

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790882

研究課題名(和文) ROCK2による血管内皮機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of Endothelial Function by ROCK2

研究代表者

川浪 大治 (KAWANAMI, DAIJI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：50568889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：低分子GタンパクRhoとそのエフェクターであるROCKはアクチン系細胞骨格の再構築を介した細胞の収縮や遺伝子発現の調節などを行う。ROCKにはROCK1とROCK2の2つのアイソフォームが存在する。本研究ではROCK2による血管内皮機能調節機構について検討した。培養血管内皮細胞において、ROCKの特異的阻害剤は血管内皮の炎症を抑制したが、ROCK2のノックダウンによっても同様の結果が得られた。さらにROCK2ノックアウトマウス由来のマクロファージではLPS刺激によるMCP-1の発現が抑制された。以上の結果から、ROCK2は血管内皮やマクロファージの機能調節に重要な役割を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：The process of atherosclerosis is affected by interactions among numerous biological pathways. Accumulating evidence shows that small GTP-binding protein Rho and its effector Rho-kinase (ROCK) play an important role in the development of atherosclerosis. ROCK has two isoforms, ROCK1 and ROCK2. However, it is unclear how ROCK2 regulates endothelial function. To this end, we first examined the effect of ROCK inhibitors on endothelial function. We found that ROCK inhibitors such as Y-27632 and fasudil attenuate endothelial inflammation markers including MCP-1. Furthermore, knockdown of ROCK2 reduced MCP-1 expression levels in endothelial cells. Finally, we isolated peritoneal macrophages from ROCK2-deficient and wild-type mice. LPS induced MCP-1 expression in the cells derived from wild-type. Interestingly, induction of MCP-1 was inhibited in ROCK2-deficient cells. These findings indicate that ROCK2 plays an important role in the development of atherosclerosis.

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 血管内皮 Rho-kinase

1. 研究開始当初の背景

低分子量 G 蛋白 Rho のエフェクターである Rho-kinase(ROCK)には ROCK1 と ROCK2 の2つのアイソフォームが存在することが知られている。ROCK1 と ROCK2 はアミノ酸配列で約 65%の相同性を有しているが、各々のノックアウトマウスを用いた検討では、ROCK1 と ROCK2 が互いの機能を代償せず、異なった機能を持つ可能性が示唆されていた。Rho/ROCK シグナルの過剰な活性化が血管内皮機能障害を惹起することが報告されているが、ROCK アイソフォームが異なった機能を有するのかどうかについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

ROCK2 による血管内皮機能調節機構を明らかにする。さらに、ROCK2 が動脈硬化や細小血管障害の発症機転に果たす役割を明らかにすること。

3. 研究の方法

培養血管内皮細胞(HUVEC)を用いて ROCK 阻害剤で処理あるいは siRNA で ROCK をノックダウンした細胞における動脈硬化関連遺伝子の発現プロファイルを検討する。また、ROCK2 ノックアウトマウスを用いた解析を行う。

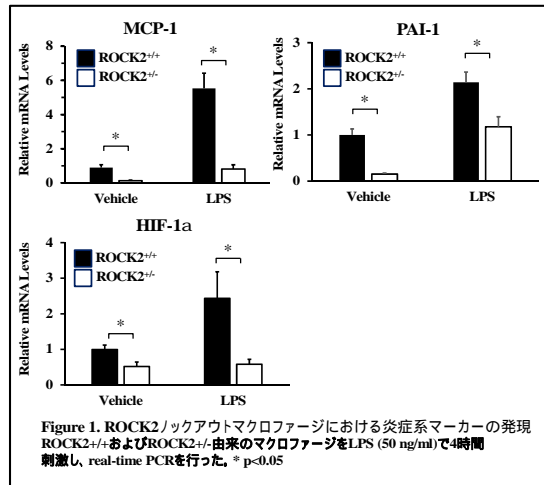
4. 研究成果

まず、最初に ROCK が血管内皮機能障害の形成に果たす役割を明らかにするために Rho の活性化を誘導することで知られるトロンピンを用いた実験を行った。その結果、トロンピンで HUVEC を刺激すると monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)の発現が増加したが、ROCK 阻害剤である Y-27632 はこの発現誘導を抑制した。Y-27632 は siRNA を用いた検討では ROCK1 ノックダウン細胞よりも ROCK2 ノックダウン細胞においてトロンピンによって誘導される MCP-1 の抑制がみられ、ROCK2 が血管内皮細胞における主要アイソフォームとして機能している可能性が示唆された。メカニズムの検討では、ROCK を阻害することによって p38MAPK および NF-kappaB 依存性のシグナルが抑制され MCP-1 の発現が抑制されることが明らかとなった。さらに、我々は 2 型糖尿病モデルである db/db マウスに ROCK 阻害薬であるファスジルを投与して検討を行ったところ、ファスジル投与群では非投与群に比べて大動脈壁での MCP-1 の発現が有意に抑制されていた。

