

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791372

研究課題名(和文)血管壁リモデリング制御因子Nogo-Bの分子機能解析

研究課題名(英文)Nogo-B controls vascular remodeling

研究代表者

近藤 ゆか (KONDO, Yuka)

三重大学・医学部附属病院・診療従事者等

研究者番号：90440677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Nogoは神経細胞発生や傷害治癒、免疫制御などに関与し特にNogo-Bは血管壁にて傷害後のリモデリングを抑制する。本研究は静脈グラフトにおけるNogo-B及び受容体Pir-Bの発現とその内膜肥厚抑制効果について検討した。【まとめ】グラフト肥厚内膜にはNogo-B及びその受容体であるPirBが発現。PirBは単球に存在し、血管壁に浸潤してきた単球PirBとNogo-Bが結合する。血管壁リモデリングにおいてNogo-Bやその受容体であるPirBの発現が変化し、炎症反応や細胞増殖を制御し壁肥厚をコントロールしている可能性が高く、内膜肥厚抑制に対する新たな治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Objective: Recent work has demonstrated that Nogo-B mediates vascular protection and may facilitate macrophage-driven vascular remodeling. PirB is an alternate receptor for Nogo-B. We examined whether PirB may play a role in regulating macrophage-mediated vascular remodeling and hypothesized that endothelial Nogo-B may regulate vein graft macrophage traffic via its alternate receptor PirB.

Conclusions: Vein graft adaptation shows increased expression of both Nogo-B and PirB. Loss of PirB, or its endothelial ligand Nogo-B, results in increased inflammatory cell infiltration and vein graft wall thickening. These findings suggest that PirB is a regulator of macrophage activity in vein grafts and that Nogo-B in the vein graft limits macrophage infiltration and vein graft thickening. Macrophage inhibition via Nogo-PirB interactions may be an important mechanism regulating vein graft adaptation to the arterial circulation.

研究分野：血管外科

キーワード：静脈グラフト リモデリング

1. 研究開始当初の背景

近年の生活習慣病患者の増加を背景に、動脈硬化に基づく血管病患者数は日増しに増える一方である。動脈硬化による血管の狭窄は冠動脈疾患や頸動脈狭窄症、下肢閉塞性動脈硬化症などを引き起こし、血管内治療やバイパス手術による血行再建術を要する病態に陥る。このような外科的血行再建術は、虚血に陥った組織や臓器の機能を著明に改善する。しかし一方で、長期的には血管内治療後の再狭窄や、グラフト壁の肥厚による狭窄・閉塞が少なからず生じる事が明らかとなっており、術後の長期成績維持における大きな障壁となっている。この解決すべき課題について、これまでに様々な病態や分子メカニズムの詳細が明らかにされ、薬剤投与や遺伝子導入による基礎的研究や臨床的研究の結果が数多く報告されてきた。

ところが、これらの研究報告をレトロスペクティブに検討すると、臨床的な有効性を認める新規の治療法確立に至ったとは決して言いがたい。実際に一般的な臨床応用まで至ったと言えるものは、冠動脈狭窄の血管内治療に用いられる薬剤溶出性ステント (Drug Eluting Stent: DES) だけである。またこの DES についても、その長期的有効性に関して近年では疑問視される報告が出始めている。このような現状から、血管壁リモデリングに基づく治療後の再狭窄に対して早急な解決が求められている。

2. 研究の目的

上記背景を元に本研究では血管壁リモデリング制御因子として近年注目されている Nogo-B について、その詳細な分子機構を解析することを目的とする。

新生内膜形成は、血管壁リモデリングでの内腔狭窄の主要な原因となる一方で、グラフトでは動脈環境への適合反応として、また血管内治療後の動脈壁では内膜傷害後の再内皮化という、重要かつ必須の生理的反応であるとも考えられている。このことから、治療後の血管壁リモデリングによる新生内膜形成は、治療として『抑制』するのではなく『制御』する必要があると考えられる。事実、先に述べた DES では再内皮化が障害されるため、術後早期に血栓を形成しやすく、長期の抗凝固剤の服用が必要になってしまう。

このような考察より、我々は血管壁の炎症反応を双方向的に制御している分子である Nogo-B に着目した研究を進めてきた。Nogo は神経細胞の発生や傷害後治癒、免疫反応の制御などに中心的な役割を果たす事が知られてきたタンパクであり、A、B、C の 3 つのサブタイプが存在する。2004 年、Yale 大学の W. C. Sessa らの研究チームにより、世界で初めて血管壁に Nogo-B の存在が証明され、さらに Nogo-B が傷害後の動脈壁リモデリングを抑制していることが明らかとなった。この研究結果を元にして、我々の協力研究機関

