

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830067

研究課題名(和文)色素上皮由来因子を標的とした新しい動脈硬化モデルの開発

研究課題名(英文) Pigment epithelium-derived factor as a target for development of new animal model of arteriosclerosis

研究代表者

松井 孝憲 (Matsui, Takanori)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10425233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血管保護的に作用する色素上皮由来因子(PEDF)の機能的受容体として、ラミニン受容体を同定し、PEDFとラミニン受容体の結合、培養細胞におけるPEDFを介したラミニン受容体の作用について検討をおこなった結果、PEDFによる血管保護作用(VEGF、MCP-1、ICAM-1、PAI-1遺伝子発現の抑制)は、ラミニン受容体との結合を介していることが示された。そこで、ヒトラミニン受容体遺伝子で改変したマウス(LR-Tgマウス)を作製し、動脈硬化症を発症させることで動脈硬化症の発症・進展機構の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：We identified laminin receptor as a functional receptor for pigment epithelium-derived factor (PEDF) which act atheroprotective. We investigated PEDF exert atheroprotective effects via association with laminin receptor. To investigate how arteriosclerosis develop, we generated laminin receptor transgenic (LR-Tg) mice that ubiquitously express human laminin receptor.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管保護作用 動脈硬化症 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣の欧米化に伴い、高血圧・高脂血症・糖尿病・肥満といった動脈硬化を促進させる疾患が年々増え続けている。動脈硬化を基盤とした疾患としては、心筋梗塞をはじめとした心血管イベントや脳血管障害などがある。これらはそれぞれ日本人の死亡原因の第二位と第三位であり、全体の40%に近い割合を占めている。動脈硬化症の治療方法としてはバルーンカテーテルによる経腔的血管形成術が一般的であるが、その後の再狭窄を伴う血管のリモデリングが問題となっており、効果的かつ臨床応用可能な新規治療法の開発が必要とされている。

一方、我々が以前より注目している PEDF は、1989 年にヒト網膜色素上皮細胞から単離された分子量約 50kDa の分泌性蛋白質で、酸化ストレスによる神経細胞傷害を抑制することが明らかにされた(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993;90,1526-1530)。各主要臓器をはじめとして血中等様々な組織に存在することが報告された(Mol. Vis. 1996;2(11))。最近我々は、バルーン傷害法を用いた血管再狭窄の動物モデルを用いて、PEDF は血管の狭窄及び NADPH oxidase 由来の酸化ストレスを阻害し、血管リモデリングを抑制することを明らかにした(Am. J. Pathol. 2007; 170(6): 2159-70)。この結果より PEDF は動脈硬化症治療のための新しい分子標的となり得ることが示唆された。

加えて我々は PEDF の生体内の機能について、脳浮腫に伴う血管透過性亢進を抑制すること(Brain Res. 2007; 1167:92-100)、動脈血栓を抑制すること(Atherosclerosis 2008; 197(1): 25-33)など、PEDF が多様な血管保護機能を有することを動物モデルにおいて明らかにしてきた。

しかし、上記の抗酸化ストレス、抗炎症、抗動脈硬化作用等を担う PEDF の機能的受容体は未だ不明なままである。動脈硬化症の克服には、PEDF の多機能的血管保護作用を媒介する受容体を同定し、その情報伝達系を明らかにすることが治療戦略を検討する上で極めて重要である。以上の背景から我々は「PEDF の機能的受容体を明らかにし、遺伝子改変動物を作製できれば新しい動脈硬化症モデルの開発につながり、動脈硬化症の発症・進展を解明できるのではないか」と着想するに至った。本研究では、血管における PEDF の受容体の解析を経て新しい動脈硬化症モデルを作製しようとするものである。

2. 研究の目的

本研究は動脈硬化症の新規治療法の確立を目指し、新しいモデル動物の開発を目的としておこなう。そのために、生体内で血管保護的に働き血管内皮のバルーン障害に伴う血管狭窄を抑制する色素上皮由来因子(Pigment Epithelium Derived Factor: 以下 PEDF)の機能的受容体を新たに同定し、

その機能を解明する。さらにバルーン障害による血管狭窄モデル動物および PEDF 受容体の遺伝子改変動物を作製し、血管狭窄を伴う動脈硬化に及ぼす当該 PEDF 受容体の役割を明らかにする。PEDF 受容体を介した動脈硬化症の新しいモデルを得ることにより、動脈硬化症の発症・進展機構の理解を進めその解明を模索する。

3. 研究の方法

(1) PEDF 受容体蛋白質の同定。

ヒト血管平滑筋細胞において PEDF と特異的に結合する膜蛋白質を得て質量分析法により解析し、受容体構造を持つ蛋白質を同定する。遺伝子全長をクローニングし発現プラスミドを作製し、受容体蛋白質を得た後、抗体を作製する。PEDF 受容体蛋白質が PEDF と同様に血管平滑筋細胞の血小板由来増殖因子による細胞増殖、細胞遊走を抑制するか否かを *in vitro* の実験系により検討する。次いで PEDF 受容体の局在、機能の評価を動物実験により検討する。健常マウスの血管壁における PEDF 受容体の局在を検討後、バルーンカテーテルを用いた傷害により血管狭窄モデルを作製し、同部位における血管リモデリングに及ぼす PEDF 受容体の機能を検討する。

