

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591101

研究課題名(和文) 内皮機能障害から動脈硬化へ至る分子機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of atherosclerosis through endothelial dysfunction

研究代表者

黒田 忠 (KURODA, TADASHI)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・その他(副部長)

研究者番号：60403078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：内皮細胞特異的Gab1欠損(Gab1ECKO)マウスを作製してApoE欠損(ApoEKO)マウスと交配して二重欠損(DKO;Gab1ECKO/ApoEKO)マウスを作製し、DKOマウスとApoEKOマウスの6ヵ月齢オスにAngiotensin II(AngII)を浸透圧ポンプ負荷した。DKOマウスではApoEKOマウスに比して動脈硬化と動脈瘤形成が促進され、大動脈での炎症性サイトカインの発現は有意に増加し、転写因子KLF2とKLF4の発現は有意に減少していた。内皮細胞のGab1欠損はAngII依存性の血管炎症と動脈硬化をKLF2とKLF4の発現低下と相関して促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We reported that Gab1 is essential for postnatal angiogenesis through the analysis of endothelium-specific Gab1 knockout (Gab1ECKO) mice. However, the role of Gab1 in atherosclerosis remains unknown. We intercrossed Gab1ECKO mice with ApoE knockout (ApoEKO) mice. Six-month-old male ApoEKO/Gab1ECKO and littermate control (ApoEKO) mice were treated with angiotensin II (AngII) via an osmotic infusion minipump. After AngII treatment, ApoEKO/Gab1ECKO mice showed significantly enhanced atherosclerosis and aneurysm formation compared with control mice. The production of proinflammatory cytokines in the aorta was significantly enhanced in ApoEKO/Gab1ECKO mice compared with control. The expression levels of KLF2 and KLF4 were significantly reduced in the aortic endothelium of ApoEKO/Gab1ECKO mice compared with control. Collectively, endothelial Gab1 deletion accelerates AngII-dependent vascular inflammation and atherosclerosis presumably via downregulation of KLF2 and KLF4.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化 血管炎症 内皮 Gab1 KLF2

1. 研究開始当初の背景

研究代表者と研究分担者らの所属するグループでは、心臓血管系における Gab ファミリー蛋白質の役割に着目してこれまで研究してきた(*Circ. Res.* 93: 221, 2003; *J. Clin. Invest.* 117: 1771, 2007; *J. Biol. Chem.* 283, 24234, 2008; *Circ Res.* 104:1066, 2009; *J. Mol. Cell Cardiol.* 49: 157, 2010)。Gab 蛋白質はレセプター型チロシンキナーゼやサイトカイン受容体の下流でシグナルの増幅調節に重要な機能を果たすドッキング蛋白質であり、酵素活性を持たない代わりに、分子内に多数有するチロシン残基(図1の Y)のリン酸化を介して Src-homology 2 (SH2)ドメイン含有シグナル分子と刺激依存性に会合して、MAP キナーゼや PI3 キナーゼなどのシグナル伝達経路への出力を調整する。哺乳類の Gab 蛋白質は Gab1, Gab2, Gab3 の3種類が存在するが(図1)、申請者らの RT-PCR での検討ではヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)とヒト大動脈内皮細胞(HAEC)では Gab1 と Gab2 が発現しており、Gab3 の発現は認められなかった(図1)。

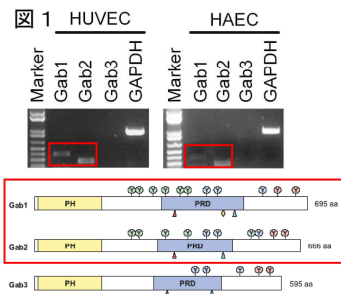


図1 HUVEC HAEC
Marker Gab1 Gab2 Gab3 GAPDH
Gab1 PH PRD 695 aa
Gab2 PH PRD 695 aa
Gab3 PH PRD 695 aa

Gab1 conventional 欠損マウスは胎生致死のため、我々は Gab1 内皮特異的欠損 (Gab1ECKO; Gab1^{flox/flox}/Tie2-Cre(+)) マウスを作成した。このマウスは明らかな血管形成の発生異常は示さず viable で大動脈結さつによる急性下肢虚血に曝したところ、3週間の経過中にコントロール(野生型)マウスでは1例も下腿壊死を呈さなかったが、Gab1ECKO マウスでは全例が下腿壊死を呈した(図2A)。

