

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09869

研究課題名(和文) マクロファージのmRNAスプライシングを標的とした生活習慣病治療戦略の構築

研究課題名(英文) Establishment of the strategy for treatment of lifestyle-related diseases by targeting macrophage mRNA splicing

研究代表者

宮崎 章 (Miyazaki, Akira)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70253721

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)：カルパスタチンは、カルシウム依存性タンパク質分解酵素であるカルパインの内因性阻害物質である。カルパスタチンを血管内皮特異的に過剰発現したマウスでは、皮膚の創傷治癒が遅延し、ケラチノサイト層の菲薄化、細胞外マトリックスの減少、筋線維芽細胞の減少を認めた。また血小板由来増殖因子B(PDGF-B)やPDGF- β 受容体の発現低下を認め、PDGF-B塗布による創傷治癒促進効果は消失していた。以上より、血管内皮細胞のカルパインはPDGF- β 受容体シグナリングを介して創傷治癒と組織の線維化を促進していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、動脈硬化発症の分子機構を解明する過程で、細胞内カルシウム依存性タンパク質分解酵素であるカルパインが動脈硬化促進因子として作用していることを明らかにしてきた。さらにカルパインの病態生理学的意義を解明する過程で、皮膚の創傷治癒過程においてはカルパインが治癒促進因子として作用していることを本研究で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transformation of fibroblasts to myofibroblasts has a central role in fibrogenic responses in dermal wound healing. Calpastatin, an endogenous inhibitor of calpains, is enriched in pre-existing vessels, but not in newly-formed vessels in mouse wound sites. Overexpression of calpastatin to endothelial cells (ECs) delays wound healing in mice, together with reduction in keratinocyte layer, extracellular matrix deposition, and myofibroblast accumulation. Expression of PDGF-B and PDGF-beta receptor declined by calpastatin transduction. Topical application of PDGF-BB accelerates wound healing in control mice, which was cancelled by calpastatin transduction. Thus, calpain systems in ECs have a key role in PDGF-beta receptor signaling in fibroblasts, EC-driven myofibroblast differentiation and subsequent fibrogenic responses.

研究分野：生化学

キーワード：創傷治癒 カルパスタチン カルパイン PDGF受容体

1. 研究開始当初の背景

皮膚の創傷治癒は、止血、炎症、血管新生、再上皮化、細胞外マトリックスのリモデリングなどを含む非常に複雑なプロセスである。肉芽組織の肥大や過剰なコラーゲンの産生などの過度の創傷治癒反応により、癒痕形成をきたすことがある一方、創傷治癒が障害されると創傷の閉鎖が遅延し、ときに皮膚の潰瘍を形成する。糖尿病患者ではしばしば創傷治癒が遅延し、下肢の潰瘍形成に至ることがある。

皮膚の創傷治癒は、止血、炎症、増殖およびリモデリングの4つの段階からなる。止血の段階では、血小板が創傷部位に集積しフィブリン血栓を形成する。血小板は血小板由来増殖因子 (Platelet-derived growth factor; PDGF) をはじめとする種々の成長因子を分泌する。炎症の段階では、好中球、次いで単球由来の炎症性M1型マクロファージが創傷部位に侵入し、炎症性サイトカインを分泌する。増殖の段階では、再上皮化や貪食細胞による死細胞や細菌の除去がおこる。組織修復性のM2型マクロファージや活性化された線維芽細胞である筋線維芽細胞 myofibroblast が創傷部位に集積し、種々の成長因子を分泌して炎症反応が抑制される。筋線維芽細胞はコラーゲンに富む細胞外マトリックスを分泌し、線維化を促進して組織の硬度を増す。創傷部位は一般に低酸素状態にあり、これが組織の修復に重要な血管新生の引き金となる。