である Yale 大学血管外科の Alan Dardik らと共に研究を進め、静脈グラフトやバルーン傷害モデルでの Nogo-B の特徴的な発現パターンを確認し、リモデリングによる新生内膜肥厚を制御する事を証明してきた。また最近の研究結果からは、Nogo-B 受容体のひとつと考えられている Pir-B (LILRB-3) を介して、血管壁リモデリングで重要な炎症反応を担う単球細胞の活性をコントロールしている事が証明されつつある。

これらの結果から、血管壁リモデリングの形成プロセスにおいて Nogo-B やその受容体の発現が変化し、炎症反応や細胞増殖を制御して壁肥厚をコントロールしていることが強く示唆された。しかしその一方で、血管壁組織での Nogo-B の分子生物学的な作用機序については、その詳細が未だ明らかになっていない。加えて、血管組織に発現する Nogo-B 受容体に関しては、その機能や作用経路の検討がまだ始まったばかりである。Nogo-B 受容体については、神経組織では NgR、NgBR、Pir-B、OMGP 等が報告されてきているが、血管組織においてこれらの受容体の存在はまだ明らかになっていない。このような現状から、本研究では Nogo-B が持つ分子生物学的な役割について、特に単球系細胞に重点を置いた *in vitro* 系の解析を行い、Nogo-B が血管リモデリングを制御するメカニズムの本質に迫る。

3. 研究の方法

1) Nogo リガンドドメインと Pir-B 受容体の親和性評価

Nogo-B にはリガンドドメインとして Nogo66 loop (Ng66) と Amino Nogo-B (AmNgB) の 2 つの部位が知られているが、我々が特に注目している Ng66 と Pir-B 受容体については、直接結合するという証拠はまだない。また、Pir-B 以外に知られてる Nogo-B リガンドドメインの受容体についても、我々が確認した範囲では傷害後血管組織での発現を認めていない。そのため Pir-B は血管リモデリングにおける Ng66 の最も有力な標的候補であると考えている。そこでまず本研究では、2 分子間の親和結合性を、キネティクスアッセイを用いた生化学的手法により評価していく。

1-1) pcPir-B の作成

ヒト Pir-B の全長遺伝子は Open Biosystems (Thermo) より入手する。pShuttle-IRUS-hrGFP-2 ベクターに挿入するため、断端を SpeI と PvuI に合わせてデザインしたプライマーにより Pir-B 全長の PCR を行い、産物を PCR Purification kit (Qiagen) にて精製する。PCR 産物及び pShuttle ベクターは共に SpeI と PvuI にて切断処理し、アガロースゲルによる電気泳動法で分離する。カラム精製 (Gel Extraction kit/Qiagen) を行った後、T4-ligase を用いて Pir-B 遺伝子をベクターに挿入する。ライゲーション後に

DH5 コンピテント細胞へ導入し、クローニングにより正確にインサートされた pcPir-B をセレクションする。抽出したプラスミドはシーケンス解析を行い配列を最終確認する。1-2) アルカリフォスファターゼ(AP) 標識 Ng66 及び AmNgB の分離精製

Nogo リガンドドメインのペプチドは、過去の研究で我々が作成したものをを用いる。pcDNA1 ベクターに挿入した AP-Ng66 及び AP-AmNgB プラスミドを、それぞれ HEK293T 培養細胞に Lipofectamin を用いて導入し、24 時間後に無血清の細胞培養液に培地交換する。さらに 72 時間後に培地を回収し、培養液中のアルカリフォスファターゼ活性からペプチド濃度を測定する。

1-3) COS 細胞への pcPir-B トランスフェクションと AP 標識タンパク結合アッセイ法を用いたキネティクス解析

Pir-B と Nogo リガンドペプチドの親和性を観察するために、まず上記 1-1) で得られた pcPir-B を COS-7 細胞にトランスフェクションする。遺伝子導入 48 時間後に Pir-B の発現を確認した COS-7 細胞に 100-150 mM の AP-Ng66 もしくは AP-AmNgB を散布する。2 時間のインキュベーションを経て細胞の洗浄と破碎を行い、65 15 分で処理することで内因性アルカリフォスファターゼを不活化した後、細胞破碎溶液の上清を分離し、アルカリフォスファターゼ活性を測定する。コントロールには AP 単独のペプチドを使用する。

2) Nogo-B リガンドによるマウス骨髄性単球の活性制御機能

我々がこれまでに *in vivo* 系で観察してきた Nogo-B の単球系細胞制御について、細胞機能検査による *in vitro* 解析で検討する。Nogo-B リガンドに対する受容体については依然不明な部分が多く、前年度に行う Pir-B との関連性に関わらず、以下の項目は Nogo-B の血管壁肥厚制御メカニズムを理解する上で重要な検討事項と考えられる。

2-1) マウス骨髄からの単球単離(WT, Pir-B KO)