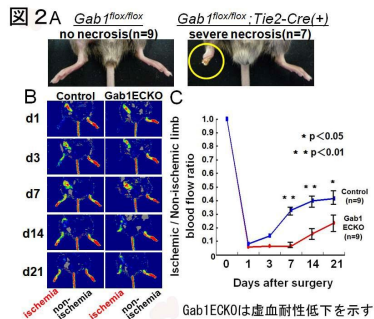
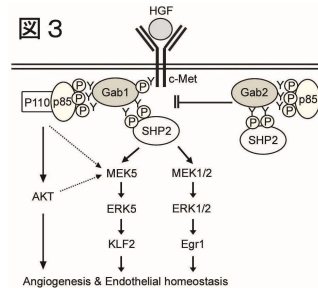


図2A *Gab1^{flox/flox}* no necrosis (n=9) *Gab1^{flox/flox}; Tie2-Cre(+)* severe necrosis (n=7)
B Control *Gab1ECKO*
d1 d3 d7 d14 d21
ischemic limb non-ischemic limb
ischemic/non-ischemic limb blood flow ratio
Days after surgery
* p < 0.05
** p < 0.01
Control (n=9) *Gab1ECKO* (n=9)
Gab1ECKOは虚血耐性低下を示す

また、Gab1ECKO マウスではコントロールマウスに比して血流回復が著しく遅延・低下していた(図2B-C)。in vitro での HUVEC を用いたシグナル解析と in vivo での遺伝子治療実験から、内皮細胞の Gab1 欠損から虚血耐性低下に至るのは、Hepatocyte growth factor (HGF)とその受容体 c-Met を介したシグナル

伝達不全による血管新生の異常が原因であることを明らかにした。

マイクロ DNA アレイを用いて HGF/c-Met/Gab1 依存性に内皮細胞で誘導される標的遺伝子を探索したところ、Gab1 と蛋白質脱リン酸化酵素 SHP2 会合依存性に MAP キナーゼ ERK5 の活性化を經由して Kruppel-like factor 2 (KLF2)が発現誘導されることを同定した(図3)。KLF2 はスタチンの標的遺伝子の1つで、スタチンの pleiotropic effect の責任遺伝子の1つと考えられている。



2. 研究の目的

本研究は内皮細胞で Gab1 が動脈硬化、内皮機能障害の進展に対してどのような役割を持つかが明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) Gab1/ApoE 二重欠損マウス (DKO; Gab1ECKO/ApoEKO) の作製と動脈硬化・瘤との関連性の解析: Gab1ECKO マウスと ApoE conventional 欠損 (ApoEKO) マウスとを交配して、二重欠損マウス (DKO; Gab1ECKO/ApoEKO) を作製した。DKO マウスと ApoEKO マウスの6ヵ月齢オスに対して、AngiotensinII (AngII) 浸透圧ポンプ負荷 (500ng/min/kg) を4週間負荷して、Oil Red O 染色、大動脈瘤最大径の測定、大動脈瘤形状の評価を行った。
- (2) DKO マウスと ApoEKO マウスの大動脈での遺伝子発現解析: AngII 負荷後1週間で大動脈での遺伝子発現を qRT-PCR で検討する。また、上記マウスの AngII 負荷していない状態の大動脈から CD31 陽性細胞を MACS により精製して、遺伝子発現の検討を行った。
- (3) AngII 負荷後の大動脈の免疫組織化学的検討: VCAM-1、CD68 に対する抗体での免疫染色で検討した。
- (4) Tie2 プロモーター下に Gab1cDNA を組み込んで、Gab1 内皮細胞特異的過剰発現トランスジェニック (Gab1ECTg) マウスの作製: Tie2 プロモーター下にヒト Gab1cDNA を組み込んだプラスミドを用いて、Gab1ECTg マウスを作製して、抗動脈硬化を Gab1 過剰発現がもたらすかを検討する。

4. 研究成果

(1) Gab1/ApoE 二重欠損 (DKO) マウスの作製と動脈硬化・動脈瘤との関連性の解析

AngII 浸透圧ポンプ負荷を 4 週間すると、ApoEKO マウスに比べて DKO マウスでは動脈硬化 (Oil Red O 染色) と動脈瘤形成頻度が有意に促進されていた (図 4)。

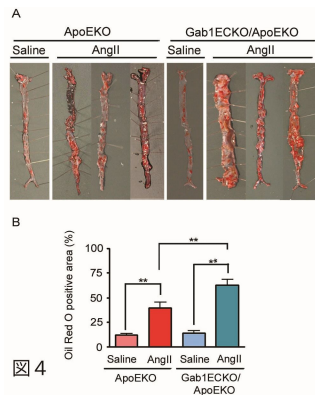


図 4

(2) 大動脈での炎症性サイトカインの発現に関する検討

AngII 浸透圧ポンプ負荷を 7 日間した後、大動脈では IL-6, TNF- α , IL-1 β の発現は ApoEKO マウスに比して DKO マウスではいずれも有意に増加していた (図 5)。