ヒト血管平滑筋培養細胞の可溶性画分から、免疫沈降法にて PEDF と結合する蛋白質画分を回収する。

回収した PEDF 結合画分を電気泳動後、質量分析法にて各含有蛋白質を同定する。

同定された蛋白質候補群より受容体構造を有する蛋白質を選抜し、遺伝子のクローニングをおこなう。

PEDF 受容体発現プラスミドを作製し、PEDF 受容体蛋白質の精製をおこなう。

PEDF 受容体と PEDF が特異的結合を示すか表面プラズモン解析(BIACORE)を用いた解析をおこなう。

PEDF 蛋白質に対する抗体、siRNA を作製する。

(2) PEDF 受容体の *in vitro* における機能評価

血管平滑筋細胞を増殖因子により刺激した際の PEDF 受容体の発現量の変化をウエスタンブロット法、real-time PCR 法により検討する。

血管平滑筋細胞の増殖、遊走を PEDF 受容体の過剰発現または siRNA によるノックダウンにより、抑制または促進しうるか否かをヒト平滑筋培養細胞の増殖(3H-ラベルチミン取り込み)、遊走(ボイデンチャンバー法)の評価により検討する。

(3) PEDF 受容体遺伝子で改変した動脈硬化モデルマウスを作製。

PEDF 受容体の血管壁における意義、機能を検討する。具体的には、PEDF 受容体のトランスジェニックマウスを作製する。得られた遺伝子改変マウスを用いて頸動脈血管狭窄モデルを作製し、動脈硬化モデル動物における

PEDF 受容体の機能、意義について検討する。PEDF 受容体遺伝子改変動物の作製は PEDF 受容体の機能解析に必要不可欠である。これまでの我々の検討では、PEDF のトランスジェニックマウスはテトラサイクリン誘導下でのみ作製可能であった (PEDF が発現に重要な役割を果たしている可能性がある)。従って PEDF 受容体のトランスジェニックマウス作製においても、出生後にテトラサイクリンの投与により発現調節可能なテトラサイクリン誘導型 PEDF 受容体トランスジェニックマウス (PEDF-R_TG mouse) を作製する。

血管狭窄モデルの作製

C57BL/6J 野生型マウス (雄 10 週齢) を用いる。腹腔内麻酔下で頸動脈を露出し、ガイドワイヤーを挿入後にワイヤーを 360 度回転させ (3 回)、内皮傷害を引き起こす。皮膚を縫合し手術終了とする。14 日目に狭窄を生じ、血管狭窄モデルとなる。

血管狭窄の評価

狭窄を生じた頸動脈を切離し、ヘマトキシリン - エオジン染色後の組織学的解析により、血管狭窄が起こっているか否かを検討する。

血管内腔面積、血管壁肥厚を画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて解析をおこなう。同部位における細胞増殖の指標として cyclin D1、cyclin E などについて、細胞増殖抑制因子の指標として p21、p27、p53 などについて免疫染色法及びウェスタンブロット法、real-time PCR 法を用いて検討する。

血流量の評価

血管狭窄モデル群、Sham 群の手術部頸動脈の血流量をエコー Doppler により計測する。

4. 研究成果

血管保護的に作用する色素上皮由来因子 (PEDF) の機能的受容体として、ラミニン受容体を同定し、PEDF とラミニン受容体の結合、培養細胞における PEDF を介したラミニン受容体の作用について検討をおこなった。PEDF はミエローマ細胞において、VEGF、MCP-1、ICAM-1、PAI-1 遺伝子発現を顕著に減少させた。ところが、ラミニン受容体の発現を siRNA 法によりノックダウンしたところ、PEDF による各種遺伝子発現の抑制効果は失われた。もうひとつの PEDF 受容体の候補である ATGL (adipose triglyceride lipase) をノックダウンしても、PEDF の作用に変化はみられなかった。さらに、ラミニン受容体の中和抗体またはラミニン受容体のアンタゴニストはラミニン受容体に結合し、上記遺伝子発現を抑制するだけでなく、PEDF とラミニン受容体の結合をブロックすることがわかった。また、高濃度のラミニン受容体アゴニストはミエローマ細胞において PEDF 様に作用し、各種遺伝子発現を抑制していた。以上の結果より、PEDF による血管保護作用 (VEGF、MCP-1、ICAM-1、PAI-1 遺伝子発現の抑制) は、ラミニン受容体との結合を介していることが示された。そこで、ヒトラミニン受容体遺伝子で

改変したマウス (LR-Tg マウス) を作製した。ヒトラミニン受容体遺伝子に CMV プロモーター、ヒト β -globin chimeric intron、 β -globin leader sequence、SV40 後期ポリアデニル化シグナル配列を付加した DNA 断片をマウス胚に移植した。当該 DNA 断片がマウス染色体中に挿入された個体を、二匹得ることができた。二匹のいずれとも、交配による当該遺伝子の伝達を確認できた。そこで動脈硬化モデルの作出をおこなったが、LR-Tg マウスは当初の計画である、マウス頸動脈の血管内皮障害にともなう再狭窄の検討は、モデルの作出率が低く評価に必要な検体数を得られなかったため、平行して糖尿病モデルによる血管障害の検討をおこなった。ストレプトゾトシンの投与を 200mg/kg-BW で単回投与したところ、投与 2 日後に高血糖を呈する個体は安定して得られたが、その後一週間以内に相次いで死亡してしまっただため、50mg/kg-BW/day で 5 日間おこなったところ、高血糖を呈する LR-Tg マウスおよび野生型マウスを安定して作出した。

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 1 件)

Takanori Matsui, Yuichiro Higashimoto, Sho-ichi Yamagishi. Laminin receptor mediates anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of pigment epithelium-derived factor in myeloma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443 (2014) 847-851.

[学会発表](計 0 件)

[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

松井 孝憲

(MATSUI

TAKANORI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10425233

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：