

令和元年5月28日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09418

研究課題名(和文) マクロファージピノサイトーシスを標的とした新規動脈硬化治療戦略の構築

研究課題名(英文) Targeting macrophage pinocytosis in atherosclerosis

研究代表者

宮崎 拓郎 (Miyazaki, Takuro)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：80398693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カルパインは細胞内に局在するカルシウム感受性プロテアーゼで、標的となる機能分子を部位特異的に切断することで炎症応答や細胞動態を調節する。本研究では、非プロテアーゼ型カルパインである「カルパイン-6」がマクロファージにおけるピノサイトーシス(native LDLの取込み)を亢進し、動脈硬化症を増悪化させることを明らかとした。CWC22-エキソン接合部複合体がRac1などのターゲット遺伝子のmRNA成熟を介して転写作用を調節しており、カルパイン-6は炎症条件下でこの機構を制限していると考えられた。また、カルパイン-6/CWC22分子軸は肥満症にも関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の動脈硬化症の病態生理学は、マクロファージがスカベンジャー受容体依存的に酸化LDLを取込むことで泡沫化し、動脈硬化病変が形成される、いわゆる「酸化LDL仮説」に基づく。しかし、生体内に存在するLDLの多くはスカベンジャー受容体が認識するほど高度に酸化されておらず、同仮説だけでは実際に血管壁で起こるマクロファージ泡沫化を合理的に説明することはできなかった。本研究を通して、受容体非依存的なピノサイトーシス経路の一端が明らかとなり、マクロファージコレステロール代謝異常解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have investigated calpain proteolytic systems as a therapeutic target of the diseases, such as atherosclerosis, tumor angiogenesis and retinopathy. Calpains are intracellular calcium-dependent proteases, which contributes to the proteolytic processing of the target proteins thereby regulating cellular processes, such as inflammatory processes and cellular dynamics. Herein, we investigated the proatherogenic roles of calpain-6, an atypical non-proteolytic calpain member. It appears that calpain-6 disturbs mRNA splicing process of Rac1 by interfering with CWC22/exon junction complexes, resulting in the impaired pinocytotic incorporation of native LDL in macrophages. Accordingly, over expression of calpain-6 in macrophages aggravates atherosclerosis. In addition, our data showed that the contribution of calpain-6 in adipose stromal macrophages to obesity.

研究分野：血管生物学、動脈硬化

キーワード：動脈硬化症 生活習慣病 コレステロール マクロファージ タンパク質分解 カルパイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スタチンの開発により脂質異常症ならびに虚血性心疾患の一次予防は著しい進歩を遂げたが、昨今の臨床研究は脂質異常症の改善のみでは心血管イベントを完全に抑制できないことを示しており、残存リスクに対する治療法が渴望されている。我々は既存と全く異なる切り口の分子標的としてカルパインファミリーを検証してきた。カルパインは細胞内に局在する Ca^{2+} 感受性プロテアーゼで、標的となる機能分子を部位特異的に切断することで炎症応答や細胞動態を調節する。近年、我々は新たな動脈硬化促進因子としてカルパイン-2 アイソザイムの機能を同定した(Miyazaki T et al., *Circulation*, 2011)。すなわち、ヒトおよび動脈硬化モデル LDL 受容体欠損(Ldlr-/-)マウスの動脈硬化病変近傍の血管内皮細胞において、酸化 LDL の作用によりカルパイン-2 発現が誘導される。また、カルパイン-2 は VE-カドヘリン切断を通じて内皮バリアを破綻させ、動脈硬化症を増悪化させる。さらに、非プロテアーゼ型カルパインである「カルパイン-6」がマクロファージにおけるピノサイトーシス(native LDL の取込み)を亢進し、動脈硬化症を増悪化させることを見出した。予備実験の結果から、カルパイン-6 によるピノサイトーシス亢進が CWC22-エキソン接合部複合体による mRNA スプライシングの機能不全に起因する可能性が疑われた。

2. 研究の目的

上記背景から、CWC22-エキソン接合部複合体は標的遺伝子の mRNA 成熟を介してピノサイトーシスを調節しており、カルパイン-6 は炎症条件下でこの機構を制限しているとの作業仮説に至った。本研究ではカルパイン-6 および CWC22-エキソン接合部複合体のリンクに焦点を当て、マクロファージピノサイトーシス制御機構の全容解明、ならびにピノサイトーシスを標的とした新規動脈硬化治療戦略の創出を目指す。