Pir-B ノックアウトマウスは、Stanford 大学の Dr. Carla Shatz の好意により供与されたものを繁殖して用いる。マウスを犠牲死させた後、大腿骨より骨髄を採取する。フィルターによる濾過の後、Histopaque-1083 (Sigma Aldrich) を用いて単球を遠心分離し、20%FBS/RPMI にて約 10 日間培養して実験に十分な細胞数を確保する。単離精度は CD45 及び CD68 でラベルして FACS により確認する。

2-2) 単球遊走機能の解析

遊走機能は Boyden chamber を用いて評価する。5.0 μ m のポアサイズ膜を使用し、下方チャンバーには MCP-1(100ng/ml) をアプライして単球遊走能を刺激する。上方チャンバーには 1.0x10⁴ cell / 50 μ l の単球と、ウェルごとに濃度勾配をつけた AP-Ng66/AP-AmNgB をアプライする。6 時間のインキュベーションの後、膜に侵入した細胞を観察するため、洗

浄の後にヘマトキシリン溶液にて染色し検鏡する。

2-3) 単球接着機能の解析

マウス大動脈よりクローニングした血管内皮細胞を 96 穴平底プレートに培養する。コンフルエント状態で、培養液を AP-Ng66/AP-AmNgB を加えた PBS に交換し、そこに MCP-1 で前処理された 1.0x10⁴ cell / 50 μ l の単球をアプライする。単球の内皮細胞への接着状況は FITC-CD45 で染色して検鏡観察する。

3) Nogo-B によるタンパク発現制御の網羅的解析

動物モデルでの各種実験結果から、Nogo-B が単球活性に影響を及ぼしている事は明らかであるが、一方で細胞内のシグナル伝達系に及ぼす効果や、それに伴う細胞表面の接着因子発現、サイトカイン分泌に及ぼす影響についてはまだ未確認である。本項目では最新のプロテインアレイ法を用いて網羅的解析を行い、タンパク発現傾向の全体像を明らかにしていく。培養下に十分量の細胞数を確保した単球を MCP-1 であらかじめ刺激しておく。上記実験 2) において最も効果に差が出た濃度の AP-Ng66/AP-AmNgB を単球にそれぞれ投与し、24 時間後に細胞を採取する。破碎、分離、タンパク濃度測定の後、プロテインアレイ法 (ProtoArray® Protein MicroArray) を用いてタンパク発現制御の網羅的解析を行う。本アレイプレートにはキナーゼ、転写因子、膜タンパク、核タンパク、シグナリング、サイトカイン、アポトーシスなど様々な約 9,400 種類のタンパク質がスポットされており、定性的にはあるが、非常に多彩なタンパクの発現傾向を同時に知ることが出来る。この実験結果に基づき、有力な候補タンパクについてはそれぞれの抗体を用いた Western blotting による確認実験と発現量の相対的定量を行う。

4. 研究成果

1. にて作成した AP-Nogo66 を用いての検診からは、Nogo66 は静脈グラフトの動脈環境への適合においては PirB と結合することにより壁肥厚を抑制する働く事が示唆された。

Pir-B と Nogo リガンドペプチドの親和性を観察するために、まず上記 1 (図 1) で得られた pcPir-B を COS-7 細胞にトランスフェクションし、内因性アルカリフォスファターゼを不活化した後、細胞破碎溶液の上清を分離、アルカリフォスファターゼ活性を測定したところ、AP-Nogo66 と結合した PirB におけるチロシンキナーゼ活性が増加した。(図 A)

2. により単球遊走能を Boyden chamber を用いて検討したところ、Ng66 は PirB を介して単球の遊走を阻害している事が示唆された。

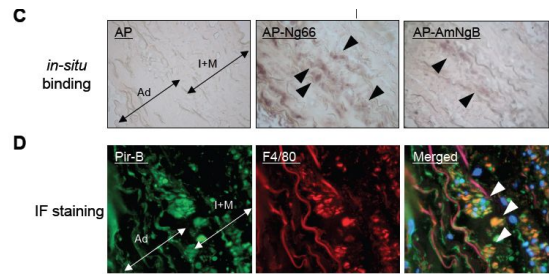
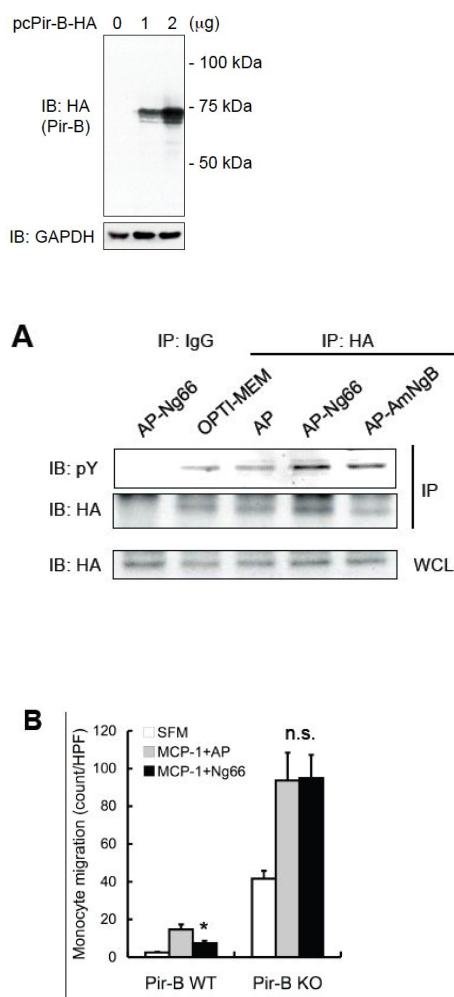
PirB ノックアウトマウスから分離された単球は WT マウスからの単球と比較して遊走

