

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790883

研究課題名(和文) 低分子量GタンパクRac1の血管障害後の新生内膜形成における役割

研究課題名(英文) The Role of Smooth Muscle Rac1 in Neointimal Formation after Vascular Injury

研究代表者

李 ヨキン(LI, YUXIN)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：30599048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：smCre/Rac1^{fllox/+}(smRac1^{KO})マウスは頸動脈の血管障害による新生内膜の増殖を有意に抑制した。細胞培養で、VSMCの増殖能と遊走能は低下していた。その機序としては、smRac1^{KO}マウスのVSMCでは、ROSの産生が低下し、PAK1のリン酸化とERKのリン酸化は少なかった。またCyclinA、CDK4などの細胞周期に関連する遺伝子の発現は少なかった。さらに、分化型平滑筋細胞で多く見られ、脱分化すると減少するSM22の発現はsmRac1^{KO}マウスのVSMCで多くみられた。以上より、Rac1が新生内膜の増殖と血管リモデリングで重要な役割を果たしていることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Four weeks after carotid artery ligation, neointimal formation in smRac1^{+/-} mice was substantially reduced compared to control mice. SmRac1^{+/-} SMCs showed decreased chemotaxis, proliferation with decreased phosphorylation of PAK1, ERK, and reduced ROS production compared to that of control SMCs. Furthermore, the expression of cell cycle-associated genes, such as CyclinA, CyclinE, and CDK4 decreased in SMCs from smRac1^{+/-} mice than that in control mice. Moreover, the expression of SM22, a differentiation marker of smooth muscle and highly expressed in differentiated phenotypes of SMCs, was increased in smRac1^{+/-} mice than that in control mice. These results indicate that SMC Rac1 mediates vessel remodeling after intimal injury through inhibition of SMC migration, proliferation and differentiation. Therapeutic modalities, which target Rac1 in SMCs, therefore, may be beneficial in preventing vascular proliferative diseases.

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：分子血管病態学 血管障害 新生内膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 分子量 G タンパク質 Rac は Rho ファミリーの 1 つで、細胞骨格制御機能以外に細胞極性、細胞周期、細胞間接着制御にも関与する。

(2) Rac1 はメカニカルストレス、様々な刺激より血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖、遊走等に関与していることを報告されているが、VSMC における Rac1 の役割とその下流のシグナリング経路はまだ詳細が明らかにされていない。

(3) 最近では、Rac1 はメカニカルストレス、PDGF、AngII などの VSMC の制御に関与していることが報告されているが、VSMC における Rac1 下流のシグナリング経路に関する研究は僅かである。特に、VSMC 特異的に Rac1 をノックアウト (KO) し、VSMC における Rac1 の役割を明らかにする研究はまだ発表されていない。

2. 研究の目的

(1) 全身の Rac1KO マウスと平滑筋特異的 Rac1KO マウスを用いて、頸動脈結紮モデルでずり応力による新生内膜の形成を比較検討し、VSMC の Rac1 が新生内膜増殖と血管リモデリングを促進するかを明らかにする。

(2) 大動脈より VSMC を培養し、Rac1 による VSMC の細胞内骨格のアレンジ、増殖、粘着能、遊走能、また活性酸素の産生、アポトーシスなどの制御を明らかにする。また、経時的に頸動脈と VSMC のタンパク発現分析により、PAK1 などの Rac1 の下流タンパクの発現とリン酸化、サイクリンなどの細胞増殖、遊走に関わる蛋白の発現などを比較検討する。また、Rac1 の下流遺伝子を同定し、その発現、発現機構について検討し、VSMC における Rac1 下流のシグナリング経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 全身の Rac1KO マウスと平滑筋特異的 Rac1 KO マウス (smCre/Rac1^{flox/+}) を用いて実験を行う。左総頸動脈 (内、外頸動脈分枝の直前) の結紮モデルを作成する。ずり応力による新生内膜を増殖させ、増殖した新生内膜組織を経時的に (三日目、一週目、二週目、四週目) 病理検討を行う。

(2) マウスの大動脈から平滑筋細胞 (VSMC) を分離、培養する。刺激なし、またメカニカルストレス、PDGF などの刺激で、形態、粘着能、遊走能、増殖能、活性酸素産生能、アポトーシス、Rac1 の下流のタンパクの発現とリン酸化、細胞増殖、遊走に関わる蛋白の発現を比較検討する。

(3) さらに、VSMC から mRNA を抽出し、マイ

クローレイを行う。血管平滑筋における Rac1 の下流の遺伝子を同定し、シグナリング経路を見つける。

4. 研究成果

(1) 平滑筋特異的に Rac1 の発現を半分に低下させた smCre-Rac1+/flox マウスはコントロールマウスより頸動脈の血管障害による新生内膜の増殖を有意に抑制した。