3. 研究の方法

カルパイン-6 野生型ならびに欠損マウス(東京大学医学部代謝生理化学教室提供)を LDL 受容体欠損マウスと交配して、二重欠損マウスを作出した。同マウスの骨髄由来細胞から分化誘導させた骨髄由来マクロファージの表現型解析を行った。CWC22 に関しては、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により Cwc22 の第 2 エクソン以降を欠損させたマウスの作出し、LDL 受容体欠損マウスと交配して実験に供した。

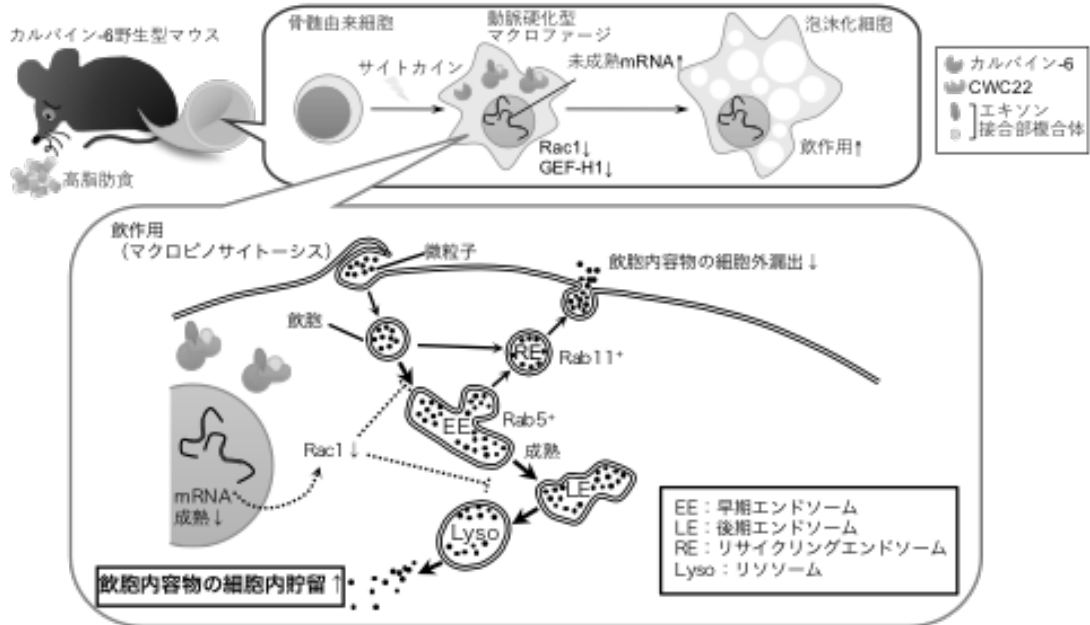
4. 研究成果

カルパイン-6 による動脈硬化症の制御

骨髄移植実験により、動脈硬化症が骨髄由来細胞のカルパイン-6 発現のみに依存することが明らかとなった。カルパイン-6 野生型マウス大腿骨より骨髄由来細胞を単離・解析したところ、カルパイン-6 の発現は認められなかったが、同細胞をマクロファージに分化誘導させたところカルパイン-6 mRNA およびタンパク質の発現誘導が認められた。カルパイン-6 野生型および欠損型骨髄由来マクロファージにおいてコレステロール代謝関連分子の発現解析を行ったところ、SR-A、CD36、ACAT-1、ABCA1、ABCG1 に両群で違いは認められなかった。また、骨髄由来マクロファージの培養液に酸化 LDL を添加し、スカベンジャー受容体依存的な取込みを検討したが、カルパイン-6 野生型および欠損型で顕著な違いは認められなかった。培養液に高濃度 native LDL を添加し、ピノサイトーシスを評価したところ、カルパイン-6 の欠損により取込みの低下が認められた。カルパイン-6 欠損型マクロファージにおいては Rac1 の発現誘導が認められ、同細胞における飲作用活性は Rac1 阻害剤 NSC23766 および Rac1 siRNA により救援されたことから、飲作用低下は Rac1 発現誘導に起因すると考えられる。蛍光性デキストランを一過的に骨髄由来マクロファージに負荷し、ラベルされた細胞内小胞(飲胞)について解析を行った。カルパイン-6 の欠損により Rac1 依存的な飲胞の細胞内移送速度の低下が認められたが、細胞内密度に変化は認められなかった。また、飲胞における早期エンドソームマーカー Rab5 局在性ならびにリソソームへの移行はカルパイン-6 の欠損により低下し、リサイクリングエンドソームマーカー Rab11 の局在性が増加した。また、蛍光性デキストランを取り込ませたマクロファージからの細胞外へのデキストラン漏出はカルパイン-6 の欠損により増加した。したがって、カルパイン-6 は Rac1 の発現低下により飲胞の細胞内移送を円滑にすることで飲胞の成熟を促進し、結果として飲胞内容物の細胞内貯留を助長すると考えられる。飲胞の成熟度が低下すると、内容物はリサイクリングエンドソームを経由して細胞外に漏出すると推測される。すなわち、カルパイン-6 の発現に伴いマクロファージは効率よく細胞外微粒子を貯め込む「貯留型」の形質にシフトすると考えられる。