2. 研究の目的

カルパインはカルシウム依存性の細胞内タンパク質分解酵素であり、物理的ストレス、サイトカイン、成長因子、低酸素などによって活性化される。我々は血管新生におけるカルパインの役割に着目し、カルパインは血管内皮細胞の内因性キナーゼインヒビターである suppressor of cytokine signaling 3 の分解を促進することにより、腫瘍血管や酸素誘発性網膜症の病的血管新生を促進することを明らかにした (Miyazaki T, *et al.* Circulation Research 2015;116:1170)。近年、皮膚の創傷治癒においてもカルパインシステムの関与が報告されていることから、今回我々は、創傷部位においてもカルパインが血管新生を促進する役割を持つのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するため、カルパインの内因性阻害物質であるカルパスタチンを血管内皮細胞特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成し、動物実験ならびに細胞実験を行った。

3. 研究の方法

(1) Neomycin 耐性遺伝子を loxP 配列で挟んだ LNL 配列の直後にカルパスタチンの配列を挿入したトランスジーンを導入したトランスジェニックマウス (LNL-CAST-Tg) を作出した。Tie2 プロモーター制御下で血管内皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する Tie2-Cre-Tg マウス (Jackson laboratory) と LNL-CAST-Tg マウスを交配することで Neomycin 耐性遺伝子を切り出し、血管内皮細胞特異的にカルパスタチンを過剰発現する遺伝子改変マウス (CAST-EC-Tg) を確立した。CAST-EC-Tg ならびに対照マウス (LNL-CAST-Tg) の背部を剃毛し、滅菌したバイオプシーパンチで直径 5 mm の創傷を作成した。創傷治癒の速度を両者で比較し、創傷治癒に対する血管内皮細胞カルパスタチンの効果を検討した。

(2) CAST-EC-Tg マウスならびに対照マウスの創傷部位における線維化を免疫組織化学的に検討し、コラーゲン I、フィブロネクチン、PDGF-B の遺伝子発現を定量的 PCR で検討した。CAST-EC-Tg マウスならびに対照マウスの創傷部位に PDGF-BB を含有する軟膏を塗布し、創傷治癒促進効果を検討した。

(3) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) とヒト皮膚線維芽細胞 (human dermal fibroblasts; HDFs) を共培養し、HDFs の活性化 (筋線維芽細胞への形質転換) に対する血管内皮細胞カルパスタチンの役割を検討した。CAST-EC-Tg マウスならびに対照マウスから単離したマウスの肺微小血管内皮細胞 (murine pulmonary microvascular endothelial cells; MPMECs) とマウス皮膚線維芽細胞 (mouse dermal fibroblasts; MDFs) と共培養し、MDFs の活性化における血管内皮細胞カルパスタチンの役割を検討した。

4. 研究成果

(1) 内皮細胞特異的カルパイン過剰発現による創傷治癒の遅延

CAST-EC-Tg マウスの創傷部面積の減少速度 (治癒速度) は、対照マウスと比較して有意に遅延した。CAST-EC-Tg マウスの創傷部位における K5 陽性のケラチノサイト層は、対照マウスと比較して有意に菲薄であった。予想に反して、CAST-EC-Tg マウスの創傷部位における新生血管は、対照マウスとの間に有意差を認めなかった。また白血球の浸潤に関しても、CAST-EC-Tg マウスと対照マウスとの間に有意差を認めなかった。

(2) 創傷部位の線維化ならびに PDGF- β 受容体シグナリングにおける血管内皮細胞カルパインの役割

Masson Trichrome によるコラーゲン染色では、対照マウスの顕著なコラーゲン増生に対して *CAST-EC-Tg* マウスのコラーゲン増生は限定的であった。定量的 PCR による解析では、*CAST-EC-Tg* マウスの創傷部位におけるコラーゲン I ならびにフィブロネクチンの遺伝子発現は、対照マウスよりも有意に低レベルであった。免疫組織化学的検討によると、対照マウスにおける α -smooth muscle actin 陽性の筋線維芽細胞の増生は肉芽組織に顕著であったが、*CAST-EC-Tg* マウスでは限定的であった。 α -smooth muscle actin 遺伝子発現も、対照マウスに比し *CAST-EC-Tg* マウスでは限定的であった。

