%にBMPR2遺伝子の変異が確認されている。さらに近年、Caveolin-1が遺伝性PAHの原因遺伝子の一つ加えられた。Caveolin-1は、カベオラ構成タンパクの一つで内皮細胞に多く発現している。また、Caveolinと同じくカベオラを構成しているCavin-1のノックアウトマウスでは、肺動脈圧の上昇がみられることも報告されている。このように、PAHの発症・進展には様々な遺伝子異常が関係しているが、それら遺伝子変異とPAH発症機序との関係には、いまだ不明な点が多い。この点を解明し、遺伝子変異を直接ターゲットにしたオーダーメイド治療や、遺伝子変異によるシグナル伝達異常を是正するといったPAHの根本的治療を樹立することが必要とされている。

2. 研究の目的

PAHは肺動脈血管内膜・中膜の肥厚が進行することにより肺血管抵抗が上昇し肺高血圧症をきたす疾患である。遺伝性PAHの原因遺伝子としてTGF-β/BMPスーパーファミリーの遺伝子異常が報告されているが、近年カベオラ構成蛋白であるCaveolin-1の遺伝子異常がヒトPAH患者で報告され、遺伝性PAHの原因遺伝子の一つに分類された。またCaveolinとともにカベオラを構成しているCavinファミリーの一つCavin-1を欠失させたマウスでも肺高血圧症が起こることも報告されている。

我々は、以前に心筋細胞、骨格筋細胞、血管平滑筋細胞といった筋細胞特異的に発現するCavin蛋白質MURC/Cavin-4を単離・同定した。全身MURC/Cavin-4ノックアウトマウスでは低酸素暴露による肺高血圧発症が

抑制されることを見出し、平滑筋特異的Cavin-4^{-/-}マウスでも同様の結果を得た。MURC/Cavin-4はGタンパクの一つであるGα13とCaveolin-1の結合に競合阻害することにより、Gα13/p115RhoGEF/RhoA/ROCKシグナルを介して血管平滑筋細胞の増殖・遊走を制御していることを見出した。

CavinファミリーとCaveolinファミリーは互いに細胞膜上で結合することによりCavin-Caveolin complexを形成し、細胞内シグナル伝達に相互的な作用を及ぼしていると考えられている。また、カベオラには様々なレセプターが局在しており、BMPレセプターもその一つである。血管平滑筋細胞においては、Caveolin-1とBMPR2が直接結合しており、BMPR2の細胞膜への移送と下流シグナルであるSmadのリン酸化を亢進することが報告されている。このように、Caveolin-Cavinシステムは、PAHの遺伝子異常として最も頻度の高いTGF-β/BMPスーパーファミリーと密接な関係を有していることが示唆されているが、カベオラ構成蛋白であるCaveolin-CavinシステムのTGF-β/BMPスーパーファミリーに対する役割およびPAH発症・進展の関係についてはいまだ不明である。

そこで本研究の目的は、肺高血圧症の新規治療ターゲットを視野にCaveolin-Cavinファミリータンパクの機能を包括的に解析することにより、肺動脈性肺高血圧症に対する未知の発症・進展機構ならびに退縮機構を探索すること、とした。

3. 研究の方法

Caveolin-1ノックアウトマウスはPAHを発症する。FK506は免疫抑制薬の1つだが、その少量投与はSmad活性化を引き起こし、PAH発症を抑制することが報告されている。まず、このCaveolin-1ノックアウトマウスのPAHがBMPシグナルを介しているかどうかを検討するため、浸透圧ポンプで少量FK506を持続投与することで肺高血圧症・右室肥大・肺動脈リモデリングが抑制されるかどうかを検討した。

次に、ヒト肺動脈血管内皮細胞に対してCaveolinおよびCavinファミリーの各タンパクの過剰発現もしくは発現抑制を行い、Smadのリン酸化ならびに増殖・遊走に関係するシグナル(ERKやAktなど)のリン酸化について、コントロール群と比較検討した。また、少量FK506投与にてこれらの効果が打ち消されるかどうかについても検討した。

CaveolinとCavinは複合体を形成しており、その結合を調節することで下流シグナル調節し、肺動脈のリモデリングを改善できることが期待できる。そこで、肺高血圧発症におけるCaveolin-CavinファミリーとTGF-β/BMPスーパーファミリーの相互作用を明らかにするために、ヒト肺動脈血管内

