

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461149

研究課題名(和文)細胞接着斑分子Hic-5を標的とした新たな動脈硬化性疾患治療戦略の構築

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapeutic strategy for atherosclerosis utilizing a focal adhesion adaptor molecule

研究代表者

金山 朱里 (Kaneyama, Shuri)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：10338535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では動脈硬化病変形成過程および動脈瘤発症への関与が示された細胞接着斑アダプター分子であるHic-5の発現抑制による病変の進行度を検討した。さらに平行してHic-5阻害ペプチドの設計を行った。その結果、ApoE欠損マウスを用いて作製した動脈硬化病変および大動脈瘤モデルにおいて、hic-5/siRNA投与により病変形成抑制傾向が認められた。さらにHic-5阻害ペプチドとして設計した候補配列8種類を用いて各種assayにて阻害効果を検討したところ、Hic-5欠損細胞でのリン酸化抑制が報告されているシグナル伝達分子において、そのリン酸化を抑制できるHic-5阻害ペプチド配列が同定できた。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen peroxide-inducible clone-5 (Hic-5) is a focal adhesion adaptor protein, which is involved in vascular disorders such as atherosclerosis and aneurysms. To evaluate the therapeutic potential of Hic-5 in vascular disorders, Hic-5 siRNA was intravenously injected through the tail vein of the HCD-fed or AngII treated apoE deficient mice. Hic-5 knockdown significantly suppressed the formation of atherosclerotic and aneurysmal lesions. Moreover, we report the structure-based design of new potent peptides with Hic-5 inhibitory efficiency. The peptides are developed by rational design, based on structural and physicochemical properties. In vitro analysis shows that some of the peptides possess a significant inhibitory effect against Hic-5.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Hic-5 細胞接着斑 動脈硬化性疾患

1. 研究開始当初の背景

脂質異常症治療薬を主体としたコレステロール低下療法により、心血管イベントの発症を約 30% 抑制することができるようになった。しかしながら残る症例はコレステロール低下療法だけでは動脈硬化性疾患を制御することが困難であることを物語っている。このことから動脈硬化性疾患の本態である血管壁側のさらなる分子基盤が解明され、スタチンを超える治療法の開発が期待された。

2. 研究の目的

生活習慣病の中で脳梗塞、急性心筋梗塞など閉塞性血管障害は大きな比重を占めており、両者が解決すれば健康寿命は更に数年延びると期待されている。本研究で解析を行う Hic-5 (H2O₂-inducible clone 5) 遺伝子は血管平滑筋層に高発現する細胞接着斑アダプター分子であり、近年、動脈硬化病変形成過程および動脈瘤発症への深い関与が示された。そこで本研究では Hic-5 の発現や機能抑制による病変の進行停止、退縮効果を検討する。その結果から Hic-5 が新規動脈硬化性疾患治療ターゲットとなり得る分子であるか最終判断し、積極的な内科治療の開発に必須の分子基盤を確立する。さらに平行して Hic-5 阻害物質の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化性疾患モデル

これまでに ApoE^{-/-}マウスの大動脈動脈硬化面積が Hic-5 欠損 (ApoE^{-/-}/Hic-5^{-/-}) により約 60%抑制されることが明らかになっている。そこで ApoE^{-/-}マウスを用いて作製した大動脈硬化病変面積や、マウス大動脈瘤モデルや大動脈解離モデルの病変を有するマウスに、hic-5/siRNA Hic-5 を用いて、既存動脈瘤の進行停止や退縮・消失の可能性について検討を行った。

(2) Hic-5 機能阻害ペプチドの確立

Hic-5 は酵素活性を持たないアダプター分子であるが、様々な分子との結合ドメインや分子内結合ドメインの情報を利用し、Hic-5 の機能阻害ペプチドの設計を行った。効果の評価は各分子との結合を免疫沈降-ウエスタンブロットおよび Hic-5 がリン酸化反応の足場となっている分子のリン酸化程度を指標とした。

(3) Hic-5 結晶化、立体構造解析

大腸菌を用い結晶化用サンプルを大量発現させ、二段階のクロマトグラフィーにより精製し、結晶化用サンプルを得る。各種条件下で結晶化を行い、立体構造を決定する。

4. 研究成果

(1) ApoE^{-/-}マウスを用いて作製した動脈硬化病変およびマウス大動脈瘤モデルにおいて、hic-5/siRNA 投与により、病変形成抑制傾向が認められた。

(2) Hic-5 阻害ペプチドとして設計した候補配列 8 種類を用いて各種 assay にて阻害効果を検討したところ、Hic-5 欠損細胞ではリン酸化が抑制されることが報告されているシグナル伝達分子において、そのリン酸化を抑制できる Hic-5 阻害ペプチド配列が同定できた。また複数のペプチド配列を混合して用いるとさらに効率よく Hic-5 機能阻害作用がみられることが明らかとなった。

(3) Hic-5 タンパク質の高純度精製、大量調整が可能になった。様々な添加剤を用いた結晶化スクリーニングの結果、小サイズの結晶化が可能である条件が得られた。X 線回折データが得られるか検証するとともに、さらなる結晶化条件の最適化を行う。

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 12 件)

