

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 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：26461368

研究課題名(和文) 組織特異的カルパインによるマクロファージ泡沫化ならびに動脈硬化の制御

研究課題名(英文) Regulation of macrophage foam cell formation and atherosclerosis by tissue-specific calpains

研究代表者

宮崎 章 (MIYAZAKI, AKIRA)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70253721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアーゼ活性をもたないカルパインファミリーの一員であるカルパイン6は、炎症性マクロファージに高発現し、エクソジャンクション複合体を核内に誘導する因子であるCWC22と細胞質で結合してその核内移行を抑制した。これにより、Rac1をはじめとする種々の遺伝子のスプライシングを阻害し、マクロファージによるLDLの飲作用(ピノサイトーシス)ならびに動脈硬化モデルマウスの病変形成を促進した。

研究成果の概要(英文)：Calpain-6, a member of calpain superfamily that has no proteolytic activity, was shown to be highly expressed in inflammatory macrophages and interact in the cytoplasm with CWC22, a factor that promotes nuclear translocation of exon-junction complexes, thereby interfering with nuclear translocation of CWC22. Association of CPNA6 with CWC22 led to suppression of mRNA splicing of various genes including Rac1 and acceleration of LDL pinocytosis by macrophages and subsequent development of atherosclerosis in mice.

研究分野：生化学

キーワード：カルパイン ピノサイトーシス マクロファージ 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化病変はマクロファージ由来泡沫細胞の集積をその病理学的特徴とする。マクロファージ泡沫化の分子機構は、これまでマクロファージスカベンジャー受容体を介する酸化 LDL の取り込みによって説明されてきた。しかしながら、ヒトの動脈硬化病変で検出される LDL はスカベンジャー受容体に認識されるほどには酸化されていないこと、またスカベンジャー受容体を欠損した動脈硬化モデルマウスでもマクロファージの泡沫化は実際に生じることなどから、マクロファージの LDL 取込みに関する別の分子機構が存在することが想定されてきた。このあらたな分子機構を説明するものが、マクロファージのピノサイトーシス(飲作用)であるが、その分子機構の詳細は明らかでなかった。

2. 研究の目的

カルパインは細胞内カルシウム感受性プロテアーゼであり、マクロファージの種々の細胞機能を制御する機能が知られている。一例をあげると、カルパイン 1 (μ -カルパイン) は、細胞コレステロールの排出に關与する ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の細胞内分解を促進し、細胞コレステロールの排出を抑制するはたらきがある。本研究では、プロテアーゼ活性をもたないユニークなカルパインファミリーのメンバーであるカルパイン 6 (CAPN6) に着目し、マクロファージによる LDL のピノサイトーシスならびに動脈硬化病変形成における病態生理学的役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスの骨髄由来マクロファージ (Bone marrow-derived macrophages; BMMs) を用いて、*Capn6* 遺伝子の発現を誘導するサイトカインを検討した。

- (2) 野生型マウスと *Capn6* 欠損マウスの BMMs を用いて細胞機能を比較検討した。また *Capn6* 欠損マウスと動脈硬化モデルマウスである LDL 受容体 (*Ldlr*) 欠損マウスを交配し、二重欠損マウスを作成した。*Ldlr* 欠損マウスと二重欠損マウスから得た BMMs の細胞機能を比較検討した。
- (3) J774 マクロファージの細胞内で CAPN6 と結合しているタンパク質を、免疫沈降法と液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (IP-LC-MS/MS) にて同定した。
- (4) *Ldlr* 単独欠損マウスと *Capn6* / *Ldlr* 二重欠損マウスに高脂肪食を負荷して動脈硬化病変を惹起し、病変の質的、量的違いを比較検討した。
- (5) ヒト大動脈ならびに冠状動脈を用いて、ヒト動脈硬化病変における CAPN6 の発現レベルと病変の進展度との関連を検討した。
- (6) マウスの骨髄移植により、*Ldlr* 欠損マウスの動脈硬化病変形成における骨髄由来細胞の CAPN6 の役割を検討した。

4. 研究成果

- (1) 野生型 BMMs を TNF- α ならびにマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) で刺激すると、カルパインファミリーのうち、*Capn6* が突出して mRNA 発現増加をみた。TNF- α の *Capn6* 発現誘導効果は他の炎症性サイトカインよりも顕著であった。
- (2) CC-ケモカインリガンド 2 で刺激した場合の *Ldlr* 欠損 BMMs の運動速度は、*Capn6* 欠損により増加した。また *Ldlr* 欠損 BMMs の細胞運動に關与する Rac1 の活性は *Capn6* 欠損により増加した。*Ldlr* 欠損 BMMs の LDL 細胞取込みとコレステロール蓄積は *Capn6* 欠損により減少した。ピノサイトーシス活性の指標となるデキストランの取り込みも *Capn6* 欠損により減少した。一方、*Ldlr* 欠損 BMMs のピノソ

