

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791396

研究課題名(和文)新規大動脈瘤形成抑制分子Hic-5の機能解析

研究課題名(英文) Identification of Hic-5 as a novel molecule in the development of abdominal aortic aneurysms

研究代表者

雷 小峰 (Lei, Xiao-Feng)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：00595069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤は無症状のまま拡大進行し、放置すれば破裂死に至る恐れがある。その形成過程では様々な分子作用により制御され、近年特に活性酸素種(ROS)が病変部で著明に増加し、動脈瘤形成に深く関与することがよく知られている。我々は腹部大動脈瘤モデルマウスを用いてROSにより発現誘導される遺伝子Hic-5(hydrogen peroxide-inducible clone-5)の動脈瘤形成過程への関与を検討した。その結果、Hic-5欠損マウスでは動脈瘤の形成及び動脈瘤破裂による死亡がほぼ完全に抑制された。Hic-5が大動脈瘤治療ターゲット分子として提唱された。

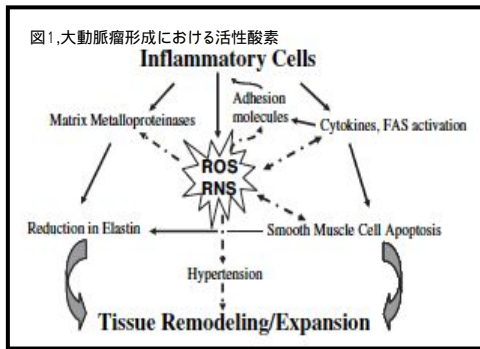
研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) play a key role in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm (AAA). However, the precise mechanism of cellular signaling by ROS in the pathogenesis of AAA has not been fully elucidated. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) was identified as a H₂O₂ and TGF beta-inducible gene. Using the AngII-induced AAA mice model, we showed that Hic-5^{-/-} mice were completely protected from AAA formation. Hic-5^{-/-} mice show decreased elastic lamina degradation, aortic expansion and rupture. Mechanistic studies showed that Hic-5 interacts as a scaffold protein specifically with JNK2 and its upstream MKK4, resulting in the phosphorylation of JNK2 and consequent MMP2 expression. Hic-5 serves as a scaffold protein specifically for activating the JNK2 pathway, thereby leading to the induction and activation of MMPs in SMCs and subsequent AAA formation. Thus, Hic-5-targeted therapy may provide a novel therapeutic option for the treatment of AAA in the future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景：大動脈瘤は病変部位に細胞外マトリックス (ECM) 分解亢進や炎症細胞浸潤の組織特徴を示す血管疾患である。その形成過程では様々な分子作用が制御され、近年特に活性酸素種 (ROS) が病変部で著明に増加し、動脈瘤形成に深く関与することがよく知られている (図 1)。申請者は ROS により発現誘導される遺伝子 Hic-5 (hydrogen peroxide-inducible clone-5) が、動脈瘤病変形成過程で主要な役割を担う血管平



滑筋細胞に高発現していることから、apolipoproteinE (apoE) 欠損マウスにアンジオテンシン (Ang) を持続投与することにより誘導される腹部大動脈瘤 (AAA: abdominal aortic aneurysm) モデルマウスを用いて Hic-5 の動脈瘤形成過程への関与を検討した。その結果、Hic-5/ApoE 両遺伝子欠損マウスでは動脈瘤の形成及び動脈瘤破裂による死亡がほぼ完全に抑制された (図 2)。Hic-5 は細胞の ECM への接着点である細胞接着斑に局在するアダプター蛋白質であるが、酸化ストレス存在下では核へ移行し遺伝子発現を制御することが研究協力者 (金山朱里講師) らにより報告されている。これまで酸化ストレスは大動脈瘤形成を促進することが明らかになっている一方で、酸化ストレスの下流でどのような分子メカニズムにより動脈瘤が引き起こされるのか、ほぼ未解明であった。具体的な分子として 2009 年、ROS 産生そのものを制御する分泌蛋白 CyclophilinA が動脈瘤発症に関与することがようやく報告された段階にすぎない。本疾患のリスク因子である高血圧や動脈硬化が高齢化とともに増加傾向にあることを考えると、本疾患は今後さらに増え続けることが予想される。よって大動脈瘤、大動脈解離は心血管領域の基礎、臨床の双方における最重要課題の一つであり、動脈瘤の発症メカニズムを分子レベルで明らかにする必要性と緊急性がある。