1. Kim Y, Lim S, Ha T, Song YH, Sohn YI, Park DJ, Paik SS, Kim-Kaneyama JR, Song MR, Leung A, Levine EM, Kim IB, Goo YS, Lee SH, Kang KH, Kim JW. The LIM protein complex establishes a retinal circuitry of visual adaptation by regulating Pax6 α -enhancer activity. *Elife*. 6. pii: e21303; 2017
2. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Functional heterogeneity of NADPH oxidases in atherosclerotic and aneurysmal diseases. *J Atheroscler Thromb*. 24(1): 1-13; 2017
3. Miyazaki T, Tonami K, Hata S, Aiuchi T, Ohnishi K, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Takeya M, Itabe H, Sorimachi H, Kurihara H, Miyazaki A. Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J Clin Invest*. 126(9): 3417-32; 2016
4. Shimabukuro M, Okawa C, Yamada H, Yanagi S, Uematsu E, Sugasawa N, Kurobe H, Hirata Y, Kim-kaneyama JR, Lei XF, Takao S, Tanaka Y, Fukuda D, Yagi S, Soeki T, Kitagawa T, Masuzaki

- H, Sato M, Sata M. Thpathophysiological role of oxidized cholesterols in epicardial fat accumulation and cardiac dysfunction: A study in swine fed a high caloric diet with an inhibitor of intestinal cholesterol absorption, ezetimibe. *J Nutr Biochem.* 35:66-73; 2016
5. Petropoulos C, Oddou C, Emadali A, Hiriart-Bryant E, Boyault C, Faurobert E, Vande Pol S, Kim-Kaneyama JR, Kraut A, Coute Y, Block M, Albiges-Rizo C, Destaing O. Roles of paxillin family members in adhesion and ECM degradation coupling at invadosomes. *J Cell Biol.* 213(5): 585-99; 2016
 6. Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama JR, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv.* 2(3):e1501332; 2016
 7. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama JR, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, Yano F, Chung U, Tanaka S, Saito T. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage.* 24(4):688-97; 2016
 8. Lei XF, Fu W, Kim-Kaneyama JR*, Omoto T, Miyazaki T, Li B, Miyazaki A. Hic-5 deficiency attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through upregulation of Smad7 in mice. *J Hepatol.* 64(1):110-7; 2016
 9. Jamba A, Kondo S, Urushihara M, Nagai T, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A, Kagami S. Hydrogen peroxide-inducible clone-5 regulates mesangial cell proliferation in proliferative glomerulonephritis in mice. *PLoS One.* 10(4):e0122773; 2015
 10. Miyazaki T, Taketomi Y, Saito Y, Hosono T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Takahashi H, Murakami M, Miyazaki A. Calpastatin Counteracts Pathological Angiogenesis by Inhibiting Suppressor of Cytokine Signaling 3 Degradation in Vascular Endothelial Cells. *Circ Res.* 116(7):1170-81; 2015
 11. Arita S, Kim-Kaneyama JR*, Lei XF, Fu WG, Ohnishi K, Takeya M, Miyauchi A, Honda H, Itabe H, Miyazaki T, Miyazaki A. Role of Hic-5 in the formation of microvilli-like structures and the monocyte-endothelial interaction that accelerates atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 105(3):361-71; 2015
 12. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Nakamachi T, Oguchi T, Kim-Kaneyama JR, Taniyama M, Tsunawaki S, Shioda S, Miyazaki A. NADPH oxidase deficiency exacerbates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(11):2413-20; 2014
- *corresponding
- [学会発表] (計 10 件)
1. Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Roles of hydrogen peroxide-inducible clone 5 in pathogenesis of thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. 19th International Vascular Biology Meeting 2016 年 10 月 30 日～11 月 3 日 (Boston, USA)
 2. Shigeko Okubo-Arita, Joo-ri Kim-Kaneyama, Xiao-Feng Lei, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Role of Hic-5 in the formation of microvilli-like structures and the monocyte-endothelial interaction that accelerates atherosclerosis 第 48 回日本動脈硬化学会学術集会 2016 年 7 月 14 日～15 日 (東京)
 3. 宮崎拓郎、雷小峰、金山朱里、宮崎 章. カルパイン-6 は mRNA の成熟不全を介してマクロファージ LDL 取り込みを促進する。第 58 回日本脂質生化学会 2016 年 6 月 9 日～10 日 (秋田)

4. 雷小峰、金山朱里、宮崎章. 肝線維化における TGF-beta 関連遺伝子 Hic-5 の機能解析 第 52 回日本肝臓学会総会 2016 年 5 月 19 日～20 日 (千葉)
5. システムによる JAK/STAT 経路依存的な病的血管新生の制御第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日～4 日 (神戸)
6. Xiao-Feng Lei, Wenguang Fu, Kim-Kaneyama JR, Akira Miyazaki. Hic-5 deficiency attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through upregulation of Smad7 in mice. 18th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CELLS OF THE HEPATIC SINUSOID 2015 年 11 月 11 日～13 日 (Asilomar, USA)
7. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Nakamachi T, Oguchi T, Kim-Kaneyama JR, Taniyama M, Tsunawaki S, Shioda S, Miyazaki A. NADPH Oxidase Deficiency Exacerbates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic aneurysms in Mice 第 47 回日本動脈硬化学会学術集会 2015 年 7 月 9 日～10 日 (仙台)
8. 雷小峰、付文広、金山朱里、大久保茂子、宮崎拓郎、宮崎章. 肝線維化における TGF-beta 誘導分子 Hic-5 の機能解析 第 47 回日本結合組織学会学術大会 2015 年 5 月 15 日～16 日 (東京)
9. 宮崎拓郎、雷小峰、金山朱里、宮崎章. カルパインシステムによる JAK/STAT 経路依存的な病的血管新生の制御 第 47 回日本動脈硬化学会学術集会 2015 年 7 月 9 日～10
10. Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Shigecko Arita, Stefan Offermanns, Hiroyuki Itabe, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Identification of Hic-5 as a novel scaffold for the MKK4/p54 JNK pathway in the development of abdominal aortic aneurysms. The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 年 4 月 16 日～17 日. (京都)

[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

金山 朱里 (Shuri Kaneyama)

昭和大学・医学部・生化学講座・准教授

研究者番号：10338535