

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08517

研究課題名(和文) 新規生体イメージングモデルを用いたJCADによる血栓形成制御機構の解明

研究課題名(英文) In vivo imaging study of JCAD in the pathogenesis of DVT

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1. JCADの血栓症発生への影響の解明 JCAD^{-/-}マウスと野生型マウスにおけるDVTサイズを比較する。具体的には下大静脈を結紮後、day 4, 7, 14に血栓サイズをJCAD^{-/-}マウスと野生型マウスの間で比較する。JCAD^{-/-}マウスでは、DVTサイズが野生型と比べて、大型になるという結果を得た。2. 生体イメージングによるJCADの血栓形成制御機構の解明 我々は、JCAD^{-/-}マウスにおいて、実際に二光子顕微鏡などを用いた生体イメージング技術を応用することに成功した。

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)によって、心筋梗塞に関連する新規の分子としてJCADが同定されたが、その機序は不明のままである。申請者はこれまでのJCAD研究(基盤研究C: 2013-2015, 2016-2018)の中で、(1)心筋梗塞は動脈血栓症であること、(2)JCADは血管内皮の接着因子であること、(3)トロンピン刺激でリン酸化修飾を受けることから、JCADは血管内皮において血栓形成を制御しているのではないかと着想した。そのような中で、我々は新規に生体血栓イメージングモデルを確立し、そのモデルをJCADKOマウスに応用することに成功した。

研究成果の概要(英文)：1. We assessed the thrombus size between WT and JCAD^{-/-} mice. We compared the DVT mass size at the day 4, 7, and 14 after the IVC ligation. We observed larger thrombus size in JCAD^{-/-} mice.

2. We tried to establish in vivo imaging of DVT formation and organization process using our own in vivo murine DVT imaging model (Okano M, Hara T et al. JACC Basic Transl Sci 2020). We succeeded in imaging thrombus formation and organization process in vivo using two photon microscopy.

研究分野：循環器内科

キーワード：血栓

1. 研究開始当初の背景

近年のヒトゲノムワイド関連研究(GWAS)によって、心筋梗塞に関連する新規の分子として JCAD (Junctional protein associated with Coronary Artery Disease)が同定されたが、その機序は不明のままである。申請者はこれまでの JCAD 研究 (基盤研究 C: 2013-2015, 2016-2018) の中で、(1)心筋梗塞は動脈血栓症であること、(2)JCAD は血管内皮の接着因子であること、(3)トロンビン刺激でリン酸化修飾を受けることから、JCAD は血管内皮において血栓形成を制御しているのではないかと着想した。そのような中で、我々は新規に生体血栓イメージングモデルを確立した。血栓の病態は「血流、内皮、凝固」など複数因子が関わり、単一細胞の培養系や死後の病理解析では困難である。この生体血栓イメージング系により JCAD の血栓形成への影響を生体下に可視化、解明し、心筋梗塞の発症機序に迫りたい。

血栓症は「時間」や「分」の単位でおこる急性イベントである。血栓はまさに「秒」の単位で生体内に形成され、その後も「日」の単位で種々の炎症細胞が活動する場所をダイナミックに変えながら、器質化していく。このように動的な疾患概念を理解する方法として近年、二光子顕微鏡による生体イメージング研究が注目されている。脳神経、皮膚、免疫領域において研究が進んでいるが、体内深部にあり、拍動する臓器を扱う循環器領域では生体下の観察が困難である。そのような中で我々は独自の生体血栓イメージングモデルの開発に成功した。

近年、遺伝子解析に基づいた心血管病関連遺伝子の探索が広く行われている。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が進行しているが、心筋梗塞の発症機序は不明のままである。

JCAD (junctional protein associated with coronary artery disease、旧名 KIAA1462)は、ヒトゲノムワイド研究で、冠動脈の血栓症である、心筋梗塞と関連する-①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-②し、VE-Cadherin 依存的に細胞接着部位に局在する (BBRC, 2011、図 1)。我々は先行研究、「血管内皮接着因子 JCAD が心血管病発病に及ぼす影響の解明」(基盤研究 C, 2013-2015)、及び「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-」(基盤研究 C、2016-2018 終了予定)の中で、JCAD の機能を解析し、その一つとして血管新生を制御することを見出した(ATVB. 2017;37:1667-1673)。それ以外の機能を探索する中で、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(Blood. 2014)、この JCAD もリン酸化される-③ことも報告された。

