

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790076

研究課題名 (和文) 平滑筋細胞特異的接着分子 Hic-5 欠損マウスの解析

研究課題名 (英文) Characterization and functional analyses of Hic-5 deficient mice

研究代表者

金山 朱里 (KANEYAMA SHURI)

昭和大学・医学部生化学・講師

研究者番号：10338535

研究成果の概要 (和文) : Hic-5 は約 15 年前に過酸化水素と TGF- β に応答し発現誘導される遺伝子としてクローニングされた。本研究では、作製した hic-5 ノックアウトマウスを用いて Hic-5 の動脈硬化病変形成過程への直接的な関与を検討した。具体的には、大腿動脈にバルーン血管障害モデル術を行ったところ傷害部位の中膜平滑筋層の回復抑制、および血管内腔側に形成される新生内膜肥厚が促進という変化が現れた。その理由として、ノックアウトマウス血管病変では、慢性期に入っても持続的にアポトーシスが起きていたことが挙げられる。

研究成果の概要 (英文) : Hic-5 (hydrogen peroxide-inducible clone-5) is a focal adhesion adaptor protein proposed as a candidate for a mediator of mechanotransduction. In the present study, we generated Hic-5-deficient mice by targeted mutation. Mice lacking Hic-5 are viable and fertile, and show no obvious histological abnormalities including vasculature. However, after wire injury of the femoral artery in Hic-5 deficient mice, histological recovery of arterial media was delayed due to enhanced apoptosis of vascular wall cells, whereas neointima formation was enhanced. Stretch-induced apoptosis was enhanced in cultured vascular smooth muscle cells from Hic-5 deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：Hic-5、ノックアウトマウス、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内で細胞は、細胞内外の情報を受け取り、隣り合う細胞や細胞外基質 (ECM) と接着することで特有の形態を獲得している。これらの過程は、細胞が臓器や組織で特有の機能を発揮するために必須であり、その過程に異常が生じると循環器疾患、癌、神経・精神疾患など多様な疾患が引き起こされる。すなわち、細胞接着の制御機構を解明することは、様々な疾患の治療法を確立する上で必須の問題であると考えられる。

(2) 本研究で解析を行う Hic-5 遺伝子は、ECM と細胞の接着点にある細胞接着斑タンパク質をコードし、同じ LIM ドメインファミリーに属するパキシリン (Paxillin) と高い相同性を示すアダプター蛋白質である。Hic-5 遺伝子は約 15 年前に過酸化水素と TGF- β に応答し発現誘導される遺伝子として本研究室でクローニングされた。

(3) Hic-5 蛋白質が酸化ストレス応答性の NES (核外排出シグナル) によって通常は細胞接着斑と核間をシャトルしていることや、オリゴマー形成能を持つこと、酸化ストレス存在下では核に蓄積して遺伝子発現の制御に関与し、活性酸素 (ROS) のシグナル伝達に機能することを報告している。

(4) Hic-5 はマウスおよびヒト組織で、血管、消化管、子宮などの平滑筋細胞特異的に発現が観察される分子であることから、正常平滑筋細胞での Hic-5 の機能解析を目的に平滑筋細胞の主機能の一つである細胞収縮能への関与を、機械的伸展刺激装置を用いて検討し、主に細胞接着斑に局在する Hic-5 が細胞進展刺激によりアクチンストレスファイバ

ー上に移行して細胞の収縮能を制御することをすでに明らかにしている。

(5) 複数のマウス動脈硬化モデル血管病変部組織を用いた解析から、Hic-5 は病変部の新生内膜を構成する脱分化型平滑筋細胞に高発現していることを見出した。

(6) これまでの動脈硬化発症に関する詳細な解析から、発症初期に血管内皮細胞が障害をうけることで生ずる病変が最終的に成熟病変となる時には、血管中膜平滑筋細胞のフェノタイプ変換 (phenotypic modulation) が起こり、増殖した脱分化型平滑筋細胞が運動能 (遊走能) を獲得して血管内膜側に移動し、血管内膜肥厚の原因となることが明らかになっている。このフェノタイプ変換を起こした血管平滑筋細胞は分子レベルでは、カルポニン、カルデスモン、SM22 α 、 α -SM アクチン、 α 1 インテグリンなど、発現が変化する様々な遺伝子が、既に脱分化型平滑筋細胞の分子マーカーとして同定されている。