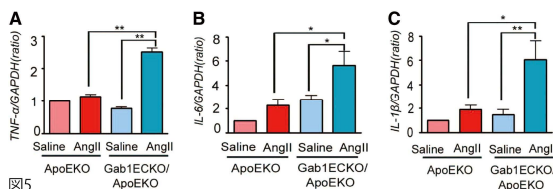


図 5

(3) 大動脈内皮細胞での KLF2, KLF4 の発現レベルの検討

DKO マウスと ApoEKO マウスの 6 ヶ月齢オスの大動脈から内皮細胞を磁気ビーズ付抗 CD31 抗体による MACS で単離して qRT-PCR で検討したところ、DKO マウスでは ApoEKO マウスに比して KLF2, KLF4 とともに発現が有意に低下していた (図 6)。

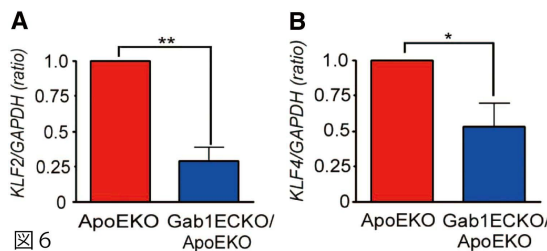


図 6

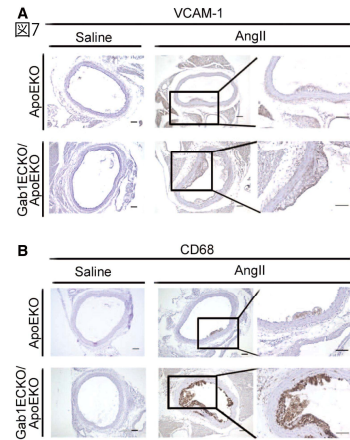
(4) AngII 負荷後の大動脈壁での炎症性接着分子 VCAM-1 の発現とマクロファージ集積の検討

AngII 負荷後の大動脈壁での VCAM-1 発現と CD68 陽性細胞 (マクロファージ) の集積を免疫組織化学的に検討したところ、ApoEKO マウスでの集積に比して DKO マウスではその発現・集積が促進されていた。KLF2 や KLF4 は抗炎症的な機能を持ち、VCAM-1 発現抑制作用もあることが報告されており、この現象は Gab1 内皮欠損により KLF2 や

KLF4

の発現が特異的にダウンレギュレーションしたことに由来する可能性が示唆された (図 7)。

上記データをもとに、*Circ J.* 76, 2031-40, 2012 にて報告した。



(5) Gab1ECTg マウスの作製

2 度方法に記載したプラスミドを ES 細胞に打ち込みトランスジェニックマウス作成を試みたが、おそらく胎生致死となり目的のトランスジェニックマウスは得られなかった。よって、Gab1 の内皮細胞での過剰発現には薬剤誘導性トランスジェニックマウスなどの方法でアプローチする必要があると考えられる。

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 12 件)

- Yokoi K, Sumitsuji S, Kaneda H, Siegrist P, Okayama K, Ide S, Mizote I, Kumada M, Kuroda T, Tachibana K, Sakata Y, Nanto S. A novel homemade snare, safe, economical and size adjustable. *EuroIntervention*. 2014 Mar 13. pii: 20130208-01. [Epub ahead of print] (査読有)
- Lee J, Kim KE, Choi DK, Jang JY, Jung JJ, Kiyonari H, Shioi G, Chang W, Suda T, Mochizuki N, Nakaoka Y, Komuro I, Yoo OJ, Koh GY. Angiopoietin-1 guides directional angiogenesis through integrin $\alpha\beta 5$ signaling for recovery of ischemic retinopathy. *Sci Transl Med*. 2013 Sep 18;5(203):203ra127. doi:10.1126/scitranslmed.3006666. (査読有)
- Nakaoka Y*, Higuchi K, Arita Y, Otsuki M, Yamamoto K, Hashimoto-Kataoka T, Yasui T, Ikeoka K, Ohtani T, Sakata Y, Shima Y, Kumanogoh A, Yamauchi-Takahara K, Tanaka T, Kishimoto T, Komuro I. Tocilizumab for the Treatment of the Patients with Refractory Takayasu Arteritis. *Int Heart J*. 54: 405-411, 2013 (査読有)
- Nakaoka Y*, Komuro I. Gab docking proteins in cardiovascular disease, cancer,

and inflammation. *Int J Inflamm.* 2013;2013:141068. doi: 10.1155/2013/141068. Epub 2013 Jan 22. (査読有)