以上の結果から、糖尿病状態における血管内皮機能障害の形成に ROCK が重要であると考え、次に我々は小胞体ストレスによる血管内皮機能障害に ROCK が果たす役割を検討した。小胞体ストレス誘導因子として知られるツニカマイシンで HUVEC を刺激したところ vascular cellular adhesion molecule 1 (VCAM-1)の発現が誘導された。この発現誘導には unfolded protein response (UPR)が関

与するが、中でも ATF4-CHOP 依存性シグナルに着目して検討を行った。ツニカマイシン刺激により、血管内皮における Rho/ROCK 活性は上昇した。そして ROCK 阻害剤であるファスジルはツニカマイシンによって誘導された ATF4-CHOP の発現を抑制し、VCAM-1 の発現を低下させた。このように、糖尿病状態における血管内皮機能障害に ROCK が重要な役割を果たすことが示された。

最後に我々は、ROCK2 の特異的な作用をより詳細に検討するため ROCK2 ノックアウトマウスを用いた解析を行った。動脈硬化の形成には血管内皮のみならずマクロファージも重要な役割を担う。そこで、ROCK2 ノックアウトマウスより腹腔マクロファージを抽出して検討を行うこととした。ROCK2 ノックアウトマウスはホモ接合体が胎生致死のため、ヘテロ接合体を用いて検討を行った。その結果、Figure1 に示すように、LPS 刺激による MCP-1、plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 および hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) $\alpha$ など動脈硬化関連遺伝子の発現が



ROCK2 ノックアウトマウス由来のマクロファージでは抑制されていることが明らかとなった。

以上の結果から、ROCK2 は血管内皮機能やマクロファージ機能調節に重要な役割を有し、動脈硬化の形成を促進する可能性が示された。

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 5 件)

Kawanami D, Matoba K, Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K. Fasudil inhibits ER stress-induced VCAM-1 expression by modulating unfolded protein response in

endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 435:171-5. 2013.

Kanazawa Y, Takahashi-Fujigasaki J, Ishizawa S, Takabayashi N, Ishibashi K, Matoba K, Kawanami D, Yokota T, Tajima N, Utsunomiya K. The Rho-kinase inhibitor fasudil restores normal motor nerve conduction velocity in diabetic rats by assuring the proper localization of adhesion-related molecules in myelinating Schwann cells. *Exp Neurol.* 247:438-46. 2013.

Matoba K, Kawanami D, \* Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Murai N, Matsufuji S, Takahashi-Fujigasaki J, Utsunomiya K. Rho-kinase inhibition prevents the progression of diabetic nephropathy by downregulating hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.* 84:545-54. 2013. \*corresponding author

Haldar SM, Jeyaraj D, Anand P, Zhu H, Lu Y, Prosdocimo DA, Eapen B, Kawanami D, Okutsu M, Brotto L, Fujioka H, Kerner J, Rosca MG, McGuinness OP, Snow RJ, Russell AP, Gerber AN, Bai X, Yan Z, Nosek TM, Brotto M, Hoppel CL, Jain MK. Kruppel-like factor 15 regulates skeletal muscle lipid flux and exercise adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:6739-44. 2012.

Kawanami D, Matoba K, Kanazawa Y, Ishizawa S, Yokota T, Utsunomiya K. Thrombin induces MCP-1 expression through Rho-kinase and subsequent p38MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway activation in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*

411:798-803, 2011.

〔学会発表〕(計 4 件)

第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会  
川浪大治「mDia1 は lysophosphatidic acid による血管内皮機能障害を制御する」

73<sup>rd</sup> American Diabetes Association Scientific Sessions Daiji Kawanami  
“Rho-kinase inhibition attenuates endothelial inflammation by modulating ER stress signaling”

第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会  
川浪大治「Rho-kinase の活性化は ER ストレスに伴う血管内皮機能障害に關与する」

第 9 回国際糖尿病連合西太平洋地区会議/  
第 4 回アジア糖尿病学会 Daiji Kawanami  
“Rho-kinase is involved in diabetic nephropathy by modulating HIF-1 $\alpha$ -dependent signaling pathway.”

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川浪大治 (KAWANAMI, daiji)  
東京慈恵会医科大学 医学部 講師

研究者番号：50568889

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：