

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591341

研究課題名(和文)細胞接着シグナルによるマクロファージ泡沫化並びに動脈硬化性疾患の制御

研究課題名(英文)Regulation of macrophage foam cell formation and atherosclerotic diseases by cell adhesion signalling

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) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：細胞接着斑分子の一つであるHic-5の欠損マウスとアポE欠損マウスのダブル欠損マウスを作製した。アンジオテンシンII投与により、アポE欠損マウスの87%に腹部大動脈瘤の形成がみられたが、ダブル欠損マウスでは11%に抑制された。血管平滑筋細胞に特異的なHic-5欠損マウスを作製しても同様の結果が得られた。ダブル欠損マウスの大動脈動脈硬化病変面積はアポE欠損マウスの40%に抑制された。ダブル欠損マウスの内皮細胞表面では微絨毛様構造が減少しており、単球の接着が低下していた。以上より血管平滑筋細胞や内皮細胞に発現するHic-5は動脈硬化性疾患の発症・進展に重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We created double-KO mice lacking both Hic-5, a cell adhesion molecule, and apoE. Angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm occurred to 87% of apoE-KO mice but only to 11% of double-KO mice. Similar results were obtained from mice lacking Hic-5 specifically in vascular smooth muscle cells. Atherosclerotic lesion areas in double-KO mice were suppressed to 40% of apoE-KO mice. Formation of microvilli-like structures on endothelial cell surface was suppressed in double-KO mice. Furthermore, monocyte adhesion to endothelial cells from double-KO mice was suppressed compared with apoE-KO mice. These results suggest that Hic-5 in vascular smooth muscle cells and endothelial cells plays essential roles in the development of atherosclerotic cardiovascular diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：細胞接着斑分子 Hic-5 動脈硬化 大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスへ結合する細胞の接着点である細胞接着斑は種々の分子により構成される。細胞接着斑タンパク質の一つである Hydrogen peroxide-inducible clone-5 (Hic-5)は、過酸化水素ならびに TGF- β によって発現誘導される。我々は世界に先駆けて Hic-5 欠損マウスを作製することに成功し、その表現形を解析した(Kim-Kaneyama *et al.* J Mol Cell Cardiol. 2011;50:77-86)。Hic-5 は血管平滑筋をはじめとする平滑筋細胞に高発現し、Hic-5 欠損マウスはバルーン血管障害に対する血管中膜の回復が遅延していた。その原因として、Hic-5 欠損マウスから得た血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cell; VSMC) は、伸展刺激に対するアポトーシス感受性が亢進していることが示唆された。血管壁の主要な構成細胞である VSMC は種々の心血管疾患の発症に重要な役割を果たしているが、これらの疾患における Hic-5 の病態生理学的意義は明らかでなかった。

2. 研究の目的

(1) 大動脈瘤は高齢者の 5% に発症し、一旦破裂すると致死率の高い動脈硬化性疾患である。モデルマウスを用いて腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm; AAA) 発症における Hic-5 の役割を検討した。

(2) Hic-5 は平滑筋細胞以外に血管内皮細胞に発現しているが、単球・マクロファージには発現を認めない。動脈硬化モデルマウスならびに培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) を用いて、単球・内皮細胞の接着ならびに動脈硬化病変形成における血管内皮細胞 Hic-5 の役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) Hic-5 欠損マウスと動脈硬化モデルマウスであるアポ E 欠損マウスを交配し、ダブル欠損マウスを作製した。アポ E 欠損マウスならびにダブル欠損マウスにオスモティックミニポンプを用いてアンジオテンシンを持続皮下注して(1,000 ng/min)AAA 発症を誘導し、アポ E 欠損マウスとダブル欠損マウスを比較した。また、平滑筋細胞の Hic-5 を特異的にノックアウトしたマウスを作製し、同様の実験を行った。またマウスの VSMC を単離培養し、アンジオテンシン刺激による細胞内情報伝達系における Hic-5 の役割を解析した。

