

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390078

研究課題名(和文)炎症と血圧制御に関する臓器間クロストークを担う成長因子ミッドカインの作用機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms of action of the growth factor midkine which is involved in inter-organ crosstalk regulating inflammation and blood pressure

研究代表者

門松 健治(KADOMATSU, Kenji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80204519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮と臓器間相関の2つに着目して、成長因子MKの細胞内シグナルを解明することを目的とした。MKの細胞結合阻害活性をもつRNAアプタマー、抗MKモノクローナル抗体の開発に成功した。これらは強い抗腫瘍活性を示した。また、MKの下流でH1FXなどの分子がダイナミックに動くことを明らかにした。さらに、NOS阻害剤による血管内皮細胞傷害を介した高血圧モデルにおいてMK欠損マウスに高血圧が生じないことを発見した。その基盤として血管弛緩因子EETの産生をMKが抑制することを明らかにした。A2ARはCYP450を活性化しEETs産生を亢進させるが、MKは専らこの系を抑制することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to elucidate midkine (MK) receptor and its downstream signaling by focusing on MK's function in endothelium and inter-organ crosstalk. We developed RNA aptamer and antibody, which strongly inhibited MK binding to the cell as well as tumorigenesis. We also found dynamic expression changes of many molecules including H1FX downstream of MK. Furthermore, we demonstrated that MK-deficient mice did not show hypertension in a model of endothelial injury using a NO synthase inhibitor. The underlying mechanism was that MK suppressed the production of EET which is a candidate EDHF. EDHF is a vasodilator. MK probably suppresses A2AR, which in turn suppresses the activity of CYP450 and the production of EET.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学(基礎医学)

キーワード：成長因子 ミッドカイン 血圧 受容体

1. 研究開始当初の背景

ミッドカイン (MK) は、プレイオトロフィンのみを仲間ファミリーを形成するユニークな成長因子である。細胞の生存や遊走の促進などの作用により多彩な病態の発生進展あるいは抑制に参与する。いくつかの受容体が報告されたがその実態ならびに下流のシグナルについては依然として不明である。私たちは本研究開始までに、MK が慢性腎不全に伴う高血圧で肺の血管内皮に作用してレニン・アンジオテンシン系の重要な制御因子として働き、腎肺相関という新しい臓器間相関のメディエーターの役割を果たすことを報告した。

2. 研究の目的

本研究では血管内皮と臓器間相関メディエーターの2つに着目して、MK の受容体を同定し、その細胞内シグナルを解明することを目的にする。

3. 研究の方法

MK アフィニティーカラム、LC/MS/MS、MK alkaline phosphatase などを用いてMK 結合分子の解析を行った。特にMK alkaline phosphatase を用いたMK の細胞結合を指標に、この結合阻害活性をもつRNA アプタマー、抗MK モノクローナル抗体の開発に成功した。さらに affinity maturation の手法を用いて、より親和性の強いMK 抗体を得る。これらはMK 受容体およびその下流シグナルの分析に有用なツールとなる。

また、NOS 阻害剤による血管内皮細胞傷害を介した高血圧モデルにおいてMK 欠損マウスに高血圧が生じないことを発見した。その基盤となる機構を探るとこれまであまり詳細な解析の進んでいないエイコサノイドと血圧制御の関係が浮かび上がった。エイコサノイドの測定、アデノシン受容体やその他の血管弛緩因子に関連する分子群のウェスタンブロットや定量的 RT-PCR、さらにはテレメトリを用いた血圧測定などの手法を用い

て、この機構を総合的に明らかにする。特に弛緩因子1つであるEETs (epoxyeicosatrienoic acids) について検討する。EETs はアラキドン酸からCYP450s を介して産生され、sEH を介して血管拡張活性を失ったDHET に分解される。CYP450s の上流にはおそらくA_{2A}R (アデノシン受容体) がある。というもアデノシンによってA_{2A}R が活性化され、それに伴ってEETs 産生が増加することが知られているからである。従って、(A_{2A}R) (CYP450s) EETs (sEH) DHET という一連のEETs の産生と代謝を予想できる。MK がこのどの基点で働くかを解析する。そのためにMK 欠損マウスおよび野生型マウスに片腎摘を施した後、NOS 阻害剤であるL-NAME を投与して引き起こした血管内皮傷害による高血圧モデルを用いる。