2. 研究の目的：本研究は、動脈瘤発症に主役を果たす血管平滑筋細胞で Hic-5 の高い発現を示すことや、動脈瘤形成の誘因である酸化ストレスにより細胞内の Hic-5 局在が変化することに着目し、動脈瘤発症過程で起きる

病変部構成細胞形質への Hic-5 の積極的な関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法：

(1). 大動脈瘤モデルマウスの作製と解析
hic-5^{+/+} (ApoE^{-/-}/hic-5^{+/+}) および hic-5^{-/-} (ApoE^{-/-}/hic-5^{-/-}) マウスに 1000 ng/min per kg の Ang を 4 週間持続皮下投与し腹部大動脈瘤モデルマウスを作製し、動脈瘤径を定量、数値化する。AAA の死亡例を弾性繊維損傷度と炎症細胞浸潤程度で大動脈瘤形成グレードを評価した後、下記の解析を行う。

(2). 大動脈瘤発症抑制メカニズムに関する組織学的解析

発症メカニズムの解析には Ang 投与 1 週間後の早期動脈瘤病変を用い、まず ApoE^{-/-}/hic-5^{+/+} マウス由来病変組織は抗 Hic-5 抗体で共染色し、初期病変構成細胞内で Hic-5 発現の確認できる細胞群を同定、定量する。以前、動脈瘤の基礎疾患でもある動脈硬化病変において、平滑筋細胞とマクロファージに Hic-5 の発現が確認されていることから、現時点では両細胞群の関与が想定される。そこで平滑筋細胞、マクロファージを対象とした以下の検討を行う。

血管平滑筋細胞機能制御への関与

動脈瘤の発症には中膜平滑筋細胞が産生する ROS およびその下流での MMP 活性化が主因の一つとして知られている。そこで、病変組織切片と DCFH-DA を用いて細胞内活性酸素の産生量や、蛍光 gelatin による In situ zymography で MMP 活性を測定する。さらに ApoE^{-/-}/hic-5^{-/-} 病変形成はほぼ完全に抑制されたことからマクロファージや CD45⁺細胞の集約抑制が想定されるため、平滑筋細胞によって産生される単球遊走因子 (MCP-1) の発現量を免疫染色、ウエスタンブロットで検討する。

マクロファージ機能制御への関与

上述の MCP-1 発現量のみならず、病変単位面積あたりのマクロファージ量を定量する。また蛍光組織免疫染色や免疫電子顕微鏡法によりマクロファージ内の細胞内局在を調べる。免疫電子顕微鏡法は感度良く抗原を検出できる系が既に確立されている。また CD45⁺細胞内 Hic-5 発現の有無を検討することによって今後の解析対象に含めるか判断する。

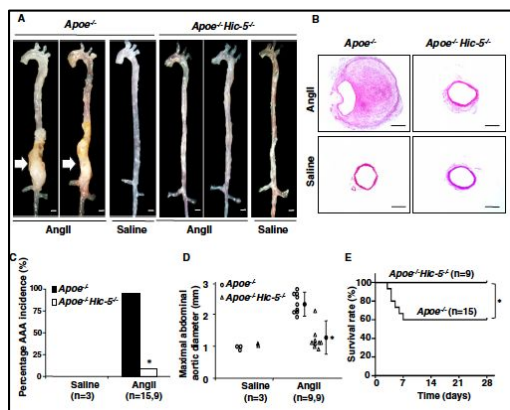
(3). 大動脈瘤発症抑制メカニズムに関する細胞生物学、分子生物学的解析

マウス病変の組織学的解析で確認された変化を、マウスより分離した初代培養細胞 (血管平滑筋細胞、単球/マクロファージ) を用いて、細胞レベルでの ROS 産生能、細胞遊走能 (Bydenchamber) MMP 活性、MCP-1 発現量を上述の方法で検討し、さらにその分子機構について下記の方法で検討する。Hic-5 は細胞接着斑での機能を持つと同時に、直接核内へ移行し遺伝子発現を誘導