5. Rodriguez-Araujo G, Nakagami H, Hayashi H, Mori M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Nakaoka Y, Takami Y, Komuro I, Morishita R, Kaneda Y. Alpha-synuclein elicits glucose uptake and utilization in adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway. *Cell Mol Life Sci.* 70(6):1123-33, 2013; doi:10.1007/s00018-012-1198-8. (査読有)
6. 中岡良和, 小室一成; 血管リモデリング; 日本医師会雑誌 (特別号・高血圧診療のすべて) 142 (Suppl 1), S121-122, 2013 (査読無)
7. 中岡良和, 瀧原圭子, 小室一成; 高安動脈炎の治療; 日本臨床 (増刊号・血管炎) 71(Suppl 1), 173-178, 2013 (査読無)
8. 中岡良和; 高安動脈炎の診断と治療; 医学のあゆみ (血管炎の診断と治療) 246 (1), 5-11, 2013 (査読無)
9. Higuchi K, Nakaoka Y*, Shioyama W, Arita Y, Hashimoto T, Yasui T, Ikeoka K, Kuroda T, Minami T, Nishida K, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Shirai M, Mochizuki N, Komuro I*. Endothelial Gab1 deletion accelerates angiotensin II-dependent vascular inflammation and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Circ J.* 76, 2031-40, 2012 DOI:10.1253/circj.CJ-11-1507 (査読有)
10. Irie Y, Katakami N, Kaneto H, Kasami R, Sumitsuji S, Yamasaki K, Tachibana K, Kuroda T, Sakamoto K, Umayahara Y, Ueda Y, Kosugi K, Shimomura I. Maximum carotid intima-media thickness improves the prediction ability of coronary artery stenosis in type 2 diabetic patients without history of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2012 Apr;221(2):438-44. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.022. Epub 2012 Jan 21. (査読有)
11. 中岡良和, 小室一成; 冠動脈疾患研究の・治療の進歩と今後の課題; 日本臨床, 69 (Suppl 7), 20-24, 2011 (査読無)
12. Shioyama W, Nakaoka Y*, Higuchi K, Minami T, Taniyama Y, Nishida K, Kidoya H, Sonobe T, Naito H, Arita Y, Hashimoto T, Kuroda T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I*. Gab1 is essential for postnatal angiogenesis via hepatocyte growth factor/c-Met signaling.

Circ Res 108, 664-675, 2011 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.232223 (査読有)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Hashimoto-Kataoka T, Nakaoka Y, Sonobe T, Higuchi K, Arita Y, Yasui T, Ikeoka K, Masaki T, Yamauchi-Takahara K, Shirai M, Komuro I. Blockade of interleukin-6 signaling prevents hypoxia induced pulmonary hypertension in mice. American Heart Association Scientific Sessions 2013 (2013 年 11 月 17 日, Dallas Convention Center (アメリカ合衆国・ダラス))
2. 有田陽, 中岡良和, 松永太一, 木戸屋浩康, 橋本崇弘, 池岡邦泰, 高倉伸幸, 望月直樹, 山下潤, 小室一成. アンジオポイエチン 1 は静脈洞の未分化血管内皮細胞を遊走・分化させ冠静脈形成に必須の因子である. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会(2013 年 9 月 27 日, 千里阪急ホテル(大阪府豊中市))
3. 片岡 崇弘, 中岡良和, 曾野部 崇, 保仙 直毅, 稲垣 薫克, 樋口 香織, 有田 陽, 安居 琢, 池岡 邦泰, 正木 豪, 瀧原 圭子, 白井 幹康, 小室 一成. 低酸素誘発性肺高血圧モデルで IL-6/Th17 細胞シグナルは肺血管リモデリングに必須である. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会(2013 年 9 月 27 日, 千里阪急ホテル(大阪府豊中市))
4. 池岡邦泰, 中岡良和, 曾野部崇, 白井幹康, 樋口香織, 有田陽, 片岡崇弘, 安居琢, 正木豪, 瀧原圭子, 小室一成. 血管平滑筋細胞由来のアンジオポエチン 1 は下肢虚血血管新生時の動脈化に重要である. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会(2013 年 9 月 27 日, 千里阪急ホテル(大阪府豊中市))
5. 中岡良和, 有田陽, 松永太一, 山下潤, 小室一成. 血管形成研究の最前線「冠静脈形成の分子機構」第 21 回日本血管生物医学会学術集会(2013 年 9 月 26 日, 千里阪急ホテル(大阪府豊中市))
6. 池岡邦泰, 中岡良和, 曾野部崇, 白井幹康, 樋口香織, 有田陽, 片岡崇弘, 安居琢, 正木豪, 瀧原圭子, 小室一成. 血管平滑筋細胞由来のアンジオポエチン 1 は下肢虚血血管新生時の動脈化に重要である. 第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference (2013 年 9 月 6 日, キロロリゾートホテルピアノ(北海道余市郡赤井川村))
7. Nakaoka Y, Arita Y, Higuchi K, Hashimoto-Kataoka T, Yasui T, Sakata Y, Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T, Komuro I. Tocilizumab Ameliorates Vascular Inflammation