CAST-EC-Tg マウスの創傷部位における PDGF-B 遺伝子発現は、対照マウスよりも有意に低レベルであった。免疫組織化学染色では、*CAST-EC-Tg* マウスの筋線維芽細胞における PDGF-B 受容体の発現は、対照マウスよりも有意に低下していた。PDGF-BB を含有する軟膏を創傷部位に塗布すると、対照マウスでは創傷面積の減少速度（治癒速度）が促進されたが、*CAST-EC-Tg* マウスでは促進効果を認めなかった。

(3) カルパインと内皮依存性の線維芽細胞活性化（筋線維芽細胞への形質転換）

血管内皮細胞と線維芽細胞との直接的コンタクトを介した線維芽細胞活性化の機序を検討した。HUVECs と HDFs を共培養すると、筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin 遺伝子 (*ACTA2*) や PDGF-B 受容体遺伝子 (*PDGFRB*) の発現が増加した。HUVECs におけるカルパイン発現を small interfering RNA (siRNA) によりノックダウンすると、*ACTA2* や *PDGFRB* の発現が低下した。免疫化学染色では、HDFs 単培養に比し、HDFs/HUVECs 共培養下の HDFs における α -smooth muscle actin や PDGF-B 受容体の発現が顕著であった。

対照マウスから MPMECs を単離し、MDFs と共培養したところ、 α -smooth muscle actin 陽性の筋線維芽細胞は MPMECs 周辺に群生した。一方、MDFs を *CAST-EC-Tg* マウスから単離した MPMECs を共培養すると、MPMEC 周辺の筋線維芽細胞の群生は顕著に抑制された。

以上の結果から、血管内皮細胞のカルパインは、線維芽細胞の PDGF- β 受容体シグナリングを介して組織の線維化ならびに創傷治癒を促進していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyazaki T, Haraguchi S, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Endothelial calpain systems orchestrate myofibroblast differentiation during wound healing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2037-2046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201800588RR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki T, Miyazaki A.	4. 巻 74
2. 論文標題 Emerging roles of calpain proteolytic systems in macrophage cholesterol handling.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 3011-3021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-017-2528-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki T, Miyazaki A.	4. 巻 4
2. 論文標題 Defective protein catabolism in atherosclerotic vascular inflammation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2017.00079.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki T, Miyazaki A.	4. 巻 25
2. 論文標題 Dysregulation of calpain proteolytic systems underlies degenerative vascular disorders.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.RV17008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 宮崎 章	4. 巻 268
2. 論文標題 動脈硬化病変形成におけるマクロファージの役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 329-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮崎拓郎, 宮崎 章
2. 発表標題 カルパインプロテアーゼファミリーによる血管系疾患の制御
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎拓郎, 宮崎 章
2. 発表標題 動脈硬化病変マクロファージに潜むタンパク質分解機構の制御不全
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyazaki T, Haraguchi S, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A.
2. 発表標題 Endothelial calpain system orchestrate myofibroblast differentiation during wound healing.
3. 学会等名 20th International Vascular Biology Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎 拓郎、雷 小峰、金山 朱里、宮崎 章
2. 発表標題 動脈硬化病変マクロファージの飲作用を介したLDLコレステロール取込み機構
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎 拓郎、礪波一夫、秦勝志、相内敏弘、大西紘二、雷小峰、金山朱里、竹屋元裕、板部洋之、反町 洋之、栗原裕基、宮崎章
2. 発表標題 カルパインファミリーは動脈硬化病変を制御する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎 拓郎、原口 省吾、森戸 大介、金山 朱里、宮崎 章
2. 発表標題 リンパ管内皮細胞を起点とした動脈硬化症の発症機構
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎拓郎、原口省吾、金山朱里、宮崎章
2. 発表標題 脂質異常症に起因するリンパ管内皮細胞のタンパク質恒常性低下は動脈硬化症を増悪化する
3. 学会等名 第61回 日本脂質生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤須里沙子、宮崎拓郎、冨塚祐希、宮崎章
2. 発表標題 血管内皮カルパインが耐糖能異常におよぼす影響
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----