ームの細胞内移動速度は *Capn6* 欠損により低下した。

- (3) IP-LC-MS/MS 法により、J774 マクロファージの細胞内で CAPN6 と結合しているタンパク質として、エクソジャンクション複合体を核内に誘導する因子として知られる CWC22 を同定した。炎症刺激を与えた野生型 BMMs では、CWC22 は CAPN6 と細胞質で共存していたが、*Capn6* 欠損により CWC22 は核内に移行して集積した。また野生型 BMMs に比し *Capn6* 欠損 BMMs では、Rac1 のスプライシングが促進した。
- (4) *Ldlr* 欠損マウスに高脂肪食を負荷すると大動脈動脈硬化病変が形成されるが、*Capn6/Ldlr* 二重欠損マウスでは病変面積が減少した。CAPN6 は病変部のマクロファージに高発現していた。
- (5) ヒトの動脈硬化病変においても CAPN6 が高発現しており、マクロファージに局在していた。動脈硬化病変の進展に伴い、CAPN6 の発現も増加した。一方、CWC22 の核内局在は動脈硬化病変の進展に伴い減少した。
- (6) *Capn6/Ldlr* 二重欠損マウスの骨髄細胞を *Ldlr* 欠損マウスに移植すると、*Ldlr* 欠損マウスの骨髄細胞を同型マウスに移植したコントロールに比し、動脈硬化病変形成が有意に抑制された。

以上より、マクロファージに発現する CAPN6 は、細胞質で CWC22 と結合してその核内移行を抑制し、Rac1 を初めとする遺伝子のスプライシングを抑制することにより、LDL のピノサイトーシスを促進し、その結果動脈硬化病変形成を促進していることが明らかとなった。本研究結果より、CAPN6 を標的としたあらゆる動脈硬化治療戦略が想定される。

5 . 主な発表論文等 (計 11 件)
(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 11 件)

Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Mukai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol*. 査読有, 2017;176(2):413-422. doi: 10.1111/bjd.14885.

Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Functional heterogeneity of NADPH oxidases in atherosclerotic and aneurysmal diseases (review). *J Atheroscler Thromb*. 査読有, 2017;24(1):1-13. doi: 10.5551/jat.33431.

Sasai M, Iso Y, Mizukami T, Tomosugi N, Sambe T, Miyazaki A, Suzuki H. Potential contribution of the hepcidin-macrophage axis to plaque vulnerability in acute myocardial infarction in human. *Int J Cardiol*. 査読有, 2017;227:114-121. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.147.

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*. 査読有, 2016;126(9):3417-3432. doi: 10.1172/JCI85880.

Sato C, Iso Y, Mizukami T, Otabe K, Sasai M, Kurata M, Sanbe T, Sekiya I, Miyazaki A, Suzuki H. Fibroblast growth factor-23 induces cellular senescence in human mesenchymal stem cells from skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 2016;470(3):29. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.086.

Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J, Sugiyama K, Ohtaki H, Murai N, Sasaki S, Xu Z, Hashimoto H, Seki T, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in adult mouse hippocampal neurogenesis after stroke. *J Mol Neurosci*. 査読有, 2016;59(2):270-279. doi: 10.1007/s12031-016-0731-x.

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*. 査読有, 2016;64(1):110-117. doi: 10.1016/j.jhep.2015.08.026.

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* 査読有, 2015;10(4):e0122773 doi: 10.1371/journal.pone.0122773.

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*. 査読有, 2015;116(7):1170-1181. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.

Arita-Okubo 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*. 査読有, 2015;105(3):361-371. doi: 10.1093/cvr/cvv003.

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*. 査読有, 2014;34(11):2413-2420. doi: 10.1161/ATVBAHA.

〔学会発表〕(計10件)

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. Disturbance of pre-mRNA splicing by calpain-6 aggravates macrophage cholesterol deposition in atherosclerotic lesions. 第24回日本血管生物医学学会学術集会, 2016年12月9日, 長崎ブリックホール(長崎)

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 potentiates pro-atherogenic pinocytosis in macrophage. 19th International Vascular Biology Meeting, 2016年11月1日, ボストン (米国)

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 取込みを促進する. 第58回日本脂質生化学会大会, 2016年6月9日, 秋田市にぎわい交流館AU (秋田)

宮崎 拓郎, 武富 芳隆, 雷 小峰, 金山 朱里, 村上 誠, 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. 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会2015 (BMB2015), 2015年12月2日, 神戸国際会議場 (神戸)

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10日, 仙台国際センター (仙台)

宮崎 拓郎, 雷 小峰, 金山 朱里, 宮崎 章. カルパイン-6 によるマクロファージ飲作用・LDL 取込ならびに動脈硬化病変の制御. 第57回日本脂質生化学会大会, 2015年5月29日, 一橋大学一橋講堂 (東京)

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 signalling 3 degradation in

vascular endothelial cells. XVII International Symposium on Atherosclerosis, 2015年5月24日, アムステルダム (オランダ)

宮崎 拓郎, 宮崎 章. Down-regulation of calpastatin in vascular endothelial cells confers immature and inflammatory properties to pathological neovessels. 第46回日本動脈硬化学会学術集会, 2014年7月11日, 京王プラザホテル (東京)

黄川 恵慈, 宮崎 拓郎, 宮崎 章. NADPH oxidase 2 deficiency exacerbates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in mice through over-activation of inflammatory macrophages. 第46回日本動脈硬化学会学術集会, 2014年7月11日, 京王プラザホテル (東京)

Miyazaki T, Taketomi Y, Hosono T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Murakami M, Miyazaki A. VEGF-induced down-regulation of calpastatin in vascular endothelial cells confers destabilized and pro-inflammatory properties to pathological neovessels. International Vascular Biology Meeting 2014, 2014年4月24日, みやこめっせ京都 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 章 (MIYAZAKI, Akira)

昭和大学・医学部生化学講座・教授

研究者番号: 70253721

(2) 研究協力者

宮崎 拓郎 (MIYAZAKI Takuro)

昭和大学・医学部生化学講座・講師

研究者番号：80398693