- and Clinical Symptoms in the Patients with Takayasu Arteritis Refractory to Glucocorticoids. 第 30 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会(2013 年 6 月 29 日、La Valencia Hotel(アメリカ合衆国・サンディエゴ))
8. Arita Y, Nakaoka Y, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Higuchi K, Hashimoto T, Ikeoka K, Yasui T, Nishiyama K, Kurihara H, Yamauchi-Takahara K, Yamagishi H, Takakura N, Mochizuki N, Koh GY, Komuro I. Angiopoietin-1 secreted from myocardium is essential for the formation of coronary veins in the developing heart. 第 30 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会(2013 年 6 月 29 日、La Valencia Hotel(アメリカ合衆国・サンディエゴ))
 9. Yoshikazu Nakaoka, Kaori Higuchi, Yoh Arita, Takahiro Kataoka, Taku Yasui, Kuniyasu Ikeoka, Tomohito Ohtani, Yasushi Sakata, Keiko Yamauchi-Takahara, Issei Komuro. Tocilizumab Ameliorates Vascular Inflammation and Clinical Symptoms in Patients With Takayasu Arteritis Refractory to Glucocorticoids. ACC.13(2013 年 3 月 9 日、モスコンセンター(アメリカ合衆国・サンフランシスコ))
 10. Nakaoka Y. Blockade of interleukin-6(IL-6) Signaling by Anti-IL-6 Monoclonal Antibody might be a Promising Therapeutic Strategy for Pulmonary Arterial Hypertension. 第 77 回日本循環器学会学術集会(2013 年 3 月 16 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))
 11. 有田陽、中岡良和、白井学、有馬勇一郎、樋口香織、橋本崇弘、池岡邦泰、安居琢、瀧原圭子、西山功一、山岸敬幸、栗原裕基、小室一成。心筋から分泌されるアンジオポイエチン 1 は冠静脈の形成に必須である 第 2 回 MCC II (2011 年 9 月 4 日、ホテルピアノ (北海道余市郡赤井川村))
 12. Nakaoka Y. Gab1 is an essential component for postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-Met signaling. The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology 2011 (招待講演 : 2011 年 8 月 26 日、釜山ウエスティンホテル (韓国・釜山))
 13. Nakaoka Y, Higuchi K, Shioyama W, Taniyama Y, Arita Y, Hashimoto T, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Morishita R, Hirano T, Komuro I. Gab1 Negatively regulates Angiotensin II-accelerated Atherosclerosis in Apolipoprotein E

Deficient Mice. 第 75 回 日本循環器学会学術集会(2011 年 8 月 4 日、パシフィコ横浜(横浜市))

14. Nakaoka Y. The Role of Gab Family Docking Proteins in the Pathophysiology of the Cardiovascular Diseases. The 12th US-Japan-Asia Dialogue on Cardiovascular Diseases and Young Investigator Competition (Pfizer) (招待講演: 2011 年 7 月 31 日、高輪プリンスホテル(東京都))

〔図書〕(計 1 件)

1. 血管生物医学事典(日本血管生物医学会編集、小室一成・中岡良和他分担執筆) p210-212, 319-321, 478-480, 朝倉書店、2011 年

〔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

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/cardiology/27research/2751res.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 忠 (KURODA TADASHI)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・その他(副部長)

研究者番号 : 60403078

(2) 研究分担者

中岡 良和 (NAKAOKA YOSHIKAZU)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
 研究者番号 : 90393214

(3) 連携研究者

なし