

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15260

研究課題名（和文）低分子量G蛋白質Rap1による血管透過性制御とその破綻によるARDSの病態解明

研究課題名（英文）Control of vascular permeability by Rap1 and elucidation of the pathology of ARDS due to failure of this control mechanism.

研究代表者

山本 清威（Yamamoto, Kiyotake）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20866553

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：血管内皮特異的Rap1欠損（Rap1^{iEC-KO}）マウスの肺動脈を用いてホールマウント蛍光免疫染色を行った結果、Rap1がKOされたことにより内皮細胞における細胞間接着部に沿ったactin繊維の消失と、stress fiberの形成によるVE-cadherin接着の崩壊が認められた。加えて、LPS誘発性急性肺障害モデルマウスに対して007を投与したところ、LPS投与により亢進した肺における血管透過性が抑制された。以上により、Rap1による血管透過性制御機構はin vivoでも機能しており、Rap1シグナルを活性化することで炎症などによる血管透過性の過剰亢進を抑制できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Rap1による血管透過性制御機構はin vivoでも機能しており、その制御機構の破綻は血管透過性の過剰亢進により致死性の肺水腫を引き起こすが、Rap1シグナルを活性化することで炎症などによる血管透過性の過剰亢進を抑制できることが明らかとなった。今後、Rap1による血管透過性制御機構をさらに詳細に解析することで、血管透過性異常が関与する疾病の新規治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Whole-mount en-face immunofluorescence staining of pulmonary arteries from vascular endothelial-specific Rap1-deficient mice showed that Rap1 KO resulted in loss of actin fibers along intercellular adhesions in endothelial cells and disruption of VE-cadherin adhesions due to stress fiber formation.

In addition, administration of 007 to a mouse model of LPS-induced acute lung injury suppressed vascular permeability in the lungs, which was enhanced by LPS administration.

These results indicate that the vascular permeability regulation mechanism by Rap1 is functional in vivo and that activation of Rap1 signaling can suppress excessive vascular permeability caused by inflammation.

研究分野：病態解析学

キーワード：血管透過性 Rap1 VE-cadherin

1. 研究開始当初の背景

血管の内腔面では、血管内皮細胞が互いに接着することでシート構造を形成し、循環血液と組織間の物質移動“血管透過性”を制御している。正常組織の血管では、内皮特異的な接着分子 VE-cadherin が、内皮細胞間接着を形成し、血管透過性を低い状態に維持している。しかし、感染や創傷などにより炎症が誘導されると、内皮細胞は、生体防御反応として VE-cadherin 接着を弱め、血管透過性を亢進させる。このように、内皮細胞は VE-cadherin 接着を介して血管透過性をダイナミックかつ厳密に制御しているが、その制御機構の破綻は、血管透過性の過剰な亢進をもたらし、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) など多岐に渡る疾患の病態を悪化させる。

ARDS は、炎症性メディエーターの産生を伴う血管透過性亢進を主体とした非心原性肺水腫であり、重症肺炎や感染症で併発する敗血症などが原因となり発症する。現在、大きな社会問題となっている COVID-19 で重症化する患者の多くも ARDS を発症し死に至る。ARDS の薬物療法としてステロイドや抗感染薬等が使用されているが、生命予後を直接改善できる治療薬は今のところ存在しておらず、ARDS 発症後の死亡率は 37~58%と極めて高い。この理由として、これら既存薬では ARDS を引き起こす血管透過性の過剰亢進を直接的に抑制できないことが挙げられる。従って、血管透過性の亢進を効果的に抑える薬剤を創製できれば、ARDS の革新的な治療薬の開発につながる。その為には、血管透過性を抑制するための標的分子の同定が必要であり、その同定には正常組織の血管透過性を低い状態に維持するシグナル伝達系とその破綻により ARDS が発症する機序の解明が重要である。