動脈硬化症モデルマウスの循環血中の単球を蛍光ビーズでラベルし、3日後に動脈硬化プラークに動員された蛍光ビーズ陽性細胞を組織化学的に検出したところ、多くの陽性細胞はカルパイン-6 陰性であった。プラーク内部の泡沫化マクロファージが顕著にカルパイン-6 を発現することから、単球が動脈硬化病変に動員された後にカルパイン-6 が発現誘導され、これがマクロファージの飲作用活性獲得に寄与すると考えられる。実際カルパイン-6 の欠損により動脈硬化病変マクロファージの飲作用活性は消失した。In vitro の検討では、TNF- α 刺激により単

図1 カルパイン-6はRac1 mRNAの成熟を制限してマクロファージを動脈硬化型の形質に導く



離骨髄由来マクロファージにおけるカルパイン-6 依存的な飲作用獲得が再現されることから考えると、マクロファージは動脈硬化プラーク内部の局所環境に依存して飲作用活性を獲得すると考えられる。また、動脈硬化病変における酸化ストレス、死細胞コアの容量を検討したが、カルパイン-6 野生型と欠損マウスで明らかな違いは認められなかった。

免疫沈降-LC/MS/MS ショットガン解析により、マクロファージライセート中のカルパイン-6 結合タンパク質を網羅解析したところ、カルパイン-6 複合体にスプライシング関連因子 CWC22 が検出された。CWC22 はエクソン接合部複合体の構成分子であり、同複合体を未成熟 mRNA に動員する輸送タンパク質として機能している。したがって、同分子の核移行は結果として mRNA 成熟を促進する。カルパイン-6 を欠損したマクロファージにおいて、TNF- α による CWC22 の核移行ならびに Rac1、Arhgef2 (GEF-H1 遺伝子) の mRNA 成熟が亢進した。また、カルパイン-6 欠損により抑制されたマクロファージ飲作用が、siRNA による Cwc22 のノックダウンにより救援された。したがって、CWC22-エクソン接合部複合体はターゲット遺伝子の mRNA 成熟を介して飲作用を調節しており、カルパイン-6 は炎症条件下でこの機構を制限していると考えられる (図1)。

ヒト剖検サンプルを用いてカルパイン-6 および CWC22 の発現を免疫組織化学的に検討した。高度に進展したヒト動脈硬化病変においてはカルパイン-6 が泡沫化マクロファージに局在し、CWC22 の核移行が低下する傾向が認められた。上記結果から、カルパイン-6 の阻害ならびに CWC22 の機能の正常化により飲作用を介したマクロファージ泡沫化は抑制可能と考えられ、これは動脈硬化症に対する極めてユニークな介入方法と期待される。