(7) 脱分化型平滑筋細胞に関する報告は平滑筋細胞が脱分化型に変化した結果、観察できるようになる変化に関する事象であり、脱分化という現象やその形質獲得ステップに積極的に関与し、かつ生体で実際に新生病変組織の形成度合いを変化させる分子に関する報告は極めて少ない。

(8) Hic-5 の病変部脱分化型平滑筋細胞特有の形質への積極的な関与の有無を明らかにすることを目的とし、ラット総頸動脈へバルーン血管障害モデルの手術を行う際にアデノウイルスベクターを用いて血管壁の細胞に hic-5 遺伝子を発現させ、新生内膜肥厚度

の変化を検討した。その結果、Hic-5 の強制発現により病変組織である新生内膜の肥厚抑制が観察され、Hic-5 の動脈硬化病変形成過程への関与が示された。この結果から Hic-5 が生体で実際に血管病変部新生組織の形成度を変化させる能力を有する分子であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) Hic-5 の生理機能解明を目的とし、作製を試みてきた Hic-5 遺伝子のホモ欠損マウスが平成19年度に完成した。Hic-5 欠損マウスはメンデルズムに従って誕生し、発育、生殖能は共に正常である。本研究では、Hic-5 が生体内で正常、および動脈硬化病変部の血管平滑筋細胞で高い発現を示すことや、血管病変の誘因にもなりうる機械的伸展ストレスに応答して細胞内での局在場所を変化させる点に着目し、このターゲティングマウスを用いて、Hic-5 の血管恒常性維持への関与の有無や、動脈硬化病変の進行度など血管を中心に Hic-5 の生理的役割を解析する。また Hic-5 欠損マウスから分離した培養平滑筋細胞を用いて、*in vitro*での解析も病変部の脱分化型平滑筋細胞の特性に注目し、同時進行で行う。

(2) Hic-5 欠損マウス大腿動脈にヒト血管拡張療法 (PTCA) の術後再狭窄モデル (Balloon-injured model) の手術を施行して血管を損傷させた際、傷害部位の中膜平滑筋層の病状悪化、および血管内腔側に形成される新生内膜肥厚が促進した組織像が観察されている。さらに新生内膜の構成成分が野生型マウスとは異なり血栓像が多く見られる。Hic-5 は以前、巨核球から血小板への最終分化過程で発現が急激に上昇し、成熟血小板内に発現することが報告された。これらのことから、ターゲティングマウスを用いて Hic-5 の血管恒常性維持への関与と、血管障

害度の変化を中膜平滑筋層という側面から見当する。その結果から、酵素活性を持たないアダプター分子による細胞接着制御機構が血管生理の制御において重要な役割を持つことを示すとともに、動脈硬化発症に関与する接着シグナルの新たな分子的背景の一旦を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Hic-5 欠損マウスを用いて、血管を中心に Hic-5 の生理的役割を解析した。具体的には Hic-5 の正常血管機能への関与や、術後再狭窄モデル術を利用し動脈硬化病変の進行度について調べた。さらに Hic-5 欠損マウスの病変血管で見られる変化はどのような分子メカニズムに基づくのか、平滑筋細胞性質の変化から検討した。Hic-5 欠損マウスから分離した培養平滑筋細胞を同時に利用した。

(1) *In vivo*

① 血管恒常性維持への関与

個体内での血管恒常性維持の基本的な情報として、マウスの最高血圧・最低血圧、および血管の収縮能を測定した (テイル-カフ測定機、マグヌス法)。さらに血管壁の厚さや平滑筋層の微細構造変化を電子顕微鏡で観察、分化マーカーや血管壁構成 ECM 抗体で染色し平滑筋細胞の分化状態や血管構造に変化がないか検討した。

② 動脈硬化病変形成過程への関与

動脈硬化形成術としてヒト血管拡張療法 (PTCA) の術後再狭窄モデルを用いた。Hic-5 欠損マウス大腿動脈に施術し血管を損傷させ、手術後急性期および慢性期の血管病変を解析した。中膜損傷度や血管内腔側に形成される新生内膜の進行度を定量し数値化することが可能である。それぞれの時期の血管壁構成細胞のアポトーシス頻度、血管中膜および新生内膜組織の平滑筋細胞分化マーカーの発現量

を調べた。

(2) In vitro

Hic-5 による細胞骨格系制御

Hic-5 欠損マウスから分離した培養平滑筋細胞や胎児繊維芽細胞を用いた解析から、アクチン骨格に変化がおきていることが最近見出された。ターゲティングマウスより分離した平滑筋細胞に、血管病変の誘因となる酸化ストレスや、機械的伸展ストレス（シリコン膜上に培養した細胞に「細胞伸展システム」を用いて血管拡張療法と等しい 200%の伸展刺激を発生させる）を負荷し、アクチンフィラメントの形成状態そのものに変化が観察されるか FITC-phalloidin 染色により調べた。同刺激によるアポトーシス誘発頻度や細胞接着斑分子の細胞内局在についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) In vivo

① 血管恒常性維持への関与

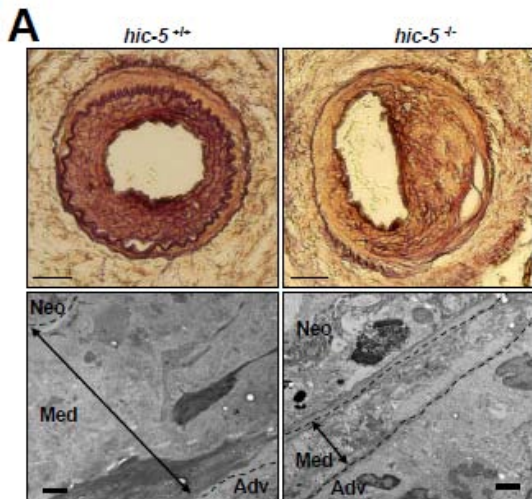
大動脈や大腿動脈などの筋性動脈を用いて、弾性板の厚さおよび構造を調べるために EVG 染色を、血管平滑筋に高く発現するタンパクの発現変化を調べる目的で免疫染色を、細胞外マトリックスの状態や平滑筋細胞の微細構造を比較するために電子顕微鏡観察を行った。野生型マウスと *hic-5* 欠損マウスで中膜平滑筋細胞の状態や割合、弾性板の様子に目立った変化を認めることはできなかった。さらに平滑筋細胞分化マーカーである α -SMA で染色を行ったが、野生型マウスと *hic-5* 欠損マウス間の中膜で α -SMA の発現に変化はなく正常な分化型平滑筋細胞層が保持されていると考えられた。また予備的な結果ではあるが、血圧にも大きな差は見られなかった。以上の結果から、恒常状態の血管で構造上、生理的機能上 *hic-5* 欠損マウスで