能が増加していた。また WT マウスから分離された単球を AP-Nogo66 で刺激したところ遊走能は減少していた。逆に PirB ノックアウトマウスから分離された単球を同様に AP-Nogo66 で刺激したところ、遊走能は抑制されなかった。(図 B)

単球接着能の検討においてはマウスにおける内皮細胞培養が進んでいなかったためにヒト静脈グラフトの切片を用いて行った。グラフトに AP-Nogo66 を結合させたところ、グラフトの内膜と外膜間に AP-Nogo66 が結合した。これは PirB 陽性細胞と同様の部位に結合しているように考えられた。(図 C) そのため免疫組織染色を行って確認したところ、Am-Nogo66 が結合している細胞は PirB 陽性及び F4/80 陽性との結果から、単球における PirB ではないかと示唆された。(図 D)

上記検討から Nogo-B は静脈グラフトの壁肥厚における促進因子である可能性が示唆された。また単球はグラフトリモデリングに重要な役割を果たすとともに、PirB を介した単球がグラフト保護機構に対する刺激因子となっている可能性も示唆された。

図 1



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 4 件)

Model LS, Hall MR, Wong DJ, Muto A, Kondo Y, Ziegler KR, Feigel A, Quint C, Niklason L, Dardik A. Arterial shear stress reduces eph-b4 expression in adult human veins. *Yale J Biol Med.* 査読有、2014 Sep 3;87(3):359-371.

Kondo Y, Jadlovec CC, Muto A, Yi T, Protack C, Collins MJ, Tellides G, Sessa WC, Dardik A. The Nogo-B-PirB axis controls macrophage-mediated vascular remodeling. *PLoS One.* 査読有、2013 Nov 20;8(11):e8101,doi:10.1371/journal.pone.0081019.

Yang C, Guo Y, Jadlovec CC, Li X, Lv W, Model LS, Collins MJ, Kondo Y, Muto A, Shu C, Dardik A. Vascular endothelial growth factor-A inhibits EphB4 and stimulates delta-like ligand 4 expression in adult endothelial cells. *J Surg Res.* 査読有、2013Jul;183(1):478-86.doi:10.1016/j.jss.2013.01.009.

Jadlovec CC, Feigel A, Yang C, Feinstein AJ, Kim ST, Collins MJ, Kondo Y, Muto A, Dardik A. Reduced adult endothelial cell EphB4 function promotes venous remodeling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 査読有、2013 Apr 1;304(7):C627-35.doi:10.1152/ajpcell.00333.2012.

(学会発表)(計 3 件)

近藤ゆか、武藤紹士、阪本瞬介、平野弘嗣、金光真治、新保秀人、Alan Dardik 加齢性の Notch-4 発現低下が静脈グラフト壁リモデリングに与える影響 第 114 回 日本外科学会総会 2014 年 4 月 3 日-5 日 国立京都国際会館、京都府、京都市

Jadlovec CC, Kondo Y, Muto A, Yi T,

Protack C, Collins MJ, Tellides G, Sessa WC, Dardik A. The Nogo-B-PirB axis controls macrophage-mediated vascular remodeling. the2013 Surgical Fourum of the American College of Surgeons, 10/06-10/10/2013, Washington, DC, USA.

武藤 紹士 (Muto, Akihito)
新保 秀人 (Shimpo, Hideto)
Alan Dardik (Dardik, Alan)

静脈グラフトにおける内膜肥厚抑制効果-Nogo-Bの役割 近藤ゆか、武藤紹士、Tai Yi、北條玲奈、平野弘嗣、金光真治、下野高嗣、新保秀人、Alan Dardik 第113回日本外科学会総会 2013年4月11日-13日 福岡国際会議場/福岡サンパレス/マリメッセ福岡、福岡県、福岡市

〔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：
出願年月日：
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

近藤 ゆか (Kondo, Yuka)
三重大学・医学部附属病院・診療等従事者
研究者番号：90440677

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者