CWC22 による動脈硬化症の制御

上記の検討から、カルパイン-6 は CWC22 と相互作用する可能性が示唆される。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により CWC22 欠損マウスを作出し、動脈硬化症の表現型を検討した。2度のインジェクションで変異マウスは得られなかったが、gRNA の配列を変更して再度インジェクションを行ったところ9ラインのファウンダーが得られた。同マウスはヘテロ型欠損で維持が可能であったが、ホモ型で胎生致死であった。いずれの時期に致死に至るのか胎児を摘出して検討したが、E9.5の時点で欠損マウスは得られておらず、CWC22 は極めて早期の段階で個体発生に関与しているものと考えられる。CWC22 欠損マウス(ヘテロ欠損型)と LDLR 欠損マウスを交配して得られた2重欠損マウスと LDLR 欠損マウスに高脂肪食を負荷し、大動脈における動脈硬化病変を解析した。Oil-red-O 染色により動脈硬化病変のサイズを検討したところ、CWC22 の欠損にともない動脈硬化病変の促進が認められた。カルパイン-6 欠損は動脈硬化症を改善することから、上記 CWC22 欠損マウス(2重欠損マウス)の表現型は妥当であると考えられる。一方、血漿中の脂質異常症ならびに炎症マーカーの発現に影響は認められなかった。CWC22 がヘテロ欠損型であるために表現型が弱い可能性が示唆される。現在はコンディショナルな CWC22 欠損マウス(CWC22 flox マウス)を作製中であり、LysM-cre マウス等と交配することで、マクロファージ特異的な CWC22 欠損マウスとして実験に供する予定である。

肥満症におけるカルパイン-6/CWC22 分子軸の役割

動脈硬化症の関連疾患として肥満症についても検討を行った。食餌誘発性の肥満症を惹起したところ、カルパイン-6 欠損マウスは野生型と比較して体重の増加が抑制された。次世代シー

ケンスを用いて、カルパイン-6欠損によるスプライスバリエントの発現変動について検討を行い、同分子の下流に複数種の脂質代謝関連分子のスプライスバリエントの存在を検出した。また、骨髄系細胞に特異的なスプライシング制御因子自身のバリエントも複数種検出された。パスウェイ解析の結果、脂質代謝経路の変化が検出された。CWC22ヘテロ欠損マウスでも食餌誘発性の肥満症を惹起したところ、CWC22のヘテロ欠損で体重の増加が認められた。これはカルパイン-6とは逆の表現型で、動脈硬化同様妥当であると評価された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. Obama T, Miyazaki T, Aiuchi T, Miyazaki A, Itabe H. Evaluation of protein-protein interactions using an on-membrane digestion technique. *J Vis Exp*. In press.
2. Shibata K, Hashimoto T, Miyazaki T, Miyazaki A, Nobe K. Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke: Past and Future. *Curr Pharm Des*. In press. DOI: 10.2174/1381612825666190319115018.
3. Han G, Yang H, Wang Y, Haraguchi S, Miyazaki T, Bungo T, Tashiro K, Furuse M, Chowdhury VS. L-Leucine increases the daily body temperature and affords thermotolerance in broiler chicks. *Asian-Australas J Anim Sci*. In press. DOI: 10.5713/ajas.18.0677.
4. Miyazaki T, Miyazaki A. Impact of dysfunctional protein catabolism on macrophage cholesterol handling. *Curr Med Chem*. 2019; 26: 1631-1643. DOI: 10.2174/0929867325666180326165234.
5. Miyazaki T, Haraguchi S, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Endothelial calpain systems orchestrate myofibroblast differentiation during wound healing. *FASEB J*. 2019;33:2037-2046. DOI: 10.1096/fj.201800588RR.
6. Miyazaki T, Miyazaki A. Dysregulation of calpain proteolytic systems underlies degenerative vascular disorders. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25:1-15. DOI: 10.5551/jat.RV17008.
7. Nozaki M, Haraguchi S, Miyazaki T, Shigeta D, Kano N, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Minakata H, Miyazaki A, Tsutsui K. Expression of steroidogenic enzymes and metabolism of steroids in COS-7 cells known as non-steroidogenic cells. *Sci Rep*. 2018;8:2167. DOI: 10.1038/s41598-018-20226-2.
8. Omoto T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Orimo A, Ohnishi K, Yoshihara K, Miyauchi A, Li S, Gao L, Umemoto T, Tanaka J, Nakahara K, Takeya M, Ishida F, Kudo SE, Haraguchi S, Miyazaki T, Miyazaki A. The impact of stromal Hic-5 on the tumorigenesis of colorectal cancer through lysyl oxidase induction and stromal remodeling. *Oncogene*. 2018;37:1205-1219. DOI: 10.1038/s41388-017-0033-y.
9. Miyazaki T, Miyazaki A. Defective Protein Catabolism in Atherosclerotic Vascular Inflammation. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:79. DOI: 10.3389/fcvm.2017.00079.
10. Miyazaki T, Miyazaki A. Emerging roles of calpain proteolytic systems in macrophage cholesterol handling. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:3011-3021. DOI: 10.1007/s00018-017-2528-7.
11. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Functional heterogeneity of NADPH oxidases in atherosclerotic and aneurysmal diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24:1-13. DOI: 10.5551/jat.33431.
12. 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*. 2016;126:3417-3432. DOI: 10.1172/JCI85880.
13. Saito M, Suzuki Y, Yano S, Miyazaki T, Sato Y. Proteolytic inactivation of anti-angiogenic vasohibin-1 by cancer cells. *J Biochem*. 2016;160:227-232. DOI: 10.1172/JCI85880.
14. 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*. 2016; 64:110-7. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.08.026.
15. 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*. 2015;116:1170-1181. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305363.
16. 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.* 2015; 105: 361-371. DOI: 10.1093/cvr/cvv003.