以上、①-③から、「JCAD は血管内皮において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、血栓症の発症を制御しているのではないかと着想した。生体イメージングを駆使して、JCAD の血栓制御機構を解明し、「心筋梗塞の発症メカニズム」という重要課題の解明に迫りたい。

2. 研究の目的

静脈血栓（DVT）は「凝固因子、血管内皮、血流」などの因子がそれぞれ異なる部位、時間で複合的に働くことで形成される。それゆえ、単一細胞の培養系や、位置情報のない生化学的解析、死後の病理サンプルでは疾患理解は困難である。申請者はこれまで「生体イメージング」によって血栓の病態の可視化、解明に挑戦してきた（Hara et al. *Circulation*. 2014, Hara et al, *Eur Heart J*. 2017）が、最近、ヒトDVTに類似した新規のDVTイメージングモデルの開発に独自に成功した。この新規DVTモデルによって、複数の細胞（血小板や赤血球など）や分子（フィブリン、組織因子など）の動態を時間軸をもって、観察、解析し、DVTの形成から器質化に至るまでの病態を解明したい。

3. 研究の方法

「血栓症」を対象とした研究は、全世界的に、凝固因子や血小板に注目した *in vitro* でのいわゆる「血液内科学」的な研究が主である。しかし、「血栓症」は Virchow の 3 徴（血流うっ滞、血管壁の傷害、血液凝固能の亢進）が示すように、生体内での統合的、複合的な抗血栓作用のバランスの破綻により発症することは古くから知られており、*in vivo* での個体レベルでの研究が重要である。

そこで、申請者らは以下のアドバンテージを最大限に活かし、JCAD の血栓形成における役割を生体イメージングを用いて解明する。

4. 研究成果

1. JCAD の血栓症発生への影響の解明

まず、JCAD が血栓形成を制御しているか否かを直接的に確認するために、JCAD^{-/-}マウスと野生型マウスにおける DVT サイズを比較する。具体的には下大静脈を結紮後、day 4, 7, 14 に血栓サイズを JCAD^{-/-}マウスと野生型マウスの間で比較する。我々は day4,7 において、比較を行ったが、JCAD^{-/-}マウスでは、DVT サイズが野生型と比べて、大型になるという結果を得た。

2. 生体イメージングによる JCAD の血栓形成制御機構の解明

研究分担者の原哲也が独自に開発した血栓モデルにより、血栓が形成される瞬間をリアルタイムに観察可能となった。

血栓形成には白血球の血管内皮への接着が重要であることから、白血球をロダミン 6G で蛍光標識し、血栓形成の瞬間における白血球の動態を生体下に可視化、定量する。その他、蛍光標識抗体を用いて接着因子やフィブリン、MMPsense による炎症活性などを、生体下の血栓で可視化する。すなわち、血

栓形成におけるこれら白血球浸潤や接着因子、凝固カスケードから炎症活性を JCAD^{-/-}マウスにおいて解析し、JCAD が血栓形成のどの過程に影響しているかを明らかにする。

この高分解能イメージを時間軸をもって観察し、これら白血球接着、トロンビン-フィブリン凝固、炎症活性といった異なる時空間スケールでの病態を JCAD^{-/-}マウスで解析することで JCAD の血栓形成への影響を生体下に直接的に明らかにする。今回、我々は JCAD ノックアウトマウスに我々の生体血栓イメージング技術を応用することに成功した。

3. 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

近年、血管内皮細胞におけるトロンビン刺激によるリン酸化分子の網羅的研究の中で JCAD も偶然同定された (Blood. 2014)。それゆえ、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を分子細胞学的に検討する。具体的にはトロンビン刺激後の組織因子や PAI-1 などの向血栓性分子の発現変化や、NFκB や Erk, Jun ファミリーなどのシグナル伝達経路を比較することにより、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。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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okano Mitsumasa, Hara Tetsuya, Nishimori Makoto, Irino Yasuhiro, Satomi-Kobayashi Seimi, Shinohara Masakazu, Toh Ryuji, Jaffer Farouc A., Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vivo Imaging of Venous Thrombus and Pulmonary Embolism Using Novel Murine Venous Thromboembolism Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 344 ~ 356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2020.01.010	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0件

〔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
研究分担者	原 哲也 (Hara Tetsuya) (70547504)	神戸薬科大学・薬学部・准教授 (34512)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関