(2) アポ E 欠損マウスとアポ E/Hic-5 ダブル欠損マウスの大動脈動脈硬化病変面積を比較した。アポ E 欠損マウスならびにダブル欠損マウスの大動脈を単離して組織培養し、単球性 THP-1 細胞の大動脈への接着を検討した。走査電子顕微鏡を用いて、大動脈内皮細胞表

面の微絨毛様構造 microvilli-like structure 形成に対する Hic-5 欠損の効果を検討した。HUVEC における Hic-5 発現を、siRNA によるノックダウンやアデノウイルスによる過剰発現によって制御し、微絨毛様構造形成の変化や THP-1 細胞の HUVEC への接着の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) アポ E 欠損マウスにアンジオテンシンを持続皮下注すると、87% (13/15) に AAA の形成がみられた。一方ダブル欠損マウスでは、わずか 11% (1/9) しか AAA の形成がみられなかった。アポ E 欠損マウスの 40% (6/15) は、アンジオテンシン投与後 7 日以内に AAA 破裂により死亡したが、ダブル欠損マウスでは全例が 28 日間生存した。平滑筋細胞特異的に Hic-5 をノックアウトさせたマウスを作製してアポ E 欠損マウスと交配して同様の実験を行ったところ、Hic-5 欠損により AAA 発生ならびに破裂が劇的に抑制された。アポ E 欠損マウスの大動脈にはアンジオテンシン投与によりマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) の発現誘導がみられたが、ダブル欠損マウスでは MMP の発現が顕著に抑制されていた。

単離した VSMC の培養実験により、アンジオテンシン刺激による MMP (MMP2 ならびに MT1-MMP) の発現誘導が Hic-5 欠損マウス由来の細胞で低下していることが明らかとなった。MMP の発現は JNK 経路により活性化されることが知られている。野生型マウスから単離した VSMC ではアンジオテンシン刺激により P54 のリン酸化がみられたが、Hic-5 欠損マウス由来の VSMC では、P54 のリン酸化が顕著に抑制されていた。一方、アンジオテンシン刺激による MMK4 のリン酸化は、野生型 VSMC に比し、Hic-5 欠損マウス由来 VSMC では逆に亢進していることが明らかになった。免疫沈降ならびに proximity ligation assay により、Hic-5 は JNK 経路の上流にある MKK4 ならびにその下流にある JNK p54 と結合し、JNK 経路の足場タンパク質として機能することが明らかとなった。

以上より、Hic-5 は VSMC における MMP の発現や AAA の発症に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(2) アポ E/Hic-5 ダブル欠損マウスの大動脈動脈硬化病変面積は、アポ E 欠損マウスの 40% に抑制された。単離した大動脈組織を TNF- α または酸化 LDL で刺激した後、単球性 THP-1 細胞の接着を検討すると、ダブル欠損マウス由来大動脈への THP-1 細胞接着は、アポ E 欠損マウスの 30-60% に抑制された。LDL 受容体欠損マウスならびに LDL 受容体/Hic-5 ダブル欠損マウスを用いても、同様の結果が得られた。走査電子顕微鏡による検討では、アポ E 欠損マウスから単離した大動脈では TNF- α または酸化 LDL 刺激により、内皮細胞

表面に微絨毛様構造が多数形成されるのに対し、アポE/Hic-5ダブル欠損マウスでは微絨毛様構造の形成が顕著に抑制された。

HUVECを用いた検討では、TNF- または酸化LDL刺激による微絨毛様構造の形成は、siRNAを用いたHic-5ノックダウンにより抑制され、アデノウイルスによるHic-5の過剰発現により促進した。THP-1細胞のHUVECへの付着も、Hic-5ノックダウンにより抑制され、Hic-5の過剰発現により促進した。

以上より、血管内皮細胞に発現するHic-5は、微絨毛様構造の形成ならびに単球の内皮細胞への接着に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また血管内皮細胞のHic-5は動脈硬化のあらたな治療標的分子とみなされることが示唆された。

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13件)

1. Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita-Okubo S, Offermanns S, Itabe H, Miyazaki T, Miyazaki A. Identification of hydrogen peroxide-inducible clone 5 as a novel scaffold for the mitogen-activated protein kinase kinase 4/p54 c-Jun N-terminal kinase pathway in the development of abdominal aortic aneurysms. *J Am Heart Assoc*. 2014;3e000747 doi: 10.1161/JAHA.113.000747. 査読有
2. Sasabe N, Keyamura Y, Obama T, Inoue N, Igarashi Y, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T, Kuwata H, Iwamoto S, Miyazaki A, Hara S, Yoshikawa T, Itabe H. Time course-changes in phosphatidylcholine profile during oxidative modification of low-density lipoprotein. *Lipids Health Dis* 2014;13:48. doi: 10.1186/1476-511X-13-48. 査読有
3. Miyazaki T, Koya T, Kigawa Y, Oguchi T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Calpain and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(3):228-237. 査読有
4. Terasaki M, Nagashima M, Watanabe T, Miyazaki A, Hirano T. Effects of PFK275-055, a peptidyl peptidase-4, on the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-null mice. *Metabolism* 2012;61(7):974-977. doi: 10.1016/j.metabol.2011.11.011. 査読有
5. Koya T, Miyazaki T, Watanabe T, Shichiri M, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Salusin- β accelerates inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF- κ B signaling in LDL

receptor-deficient mice *in vivo* and HUVECs *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(1):H96-H105. doi: 10.1152/ajpheart.00009.2012. 査読有

6. Kamiyama T, Watanabe H, Iijima M, Miyazaki A, Iwamoto S. Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells. *J Dermatol*. 2012;39(10):838-842. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01544.x. 査読有
7. Kim-Kaneyama JR, Miyauchi A, Lei XF, Arita S, Mino T, Takeda N, Kou K, Eto K, Yoshida T, Miyazaki T, Shioda S, Miyazaki A. Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin α IIb β 3 activation and platelet aggregation in mice. *J Thromb Haemostat*. 2012;10(9):1867-1874. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04856.x. 査読有
8. Masunaga A, Nagashio R, Iwamoto S, Takeyama N, Sato Y, Miyazaki A, Mitsuya T. A case of pulmonary papillary adenoma: possible relationship between tumor histogenesis/tumorigenesis and fibroblast growth factor 2 IIIb. *Pathol Int*. 2012;62(9):640-645. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02841.x. 査読有
9. Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, Miyauchi A, Miyazaki T, Miyazaki A. Hydrogen peroxide-inducible clone-5 (Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(7):601-607. 査読有
10. Nagahama Y, Obama T, Usui M, Kanazawa Y, Iwamoto S, Suzuki K, Miyazaki A, Yamaguchi T, Yamamoto M, Itabe H. Oxidized low-density lipoprotein-induced periodontal inflammation is associated with the up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin synthase 1 in human gingival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(4):566-571. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.002. 査読有
11. Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, Tomoyasu M, Nohtomi K, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A, Hirano T. Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia* 2011;54(10):2649-2659. doi:

10.1007/s00125-011-2241-2. 査読有

12. Miyazaki T, Taketomi Y, Takimoto M, Lei XF, Arita S, Kim-Kaneyama J, Arata S, Ohata H, Ota H, Murakami M, Miyazaki A. m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its role in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation* 2011;124(23):2522-2532. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.021675. 査読有

13. Masunaga A, Sato Y, Kadofuku T, Iwamoto S, Masuda M, Suzuki S, Suzuki T, Miyazaki A, Mitsuya T. A case of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin 6 receptor-producing mediastinal mature cystic teratoma with somatic-type malignancy. *Pathol Int.* 2011;61(4):243-247. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02641.x. 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Miyazaki T, Taketomi Y, Hosono T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Murakami M, Miyazaki A. VEGF-induced down-regulation of calpastatin in vascular endothelial cells confers destabilized and pro-inflammatory properties of pathological vessels. The 18th International Vascular Biology Meeting(京都, 2014 年 4 月 14-17 日)

2. 宮崎拓郎, 礪波一夫, 秦勝志, 雷小峰, 金山朱里, 反町洋之, 栗原裕基, 宮崎章. Calpain-6 による動脈硬化病変およびマクローファージ pinocytosis の制御. 第 86 回日本生化学会大会(横浜, 2013 年 9 月 13 日)