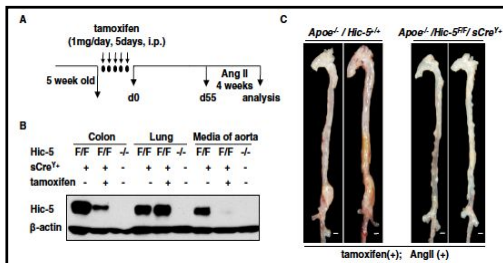
したり、アクチン骨格系上に局在するなど、細胞内局在部位を変化させることが証明されている。このことから、核での機能および細胞骨格系制御を介したメカニズムの両方を想定に入れ実験を行う

4. 研究成果:

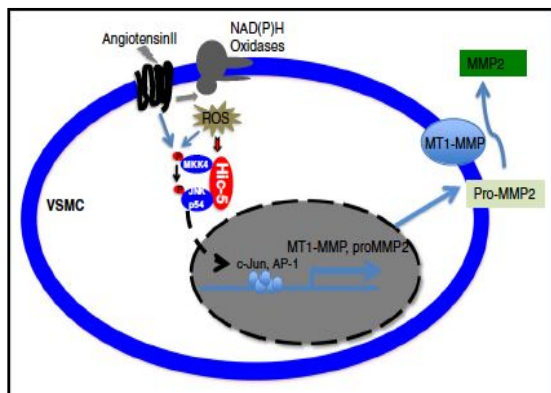
(1) マウス腹部大動脈瘤モデルにおいて、Hic-5 欠損により腹部大動脈瘤の形成および動脈瘤破裂による死亡をほぼ完全に抑制できることを見出した(下図)。



(2) この現象は、平滑筋細胞特異的な Hic-5 コンディショナルターゲットマウスにおいても再現され、平滑筋細胞内の Hic-5 が動脈瘤発症に重要であることを示した(下図)。



(3) その分子メカニズムとして、Hic-5 が JNK2-MKK4 間のリン酸化反応の scaffold (足場) として機能し、下流の MMP2 や MMP14 の発現抑制を介して ECM のリモデリングを抑制した結果、動脈瘤の発症を抑制したことを明らかにした(下図)。



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)

(1) Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita-Okubo S, Offermanns S, Itabe H, Miyazaki T, Miyazaki A. Identification of Hic-5 as a Novel Scaffold for the MKK4/p54 JNK Pathway in the Development of Abdominal Aortic Aneurysms. *J Am Heart Assoc.* 2014 May 8;3(3):e000747. 査読有 doi:10.1161/JAHA.113.000747.

(2) 坂下直実, 雷小峰, 上川将史. 電子顕微鏡を用いたマクロファージの機能解析: ACAT1 陽性小胞と ACAT1 陽性後期エンドソームの発見ならびにその意義. *病理と臨床.* 2013 vol. 31 no. 12 査読有 <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ag9brysh/2013/003112/016&name=1363-1368j&UserID=202.254.227.190>

(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):228-37. 査読有 <http://dx.doi.org/10.5551/jat.14787>

(4) 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 IIb 3 activation and platelet aggregation in mice. *J Thromb Haemost.* 2012 Sep;10(9):1867-74. 査読有 doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04856.x.

(5) 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):601-7. Epub 2012 May 4 <http://dx.doi.org/10.5551/jat.10736>

[学会発表](計 5 件)

(1) 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ファージ pinocytosis の制御. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会.(大阪, 2013 年 9 月)

(2) 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)

(3) Shigeko Arita, Joo-ri Kim-Kaneyama, Xiao-Feng Lei, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. 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)

(4) Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Shigeko Arita, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. 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)(優秀ポスター賞)

(5) Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Shigeko Arita, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Hic-5 deficiency blocks the development of abdominal aortic aneurysms in mice. The17th international vascular biology meeting, (Wiesbaden, June, 2012)

〔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
http://www10.showa-u.ac.jp/~biochem/Biochem/Biochem_top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雷 小峰 (Xiao-Feng Lei)
昭和大学医学部生化学講座 助教
研究者番号：00595069

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：