皮細胞を用いて Caveolin-1 と BMPR2 の発現や interaction における Cavin ファミリーの関与を検討した。

4. 研究成果

Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、通常酸素下飼育でも PAH の発症・進展が認められる。浸透圧ポンプで少量 FK506 を 4 週間持続投与したところ、右室収縮期圧の減弱、肺高血圧症抑制が認められ、右室肥大もコントロールマウスと比較し有意に抑制されていた。組織学的評価においても、FK506 少量投与後の Caveolin-1 ノックアウトマウスの肺組織では、コントロールマウスと比較し、有意に肺動脈肥厚の程度が軽く、肺動脈リモデリングが抑制されていた。肺組織全体では、コントロールマウスと Caveolin-1 ノックアウトマウス間で Smad1/5/9 のリン酸化に有意差は認めなかったが、Caveolin-1 ノックアウトマウスでは CD31 陽性細胞による血管内膜肥厚が FK506 少量投与にて抑制されており、FK506 は Caveolin-1 ノックアウトマウスにおいて血管内皮細胞の増殖を抑制することにより肺動脈リモデリングを抑制した、と考えられた。

次に、ヒト肺動脈血管内皮細胞を用いて Caveolin-1 と BMPR2 の関係を検討した。ヒト肺動脈血管内皮細胞に siRNA を用いて Caveolin-1 をノックダウンすると、BMP の下流シグナルである Smad 1/5/9 のリン酸化は有意に抑制され、また、Akt のリン酸化も抑制された。この Caveolin-1 ノックダウンによる Smad 1/5/9 と Akt のリン酸化の抑制は、FK506 少量投与によりリバースされたことから、Caveolin-1 ノックダウンによる Smad 1/5/9 と Akt のリン酸化抑制は BMP/Smad signaling pathway を介している可能性が示唆された。

最後に、Caveolin-1 と BMPR2 間の interaction における Cavin ファミリーの関与について、293FT 細胞を使って検討した。293FT 細胞に Caveolin-1 と BMPR2 を共発現させたところ、Caveolin-1 の共発現により BMPR2 の発現減少が認められた。この状態に Cavin-1 をさらに発現させると、Caveolin-1 による BMPR2 の発現抑制効果が減弱した。同様に、Cavin-1 の代わりに Cavin-2 の過剰発現させた場合においても Cavin-1 の過剰発現時と同様、Caveolin-1 による BMPR2 の発現抑制効果は打ち消された。

以上の結果より、肺動脈血管内皮細胞内の Caveolin-1 は、BMPR2 を介して Smad 1/5/9 および Akt のリン酸化を調節し、Cavin ファミリーである Cavin-1、Cavin-2 は、この Caveolin-1 と BMPR2 の発現や interaction を調節させることにより、肺高血圧症を抑制する可能性が示唆された。本研究結果は、Cavin/Caveolin システムが肺高血圧症の進展抑制に対する治療ターゲットとなる可能性を示しているものと考えられる。

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 3 件)

1. Miyagawa K, Ogata T, Ueyama T, Kasahara T, Nakanishi N, Naito D, Taniguchi T, Hamaoka T, Maruyama N, Nishi M, Kimura T, Yamada H, Aoki H, Matoba S. Loss of MURC/Cavin-4 induces JNK and MMP-9 activity enhancement in vascular smooth muscle cells and exacerbates abdominal aortic aneurysm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(3):587-593. 査読あり
2. Nakanishi N, Ogata T, Naito D, Miyagawa K, Taniguchi T, Hamaoka T, Maruyama N, Kasahara T, Nishi M, Matoba S, Ueyama T. MURC deficiency in smooth muscle attenuates pulmonary hypertension. *Nat Commun.* 2016;7:12417. 査読あり
3. Taniguchi T, Maruyama N, Ogata T, Kasahara T, Nakanishi N, Miyagawa K, Naito D, Hamaoka T, Nishi M, Matoba S, Ueyama T. PTRF/Cavin-1 Deficiency Causes Cardiac Dysfunction Accompanied by Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Fibrosis. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162513. 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Hideo Tsubata, Naohiko Nakanishi, Keiichi Itatani, Kuniyoshi Fukai, Hitoshi Yaku, Satoaki Matoba. The wall shear stress of the pulmonary arteries in the patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension before and after balloon pulmonary angioplasty; analysis using computational fluid dynamics. 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. Feb 27-28/March 1, 2018, Nice, France.
2. Masahiro Nishi, Takehiro Ogata, Naohiko Nakanishi, Takeru Kasahara, Yusuke Higuchi, Satoaki Matoba. Myocardial Ischemia-reperfusion injury is reduced in MURC/Cavin-4-deficient mice. European Society of Cardiology Congress 2017. 2017 Aug. 26-30, Barcelona, Spain
3. Takeru Kasahara, Takehiro Ogata, Naoki Maruyama, Naohiko Nakanishi, Masahiro Nishi, Yusuke Higuchi, Akira Sakamoto, Satoaki Matoba. SDPR/Cavin-2 Deficiency Exacerbates Hypoxia-induced Pulmonary Arterial Hypertension in Mice with an Increase in NOx Production and a Decrease in Caveolin-1. The American Heart Association's Scientific Sessions 2017. 2017 Nov. 11-15, Anaheim, CA, USA

4. Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Naoki Maruyama, Masahiro Nishi, Naohiko Nakanishi, Akira Sakamoto, Hideo Tsubata, Satoaki Matoba. SDPR/Cavin-2 Modulates Apoptosis via PTEN/Akt Signaling Pathway and Deteriorates Cardiac Function in Pressure Overload-induced Heart Failure. The American Heart Association's Scientific Sessions 2017. 2017 Nov. 11-15, Anaheim, CA, USA
5. 中西 直彦、津端 英雄、笠原 武、樋口 雄亮、西 真宏、小形 岳寛、的場 聖明. Caveolin-Cavinシステムによる肺高血圧症発症機序の解明. 第2回肺高血圧・肺循環学会. 2017年6月2日, 札幌. 北海道
6. Takeru Kasahara, Takehiro Ogata, Naohiko Nakanishi, Naoki Maruyama, Masahiro Nishi, Yusuke Higuchi, Satoaki Matoba. SDPR/Cavin-2 Deficiency Aggravates Hypoxia-induced Pulmonary Arterial Hypertension with Caveolin-1 Reduction. 第81回日本循環器学会学術集会 2017年3月17-19日 石川県金沢市
7. Masahiro Nishi, Takehiro Ogata, Naohiko Nakanishi, Takeru Kasahara, Naoki Maruyama, Yusuke Higuchi, Satoaki Matoba. MURC/Cavin 4 Deficiency Prevents Cardiac Dysfunction Induced by Ischemia reperfusion Injury. 第81回日本循環器学会学術集会 2017年3月17-19日 石川県金沢市
8. Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Masahiro Nishi, Naohiko Nakanishi, Akira Sakamoto, Satoaki Matoba. SDPR/Cavin-2 Deficiency Attenuates Interstitial Fibrosis and Preserves Cardiac Function in Pressure Overload-induced Heart Failure in Mice. 第82回日本循環器学会学術集会 2018年3月23-25日 大阪府大阪市
9. Hideo Tsubata, Naohiko Nakanishi, Kuniyoshi Fukai, Kan Zen, Takeshi Nakamura, Tetsuhiro Yamano, Hirokazu Shiraishi, Takeshi Shirayama, Satoaki Matoba. Angioscopic evaluation of organized thrombus in chronic thromboembolic pulmonary hypertension during balloon pulmonary angioplasty. American Heart Association (米国心臓病学会学術会議) Scientific Session 2016 ,2016 Nov 12-16, New Orleans, USA.
10. Nishi M, Ogata T, Nakanishi N, Kasahara T, Maruyama N, Higuchi Y, Matoba S . MURC/Cavin-4Deficiency Reduces Infarct Size and Preserves Cardiac Function in a Mouse Model of Ischemia-Reperfusion Injury. American Heart Association (米国心臓病学会学術会議) Scientific Session 2016 ,2016 Nov 12-16, New Orleans, USA.
11. Masahiro Nishi, Takehiro Ogata, Naohiko Nakanishi, Takeru Kasahara, Naoki Maruyama, Yusuke Higuchi, Satoaki Matoba.

MURC/Cavin-4 Deficiency Protects Murine Heart from Cardiac Ischemia-reperfusion Injury. 第 33 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016) 2016 , Dec , Tokyo.

〔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

中西 直彦 (Nakanishi Naohiko)
京都府立医科大学・医学研究科・循環器内科学・助教
研究者番号：10637911

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：