[学会発表] (計 19 件)

1. 宮崎拓郎、タンパク質恒常性低下を起点とした動脈硬化発症機構. 第26回日本血管生物医学会学術集会 シンポジウム2 「血管炎症機転と動脈硬化症(日本動脈硬化学会共催シンポジウム)」、2018 [招待講演]
2. 宮崎拓郎、マクロファージ動脈硬化原性を制御する細胞内プロテアーゼシステム. 第33回日本糖尿病合併症学会 シンポジウム2、2018 [招待講演]
3. 宮崎拓郎、宮崎章、動脈硬化病変マクロファージに潜むタンパク質分解機構の制御不全. 第50回日本動脈硬化学会学術集会 Cutting-Edge Symposium 9 マクロファージ研究の最前線、2018 [招待講演]
4. 宮崎拓郎、宮崎章、カルパインプロテアーゼファミリーによる血管系疾患の制御. 第50回日本動脈硬化学会学術集会 合同シンポジウム2 日本血管生物医学会合同シンポジウム、2018 [招待講演]
5. Miyazaki T, Haraguchi S, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A, Endothelial calpain systems orchestrate myofibroblast differentiation during wound healing. The 20th International Vascular Biology Meeting、2018
6. Miyazaki T, Regulation of atherosclerosis by calpain proteolytic systems. Spring conference of the Korean society of lipid and atherosclerosis 2018. Symposium I 「Vascular inflammation and remodeling」, 2018 [招待講演]
7. 宮崎拓郎、血管系疾患に潜む制御性プロテアーゼの機能不全. 第67回 NCVC 研究者交流会、2017 [招待講演]
8. 宮崎拓郎、礪波一夫、秦勝志、相内敏弘、大西紘二、雷小峰、金山朱里、竹屋元裕、板部洋之、反町洋之、栗原裕基、宮崎章、カルパインファミリーは動脈硬化病変を制御する. ConBio2017、2017
9. 宮崎拓郎、雷小峰、金山朱里、宮崎章、動脈硬化病変マクロファージの飲作用を介した LDL コレステロール取込み機構 第59回日本脂質生化学会大会、2017
10. 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会学術集会 Excellent abstract session, 2016
11. 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 macrophages. The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016
12. Miyazaki T, Calpain proteolytic systems in atherosclerotic and aneurysmal diseases. 第48回日本動脈硬化学会学術集会. Symposium 13 「Frontiers in biology of atherosclerosis」, 2016 [招待講演]
13. 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
14. 宮崎拓郎、カルパインによるタンパク質プロセッシングと動脈硬化症. 第45回日本心脈管作動物質学会年会. シンポジウム1 「動脈硬化研究の最前線」、2016 [招待講演]

15. 宮崎拓郎、カルパインシステムによる血管系疾患の制御. 第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. シンポジウム「拡大するカルパインの生理・病態生理機能」、2015[招待講演]
16. 宮崎拓郎、カルパインシステムによる血管系疾患の制御. The 16th Atherosclerosis and Biolipid Conference、2015 [招待講演]
17. 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 優秀ポスター演題オーラル発表、2015
18. 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 若手研究者奨励賞結果発表会、2015
19. 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

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

宮崎 拓郎(Takuro Miyazaki, PhD:

http://www10.showa-u.ac.jp/~biochem/Takuro_Miyazaki/Takuro_Miyazaki.html

Research gate (Takuro Miyazaki): https://www.researchgate.net/profile/Takuro_Miyazaki2

20. Researchmap Takuro Miyazaki: <https://researchmap.jp/miyazakitakuro/?lang=japanese>

Calpain-6 mediates atherogenic macrophage function: <https://www.youtube.com/watch?v=VBdSyEDR5DU>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。