(2) smCre-Rac1+/flox マウスの VSMC の増殖能と遊走能は低下していた。その機序としては、smCre-Rac1+/flox マウスの VSMC では、活性酸素種 (ROS) の産生が低下し、PAK1 のリン酸化と ERK のリン酸化は少なかった。また CyclinA、CyclinE と CDK4 などの細胞周期に関連する遺伝子の発現は少なかった。

(3) さらに、分化型平滑筋細胞で多く見られ、脱分化すると減少する SM22 の発現は smCre-Rac1+/flox マウスの VSMC で多くみられた。

(4) 以上の結果より、Rac1 が VSMC の増殖、遊走、脱分化などを制御し、障害血管の新生内膜の増殖と血管リモデリングで重要な役割を果たしていることを示唆された。

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 6 件)

(1) Kitano D, Chiku M, Li Y, Okumura Y, Fukamachi D, Takayama T, Hiro T, Saito S, Hirayama A. Miglitol improves postprandial endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndrome and new-onset postprandial hyperglycemia. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):92 査読あり
doi: 10.1186/1475-2840-12-92.

(2) Takayama T, Hiro T, Ueda Y, Honye J, Komatsu S, Yamaguchi O, Li Y, Yajima J, Takazawa K, Nanto S, Saito S, Hirayama A, Kodama K. Plaque stabilization by intensive LDL-cholesterol lowering therapy with atorvastatin is delayed in type 2 diabetic patients with coronary artery disease-Serial angiographic and intravascular ultrasound analysis. *J Cardiol*. 2013;61:381-6. 査読あり
doi: 10.1016/j.jjcc.2013.01.010

(3) Okamoto R, Li Y, Noma K, Hiroi Y, Liu PY, Taniguchi M, Ito M, Liao JK. FHL2 prevents cardiac hypertrophy in mice with

cardiac-specific deletion of ROCK2. FASEB J. 2013;27:1439-49 査読あり
doi: 10.1096/fj.12-217018

(4) Okada K, Ueda Y, Takayama T, Honye J, Komatsu S, Yamaguchi O, Li Y, Yajima J, Takazawa K, Nanto S, Saito S, Hirayama A, Kodama K. Influence of Achieved Low-Density Lipoprotein Cholesterol Level With Atorvastatin Therapy on Stabilization of Coronary Plaques. Circ J. 2012;76:1197-202. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Circ+J.+2012%3B76%3A1197-202>.

(5) Hirayama A, Saito S, Ueda Y, Takayama T, Honye J, Komatsu S, Yamaguchi O, Li Y, Yajima J, Nanto S, Takazawa K, Kodama K. Plaque-Stabilizing Effect of Atorvastatin Is Stronger for Plaques Evaluated as More Unstable by Angioscopy and Intravenous Ultrasound. Circ J. 2011 June;75(6):1448-54. 査読あり
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Circ+J.+2011+June%3B75\(6\)%3A1448-54](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Circ+J.+2011+June%3B75(6)%3A1448-54)

(6) Li Y, Hiroi Y, Ngoy S, Okamoto R, Noma K, Wang CY, Wang HW, Zhou Q, Radtke F, Liao R, Liao JK. Notch1 in Bone Marrow-Derived Cells Mediates Cardiac Repair After Myocardial Infarction. Circulation. 2011;123:866-76. 査読あり
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.947531

〔学会発表〕(計8件)

(1) Li Y, et al. Identification of Multiple Biomarkers That Predict the Extent of Plaque Burden in Coronary Culprit Lesions. Symposium. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 21-23, 2014 Tokyo

(2) Li Y et al. Pleiotropic Effects Of Statin In Stabilization Of Unstable Coronary Plaque - Direct Evidence From Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Pig. Scientific Sessions 2013 of American Heart Association. November 16-20, 2013 Dallas, Texas

(3) Sudo M, Li Y, et al. Development of Unstable Atherosclerotic Lesions in a Novel Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Pig. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 15-17, 2013 Yokohama

(4) Kitano D, Chiku M, Li Y. Short-term

Effect of Miglitol and Voglibose for Postprandial Endothelial Function in Acute Myocardial Infarction Patients with New Onset Postprandial Hyperglycemia. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 15-17, 2013 Yokohama

(5) Sudo M, Li Y, et al. Development of Hypercholesterolemia-Induced Complex Unstable Atherosclerotic Lesions in a Novel Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Pig. Scientific Sessions 2012 of American Heart Association. November 3-7, 2012 Los Angeles, CA

(6) Li Y, et al. Critical role of Rho kinase on Aortic Stiffness. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 16-18, 2012 Fukuoka

(7) Li Y, et al. Rho Kinase as an Important Mediator of Aortic Stiffness. Scientific Sessions 2011 of American Heart Association. November 13-15, 2011 Orlando

(8) Li Y, et al. Critical role of smooth muscle Rac1 in neointimal formation after vascular injury. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. August 3-4, 2011 Yokohama

〔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

李 ヨキン (YUXIN LI)

日本大学 / 医学部 / 助教

研究者番号 : 30599048

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :