

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591119

研究課題名(和文)肺高血圧症の新規治療ターゲット、筋特異的カベオラタンパクMURCの機能解析

研究課題名(英文) Novel functional mechanism of MRUC in pulmonary arterial hypertension.

## 研究代表者

小形 岳寛 (OGATA, Takehiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10402877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症の病態の一部にRho/ROCKシグナルが関与していると言われている。申請者らは筋特異的カベオラ関連タンパクMURCをノックアウトしたマウスで肺高血圧モデルを作製し評価したところ、対照と比べ有意に肺高血圧の程度が抑制されていた。ラット大動脈平滑筋細胞でMURC発現を抑制すると増殖・遊走が有意に抑制されRhoA活性も低下していた。同じカベオラ関連タンパクであるCaveolin-1(Cav1)はG<sub>13</sub>との結合によりRho/ROCKシグナルを抑制するが、MURCはCav1とG<sub>13</sub>との結合を弱め、G<sub>13</sub>の活性化を介してRho/ROCKシグナルが活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Emerging evidence suggests that the Rho/ROCK pathway is associated with pulmonary arterial hypertension (PAH). MURC/cavin-4, is a muscle-restricted caveolar-related protein. In this study, we found that in a chronic normobaric hypoxia model, MURC-knockout (MURC<sup>-/-</sup>) mice exhibited attenuated PAH and vascular remodeling compared with wild-type mice. Rat aortic smooth muscle cells had reduced RhoA activity, proliferation, and migration. Caveolin-1 (Cav1) which is a caveolar-related protein suppresses Rho/ROCK pathway through G<sub>13</sub> inactivation. MURC bound to Cav1 and inhibited the association between Cav1 and the active form of G<sub>13</sub>, resulting in facilitated Rho activation. These results suggest that the association of MURC with Cav1 promotes G<sub>13</sub>-mediated Rho/ROCK activation, which causes vascular remodeling and subsequent PAH.

研究分野：循環器病学

キーワード：肺高血圧症 カベオラ 平滑筋細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、肺血管の内膜肥厚、血栓などにより肺血管抵抗が上昇し、低酸素血症、右心不全を経て死亡する、原因不明の肺高血圧症である。症状の出現時には、かなり器質的变化が進んでいるため、2000年初頭までは診断確定から平均生存期間が3年と非常に予後不良な疾患であった。病理学的には肺血管壁肥厚が特徴的であり、何らかの原因で血管内皮細胞に障害され、トロンボキサン、セロトニン、ETなどの血管収縮因子の増加、PGI<sub>2</sub>や一酸化窒素(NO)といった血管拡張因子の減少が生じてPAHの病態を形成している、とされている。

(2) 上述の知見を基にPGI<sub>2</sub>製剤、ET拮抗薬、PDE-5阻害薬が治療に使われるようになり、それ以降の患者の生存率は著しく改善して来ているが、これらの治療はPAHの病期の進行を遅らせられるだけであり、根治治療とまでは言い難い。現在の治療は肺動脈の弛緩が主体の治療法であり、積極的に肺血管内膜肥厚の縮小させる新たな治療法が必要とされている。

(3) 申請者らは以前に、心筋細胞、骨格筋細胞、血管平滑筋細胞といった筋細胞特異的に発現する蛋白質MURCを単離・同定した。心臓に対する解析でMURCは心筋収縮能と刺激伝導系の維持に重要な役割を果たしており、また、MURCは心筋細胞内のRho/ROCKシグナル伝達に不可欠であることを示した。他施設との共同研究でMURCの遺伝子異常が家族性の拡張型心筋症患者に存在することも報告している。

(4) MURCは、その後の研究で細胞膜上のカベオラ形成に関わるカベオラ関連タンパクCavinファミリーの1つ(のちにCavin-4(別名)と命名)であることが明らかとされたが、同じカベオラ関連タンパクであるcaveolin-1(Cav1)がPAHの原因遺伝子の1つであることも明らかになっている。また、平滑筋細胞遊走にはRho/ROCKシグナルが関与している。

(5) MURCは心筋細胞だけでなく平滑筋細胞にも存在しており、心筋細胞と同様に平滑筋細胞内でもRho/ROCKシグナルに関与しているのであればPAHの発症・進展にも影響を与えている可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) 前述のように、PGI<sub>2</sub>製剤、エンドセリン(ET)拮抗薬、PDE-5阻害薬などの登場でPAH治療の進歩には目を見張るものがあるが、肺動脈における血管平滑筋細胞増殖の原因など、PAHの発症、進展メカニズムは不明な部分が多い。

(2) 本研究では、PAHに対する未知の発症・進展機構を探索するため、血管平滑筋細胞でのMURCの機能を解析し、PAHの新規治療ターゲットを創出できる可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 上述の目的を達成するため、全身MURC欠損(MURC-KO)マウスとSm22-CreマウスとMURC(flox/flox)マウスを掛け合わせて平滑筋細胞特異的にMURC遺伝子を欠損させた(平滑筋特異的MURC-cKO)マウスを作成した。これらのマウスを1%酸素濃度の低酸素チャンバー内で4週間飼育することにより、肺高血圧モデルを作製し、右室内圧の程度や組織像、タンパク・mRNA発現量についてHE&免疫組織染色、電子顕微鏡、ウェスタンブロット、realtime RT-PCR法を使って対照群と比較した。

(2) マウスで得られた結果を培養平滑筋細胞でも確認するべく、ラット大動脈平滑筋細胞、ヒト肺動脈平滑筋細胞に対しレトロウイルスベクターを用いてMURC過剰発現または発現抑制を行った。増殖能、遊走能はWST-1とp200ピペットチップによるスクラッチ法で、タンパク・mRNA発現、タンパクの局在評価は、ウェスタンブロット、realtime RT-PCR、免疫染色で行った。

(3) Cav1やRhoシグナルに関わるG13、p115RhoGEFとMURCの相互作用を検討には免疫沈降法のほかに、BiFC法とPull-down法を使用した。

## 4. 研究成果

(1) 4週間の低酸素チャンバー内飼育によりマウス肺高血圧モデルを作製したところ、野生型では肺高血圧の増悪に伴い著明に右室収縮期圧が上昇したが、全身MURC欠損であるMURC-KOマウスと平滑筋特異的MURC欠損であるMURC-cKOマウスの両群は野生型と比較し有意に右室収縮期圧が低下していた。組織切片での評価でも右室拡大がMURC-KO、平滑筋特異的MURC-cKO群で有意に抑制され、右室重量の増加も有意に抑制されていた。平滑筋特異的MURC-cKOにおいても肺高血圧症の抑制が認められたことから、SMA抗体による肺毛細血管の組織免疫染色を行ったところ、野生型の肺高血圧モデルで認められる著明な血管平滑筋細胞増殖による中膜肥厚がMURC-KO、平滑筋特異的MURC-cKOでは有意に抑制されていた。これらの所見から、MURC欠損による肺高血圧抑制のメカニズムには血管平滑筋細胞の遊走・増殖の抑制が重要である可能性が示唆された。

(2) MURCはカベオラ関連タンパクであり、他の関連タンパクであるCav1, Cav3, cavin-1の欠損では細胞種によってはカベオラが消

失することが報告されている。MRUC においては、心筋細胞で欠損させてもカベオラは消失しない。しかしながら、血管平滑筋細胞については未評価だったことから、透過型電子顕微鏡を用いて肺血管について新たに評価を行った。結果は心筋細胞の時と同様、肺血管平滑筋細胞のカベオラは消失しておらず形状も野生型との差異は認められなかった。このことから、MRUC 欠損による肺血管の肥厚は、血管平滑筋細胞の消失や形状変化といったカベオラの構造変化によるものではなく MRUC そのものの機能の欠如が重要である可能性が示唆された。

(3) 肺高血圧モデルで得られた結果をもとに、レトロウイルスベクターを使用して MURC 遺伝子を過剰発現または発現抑制をした培養血管平滑筋細胞に対して増殖能・遊走能の評価を行った。ラット大動脈平滑筋細胞、ヒト肺血管平滑筋細胞とも、MURC 発現を shRNA で抑制した細胞では遊走能・増殖能ともに有意に抑制され、MURC を過剰発現させた細胞ではそれらが有意に亢進していた。また、この亢進は Rho 活性を抑制する薬剤 (ROCK 阻害薬) Y-27632 の投与により抑制された。肺高血圧において Rho の活性化後に MYPT1 がリン酸化されるが、MURC-KO の肺高血圧群ではそれが有意に抑制されていた。これらの結果から、MURC 欠損による肺血管平滑筋細胞の遊走・増殖の亢進は Rho シグナルが重要であると考えられた。

(4) p115RhoGEF は Rho タンパクを不活性化型から活性化型への変換を促す GDP-GTP 交換因子の 1 つで、血管の緊張を制御している。免疫染色と BiFC 法による MURC と p115RhoGEF の細胞内局在評価では、これらのタンパクが細胞膜上に共局在していることが明らかになった。P115RhoGEF の dominant negative form である変異タンパク p115(2A) を投与すると MURC 過剰発現で引き起こされる Rho 活性が有意に抑制され、MURC による Rho 活性化には p115RhoGEF が関与していることが示唆された。

(5) ヒトにおいて P115RhoGEF は三量体 G タンパクの中の G<sub>12/13</sub> と結合することにより活性化される。肺高血圧症の原因遺伝子の一つである Cav1 はこれら G タンパクの機能を抑制する働きがあることが示されている。BiFC 法や免疫沈降反応にて MURC と Cav1 が細胞膜上に共局在し相互作用しうることを確認した後、ヒト平滑筋細胞内で Cav1 および MURC を過剰発現させ Rho 活性を評価したところ、Cav1 のみ過剰発現させると Rho 活性は抑制されたが、MURC も同時に過剰発現させるとその抑制が解除され Rho 活性は亢進した。GST を融合させた G<sub>13</sub> を使った pull down assay の結果から、MURC は Cav1 と同様に活性化型である GTP 結合型 G<sub>13</sub> と相互作用があること

が明内なった。さらに、GTP 結合型 G<sub>13</sub> と Cav1 が作用すると G<sub>13</sub> と p115RhoGEF との相互作用が減弱するが MURC は Cav1 の減弱作用に拮抗し、G<sub>13</sub> と p115RhoGEF の相互作用を強めることも明らかになった。

(6) 今回の研究成果により、肺血管平滑筋細胞内の MURC は Rho シグナルを制御することにより細胞増殖・遊走をコントロールしていることが明らかとなった。さらに、Rho シグナルの制御は Cav1 と G<sub>13</sub> の相互作用を MURC が抑制的に制御することによって p115RhoGEF からの Rho 活性化をコントロールしていることも判明した。肺高血圧症においてはこの肺血管平滑筋細胞内で MURC を介した Rho 活性の亢進が起こり血管中膜での細胞遊走・増殖が引き起こされ、肺高血圧の進展に寄与していることが示唆される。

(7) 今回明らかになった平滑筋細胞の遊走・増殖に関する知見は、これまで報告されてきたリン酸化や活性化型への変換といった機能を持たないタンパクである MURC でもシグナル伝達の制御に関わり得る、という点において非常に重要な知見と考えている。今回の成果が今後の肺高血圧症の治療ターゲットの創出に寄与することを期待している。

#### <引用文献>

- Ogata T et al. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Mol Cell Biol.* 28(10):3424-36, 2008
- Rodriguez G et al. Molecular genetic and functional characterization implicate muscle-restricted coiled-coil gene (MURC) as a causal gene for familial dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 4(4):349-58, 2011.
- Bastiani M et al. MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J Cell Biol.* 185(7):1259-73, 2009.
- Austin ED et al. Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet.* 5(3):336-43, 2012.
- Ohtsu H et al. Signal-crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH2-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(9):1831-6, 2005.
- Park DS et al. Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but

lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. Am J Pathol. 160(6):2207-17, 2002.

Hill MM et al. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. Cell. 132(1):113-24, 2008.

Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. Gene Dev. 16(13):1587-609, 2002.

Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. Pharmacol Rev. 54(3):431-67, 2002.

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 5件)

Nakanishi N, Ogata T, Maruyama N, Miyagawa K, Hamaoka T, Ueyama T. MURC/Cavin-4 deficiency alleviates pulmonary arterial hypertension. 第78回日本循環器学会学術集会(2014/3/21, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区)

Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Ueyama T. Deficiency of MURC/Cavin-4 alleviates pulmonary arterial hypertension. American Heart Association, Scientific Sessions 2013 (2013/11/19, グラスコンベンションセンター, テキサス州ダラス, アメリカ)

Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Ueyama T. MURC, regulates Rho/ROCK signaling in vascular smooth muscle cells and mediates the development of pulmonary arterial hypertension. 第21回日本血管生物医学会学術集会(2013/9/27, 千里阪急ホテル, 大阪府大阪市)

Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Naito D, Taniguchi T, Ueyama T, Matsubara H. MURC/Cavin-4, a muscle-specific caveolae-related protein, mediates the development of pulmonary arterial hypertension through enhanced G13/p115RhoGEF/RhoA signaling. 第77回日本循環器学会学術集会(2013/3/15, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市)

Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Naito D, Taniguchi T, Ueyama T, Matsubara H. MURC/Cavin-4, a Muscle-specific Caveolae-related Protein, Mediates

the Development of Pulmonary Arterial Hypertension Through Enhanced G13/p115RhoGEF/RhoA Signaling. 第3回 Molecular Cardiovascular conference II(2012/9/8, キロロリゾートホテル, 北海道余市郡赤井川村)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
該当事項なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小形 岳寛 (OGATA Takehiro)  
京都府立医科大学・循環器内科・助教  
研究者番号: 10402877