さらに小児がん神経芽腫モデルにおいて腫瘍形成過程にNotch2 がMK 受容体として働く可能性が浮上してきた。MK-Notch2 系の特異的なノックダウン、ウェスタンブロット、免疫染色とin vivo およびin vitro モデルを用いて、このコンセプトを検証する。仮にMK-Notch2 の関係が明白となると上記の血管内皮細胞傷害高血圧モデルなどMK が機能する様々な場面での機構解明に繋がる可能性がある。

4. 研究成果

MK alkaline phosphatase を用いたMK の細胞結合を指標に、この結合阻害活性をもつRNA アプタマー、抗MK モノクローナル抗体の開発、さらに、より親和性の強いMK 抗体の開発に成功し、これらのアプタマー、モノクローナル抗体は強い抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。また、MK ノックダウンでも同等の効果を得た。そして、その下流でHIFX などの分子がダイナミックに動くことを明らかにした。ところがMK ノックダウンの効果は、MK タンパク質の追加投与ではレスキューできず、また、coding region だけのMK

発現ベクターでもレスキューできなかった。すなわち、MK の作用機構は MK タンパク質とその受容体を介したものだけではなく、MK mRNA の 5', 3' 非翻訳領域による competing endogenous RNA (ceRNA) の機能を想定する仮説を浮かび上がらせた。

また、NOS 阻害剤による血管内皮細胞傷害を介した高血圧モデルにおいて MK 欠損マウスに高血圧が生じないことを発見した。その基盤となる機構として血管弛緩因子 EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor) の一つである EETs (epoxyeicosatrienoic acids) の産生を MK が抑制することを見出した。さらに、MK 欠損による EETs 産生亢進にはアデノシン受容体 $A_{2A}R$ が必要であること、EETs 分解の亢進は起こっていないことを明らかにした。従って、MK 欠損は $A_{2A}R$ を介して CYP450s を活性化し EETs 産生の亢進に専ら関わることが考えられた。

以上の成果を評価すると以下のようにまとめることができる。血圧調節に関して、MK がレニン・アンギオテンシン系に加えて、エイコサノイドである EETs を含む新たな血圧制御系に関わるというコンセプトを本研究によって示すことができた。この研究は、これまであまり詳細な解析の進んでいないエイコサノイドと血圧制御の関係を明らかにした点で大きな意義を持つ。MK の作用基点としては EETs の分解ではなく専ら産生に関わることが示され、中でも CYP450s の上流に位置すると想定される $A_{2A}R$ が MK の活性に必要なだということを示した点は、今後のこの分野の研究の進展に大きく寄与すると考えられる。

また、NOS 阻害剤である L-NAME による血管内皮傷害モデルによって上の事柄を明らかにしてきたことで、「MK の標的細胞の一つとして血管内皮細胞がある」というもう一つのコンセプトを確実なものにした意義も大きい。

MK の作用機構を解くためのツールとして RNA アプタマー、抗 MK モノクローナル抗体、さらに高親和性モノクローナル抗体作成に成功し、ノックダウン手法をあわせて、MK-Notch2 の軸を確立したことも重要である。ところが、このようなタンパク質としての MK に加えて、RNA として機能を予感させる予想外のデータを得たことは期待以上の成果であった。この MK mRNA の 5', 3' 非翻訳領域による ceRNA の機能は今後、十分な検証を要するが魅力的な作業仮説となった。

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 11 件)

- (1)Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. PLoS One. 査読有, 9(1),2014,e86813. doi: 10.1371/journal.pone.
- (2)Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine: an emerging target of drug development for treatment of multiple diseases. Br J Pharmacol, 査読, 171(4),2014,811-813. doi: 10.1111/bph.12571.
- (3)Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P. Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease. Br J Pharmacol. 査読有, 171(4), 2014;936-944. doi: 10.1111/bph.12537.
- (4)Kishida S, Kadomatsu K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumourigenesis. Br J Pharmacol. 査読有, 171(4), 2014,896-904. doi: 10.1111/bph.12442.

(5)Muramoto A, Imagama S, Natori T, Wakao N, Ando K, Tauchi R, Hirano K, Shinjo R, Matsumoto T, Ishiguro N, Kadomatsu K. Midkine overcomes neurite outgrowth inhibition of chondroitin sulfate proteoglycan without glial activation and promotes functional recovery after spinal cord injury.

Neurosci Lett. 査読有, 550, 2013,150-155.
doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.025.

(6)Kadomatsu K, Kishida S, Tsubota S. The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. J Biochem. 査読有,153(6), 2013,511-521.
doi: 10.1093/jb/mvt035.

(7)Kishida S, Mu P, Miyakawa S, Fujiwara M, Abe T, Sakamoto K, Onishi A, Nakamura Y, Kadomatsu K. Midkine promotes neuroblastoma through Notch2 signaling.

Cancer Res. 査読有, 73(4), 2013,318-327.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3070.

(8)Kojima H, Kosugi T, Sato W, Sato Y, Maeda K, Kato N, Kato K, Inaba S, Ishimoto T, Tsuboi N, Matsuo S, Maruyama S, Yuzawa Y, Kadomatsu K. Deficiency of growth factor midkine exacerbates necrotizing glomerular injuries in progressive glomerulonephritis. Am J Pathol. 査読有, 182(2), 2013,410-419.
doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.016.

(9)Sakamoto K, Kadomatsu K. Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation. Pathol Int. 査読有,62(7), 2012; 445-455.
doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02815.x.

(10)Sonobe Y, Li H, Jin S, Kishida S, Kadomatsu K, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Midkine inhibits inducible regulatory T cell differentiation by suppressing the development of tolerogenic dendritic cells. J Immunol. 査読有,188(6),2012,2602-2611.
doi:10.4049/jimmunol.1102346.

(11)Ishiguro H, Horiba M, Takenaka H, Sumida A, Opthof T, Ishiguro YS, Kadomatsu K, Murohara T, Kodama I. A single intracoronary injection of midkine reduces ischemia/reperfusion injury in Swine hearts: a novel therapeutic approach for acute coronary syndrome. Front Physiol. 査読有,2,2011,27. doi: 10.3389/fphys.2011.00027. Epub 2011 Jun 23.

〔学会発表〕(計2件)

(1)Kadomatsu K. Midkine: at the intersection of neurobiology and cancer. Excellence in midkine research conference. June 28-30, 2012, Istanbul, Turkey

(2)門松健治 サイトカイン、ケモカインとがん モーニングレクチャー 第70回日本癌学会総会 2011.10.4 名古屋国際会議場 名古屋市

〔図書〕(計2件)

(1)Takei Y, Kadomatsu K. Midkine and chemoresistance in cancers. Midkine: From Embryogenesis to Pathogenesis and Therapy (Editor: Ergüven M, Muramatsu T, Bilir A) Springer 2012,319(225-236)

(2)Kadomatsu K. Vascular restenosis and midkine. Midkine and chemoresistance in cancers. Midkine: From Embryogenesis to Pathogenesis and Therapy (Editor: Ergüven M, Muramatsu T, Bilir A) Springer 2012,319(125-130)

〔産業財産権〕
出願状況(計3件)

(1)名称：エポキシエイコサトリエン酸関連疾患の予防又は治療
発明者：門松健治、佐藤和一、佐藤由香
権利者：名古屋大学
種類：特願
番号：2012-147435
出願年月日：平成24年6月29日
国内外の別：国内
(2)名称：ヒトミッドカインに対するモノクローナル抗体
発明者：門松健治、岸田聡、小野健一郎、八木香澄

権利者：名古屋大学、株式会社医学生物学研究所

種類：特願

番号：2012-168637

出願年月日：平成 24 年 7 月 30 日

国内外の別：国内

(3)名称：ミッドカインに対するアプタマー及びその用途

発明者：宮川伸、藤原将寿、中村義一、門松健治、牟萍

権利者：名古屋大学、株式会社リボミック

種類：特願

番号：2012-255588

出願年月日：平成 24 年 11 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/>

名古屋大学大学院医学系研究科分子生物学

6. 研究組織

(1)研究代表者

門松 健治(KADOMATSU Kenji)

名古屋大学医学系研究科 教授

研究者番号：80204519

(2)研究分担者

武井 佳史(TAKEI Yoshifumi)

名古屋大学医学系研究科 准教授

研究者番号：70362233

岸田 聡(KISHIDA Satoshi)

名古屋大学医学系研究科 助教

研究者番号：20402563

(3)連携研究者 なし