3. 金山朱里, 雷小峰, 有田茂子, 宮崎拓郎, 宮崎章. Hic-5 deficiency blocks the development of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms by inhibiting c-Jun N-terminal kinase 2 in mice. 第 21 回日本血管生物医学学会学術集会(大阪, 2013 年 9 月 26-28 日)

4. 宮崎拓郎, 礪波一夫, 秦勝志, 雷小峰, 金山朱里, 反町洋之, 栗原裕基, 宮崎章. Calpain-6 による動脈硬化病変およびマクローファージ pinocytosis の制御. 第 21 回日本血管生物医学学会学術集会(大阪, 2013 年 9 月 26-28 日)

5. Miyazaki T, Taketomi Y, Takimoto M, Murakami M, Miyazaki A. m-Calpain is induced in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and accelerates

atherosclerotic lesion development through proteolytic disorganization of VE-cadherin. 2013 FASEB Summer Research Conference Biology of Calpains in Health and Disease(サクストンリバー, 米国, 2013 年 7 月 25-29 日)

6. Arita S, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Miyazaki T, Miyazaki A. Deletion of hydrogen-peroxide inducible clone-5 inhibits atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E knockout mice. 第 45 回日本動脈硬化学会学術集会(東京, 2013 年 7 月 18-19 日)

7. Miyazaki T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Roles of calpain systems in endothelial barrier dysfunction and atherogenesis. 第 20 回本血管生物医学学会学術集会(徳島, 2012 年 12 月 5-7 日)

8. Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, Miyazaki T, Miyauchi A, Miyazaki A. The role of hydrogen peroxide-inducible clone-5 (Hic-5) in atherosclerotic diseases. 第 20 回日本血管生物医学学会学術集会(徳島, 2012 年 12 月 5-7 日)

9. 宮崎拓郎, 雷小峰, 金山朱里, 宮崎章. 血管内皮細胞におけるリゾフォスファチジルコリンによる m-Calpain 発現誘導とその動脈硬化症における意義. 第 85 回日本生化学会大会(福岡, 2012 年 12 月 14-16 日)

10. Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita S, Miyazaki T, Miyazaki A. Hic-5 deficiency blocks the development of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in mice. 第 44 回日本動脈硬化学会学術集会(福岡, 2012 年 7 月 19-20 日)

11. Miyazaki T, Taketomi Y, Takimoto M, Lei XF, Arita S, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Ohata H, Ota H, Murakami M, Miyazaki A. m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. 第 44 回日本動脈硬化学会学術集会(福岡, 2012 年 7 月 19-20 日)

12. Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita S, Miyazaki T, Miyazaki A. Hic-5 deficiency blocks the development of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in mice. The 17th International Vascular Biology Meeting (Weisbaden, Germany, 2012 年 6 月)

13. Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S,

Miyazaki T, Miyazaki A. Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin IIb/3 activation and platelet aggregation in mice. The 17th International Vascular Biology Meeting (Wiesbaden, Germany, 2012年6月)

14. Miyazaki T, Taketomi Y, Takimoto M, Ota H, Murakami M, Miyazaki A. m-Calpain is induced in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and accelerates atherosclerotic lesion development through proteolytic disorganization of VE-cadherin. XVIth International Symposium on Atherosclerosis (シドニー, 2012年3月25-29日)

15. Kim-Kaneyama JR, Takeda N, Sasai A, Miyazaki A, Sata M, Hirabayashi T, Shibamura M, Yamada G, Nose K. Hic-5 deficiency enhances mechanosensitive apoptosis and modulate vascular remodeling. 第43回日本動脈硬化学会学術集会(札幌, 2011年7月15-16日)

16. Miyazaki T, Lei XF, Arita S, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. m-Calpain inhibition ameliorates atherosclerosis by prevention of proteolytic disorganization of VE-cadherin in vascular endothelial cells in mice. 第43回日本動脈硬化学会学術集会(札幌, 2011年7月15-16日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 章 (Akira Miyazaki)

昭和大学・医学部生化学講座・教授

研究者番号: 70253721