は異常が起きていないことが明らかとなった。

② 動脈硬化病変形成過程への関与

平常状態での *hic-5* 欠損マウスの血管では野生型マウスと組織学上非常に似ているが、動脈硬化巣形成時など、血管に負荷が加わると Hic-5 の欠損によって血管の修復応答に何らかの影響が出るのではないかと考え、さらに Hic-5 の詳細な機能を調べるため、野生型マウスと *hic-5* 欠損マウスの大腿動脈を用いてヒトバルーン血管傷害モデル形成術を行った。傷害 4 週間後の野生型マウスと *hic-5* 欠損マウスの血管を EVG 染色により観察したところ、*hic-5* 欠損マウスの血管は内弾性板 (IEL) と外弾性板 (EEL) の境目が分からないほど中膜が薄くなっているものが多かった。その他にも中膜層は観察されるものの、無細胞性中膜である血管が存在していた。そこで実際に病変部分の細胞或いはその周辺成分にどのような変化が起こっているのか詳しく調べるため、透過電子顕微鏡で傷害 4 週間後の中膜の観察を行った。その結果、野生型マウスでは中膜層に厚みがあり、IEL と EEL の間は平滑筋細胞や細胞外マトリックスで満たされており、血管の傷害が修復されていた。一方、*hic-5* 欠損マウスでは内弾性板も外弾性板も伸びて厚みがなくなり、中膜層の平滑筋細胞はごくわずかししか観察できず、細胞や細胞外マトリックスが乱雑に入り混ざった様な状態であった (A)。新生内膜の状態も *hic-5* 欠損マウスでは一般的に野生型マウスでは認められない異常所見が観察された。具体的には、無細胞性の血栓で構成された新生内膜を持つ血管が手術マウス 9 匹中 5 匹に見られた。中膜の厚さは *hic-5* 欠損マウス ($13567.3 \pm 8141.8 \mu\text{m}^2$, $n=5$) は、野生型マウス ($41053.2 \pm 14327.9 \mu\text{m}^2$, $n=4$) に比べて 3 分の 1 の厚さであった (Fig. 5C; $P <$

0.05)。



よって、Hic-5 欠損が血管傷害後に与える影響として、損傷した中膜が回復し難いこと、新生内膜肥厚が異常な状態で促進することが明らかとなった。

(2) In vitro

Hic-5 による細胞骨格系制御

hic-5^{-/-} マウスで観察される血管傷害に対する中膜の著しい損傷のメカニズムとして、アポトーシスの亢進が原因である可能性が浮上した。さらに *hic-5*^{-/-} マウスから分離した血管平滑筋細胞は、進展刺激により容易にアポトーシスを引き起こすことから、アポトーシス頻度上昇の原因として、メカニカルストレスの関与が示された。

本研究により、国内外で初めて *hic-5* 欠損マウスの作製がなされ、かつ表現形が見出された。また動脈硬化病変形成において Hic-5 を介した新規細胞接着シグナルの関与を提唱した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Kim-Kaneyama JR, Wachi N, Sata M, Enomoto S, Fukabori K, Koh K, Shibamura

M, Nose K. Hic-5, an adaptor protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 376(4), 2008, 682-7

- ② Tanaka K, Sata M, Natori T, Kim-Kaneyama JR, Nose K, Shibamura M, Hirata Y, Nagai R. progenitor cells contribute to neointimal formation in nonirradiated chimeric mice. *FASEB J.* 査読有 22(2), 2008, 428-36

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 金山 朱里、細胞接着斑アダプター分子 Hic-5 のノックアウトマウス作製と解析、日本分子生物学会年会 (BMB2008)、2008, 12, 12、神戸
- ② 本郷 茂樹、渡部 琢也、有田 茂子、金山 朱里、宮崎 章 ヒトマクロファージからのコレステロール搬出に対するレプチンの抑制作用 日本脂質生化学会 2009, 7、名古屋
- ③ 金山 朱里、Hic-5, an adaptor protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo、日本動脈硬化学会、2009. 7. 17、下関

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金山 朱里 (KANEYAMA SHURI)
昭和大学・医学部生化学・講師
研究者番号：10338535

(2) 連携研究者

竹田 直樹 (TAKEDA NAOKI)
熊本大学 生命資源研究 支援センター
動物資源開発研究部門 技術開発分野

・助教

研究者番号：90304998