2. 研究の目的

申請者が血管透過性制御における主要なシグナル分子であること見出してきた低分子量 G タンパク質 Rap1 に焦点を当て、正常組織において Rap1 が VE-cadherin 接着を増強し、血管透過性を低い状態に維持する分子機構を解明する。また、この Rap1 を基軸とした血管透過性制御機構が、ARDS 発症時において如何に変容し、血管透過性の過剰な亢進をもたらすのか明らかにする。以上の研究を通して、ARDS の革新的治療薬開発に向けた分子基盤の構築を目指す。

Rap1 は、Ras ファミリーに属する低分子量 G タンパク質である。申請者の所属研究室は、これまで *in vitro* 解析により、Rap1 は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の Rho と Cdc42 のバランス調節により、アクチン細胞骨格を再編成し VE-cadherin 接着を増強することを示してきた (*J Cell Biol*, 2013 他)。また、*rap1* 欠損ゼブラフィッシュを樹立・解析し、同個体が頭部の出血を呈することを見出した (*Dev Cell*, 2019)。さらに、申請者は、生体内の血管透過性制御における Rap1 の役割を解明するため、内皮特異的に Rap1A/Rap1B を欠損した *Rap1^{IEC-KO}* マウスを樹立し、このマウスは VE-cadherin 接着の崩壊により ARDS 様の重度の肺水腫を呈し、死亡することを発見した。この知見は、Rap1 は血管透過性制御の鍵分子であり、その制御機構の破綻が ARDS 発症に関与する可能性を強く示唆している。従って、上記研究目標を達成するため、これら申請者の独自の研究成果に基づき本研究構想を立案した。

重度の炎症性疾患である ARDS の病態を理解するため、これまで炎症性メディエーターが血管透過性を亢進する機序が中心に研究されてきた。しかし、血管透過性制御は、透過性抑制シグナルと亢進シグナルの相互作用に依存しており、従来の研究では本疾患の病態を十分に理解することが困難であった。本研究は、Rap1 を基軸とした血管透過性抑制シグナルと亢進シグナルの相互作用に着目して ARDS の病態解明を目指しており、新規性・独創性が高い。また、本研究の遂行により、血管透過性を標的とした全く新しいタイプの ARDS 治療薬開発に繋げることができる。

本研究では、Rap1 シグナルが正常組織の血管透過性を低い状態に保つ機構、特に Rap1 の上流シグナルとしての血流の役割とその分子メカニズムを明らかにする。さらに、Rap1 を基軸とした血管透過性抑制シグナルと炎症性メディエーターによる血管透過性亢進シグナルの相互作用に着目し、ARDS において血管透過性が過剰に亢進し、その病態が悪化する分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、*in vivo* での血管透過性制御における Rap1 の役割を解明するため、血管内皮特異的 Rap1 欠損 (*Rap1^{IEC-KO}*) マウスの樹立・解析を行った。本マウスの肺動脈ホールマウント蛍光免疫染色実験を行うことにより、内皮細胞における VE-cadherin 接着と actin 細胞骨格の解析を行った。また、LPS 誘発性急性肺障害モデルマウスに対し、Rap1 のグアニンヌクレオチド交換因子である Epac を活性化する 007 を投与し、炎症による血管透過性の亢進を Rap1 シグナルの活性化により抑制できるかの解析を行った。

4. 研究成果

(1) Rap1 が血管透過性を低い状態に維持する分子機構の解明

Tamoxifen 誘導型 Cre/loxP システムを使用し、哺乳動物が持つ 2 つの Rap1 遺伝子 A と B を血

管内皮細胞特異的に破壊した Rap1AB ダブルノックアウトである $Rap1^{iEC-KO}$ マウスを樹立し、生体内における Rap1 の機能解析を行った結果、 $Rap1^{iEC-KO}$ 群のマウスは Tamoxifen 投与後 40 日目から 82 日目までに全て死亡した。これまでの *in vitro* の研究結果を踏まえると、マウスの死亡は Rap1 を KO したことによる血管透過性の亢進が影響していると考えられた。そこで、 $Rap1^{iEC-KO}$ マウスの各組織における血管透過性を解析するためにエバンスブルーを投与したところ、特に肺で顕著な色素漏出が認められ、 $Rap1^{iEC-KO}$ マウスは致死的な肺水腫を発症するということが明らかにした (図 1)。

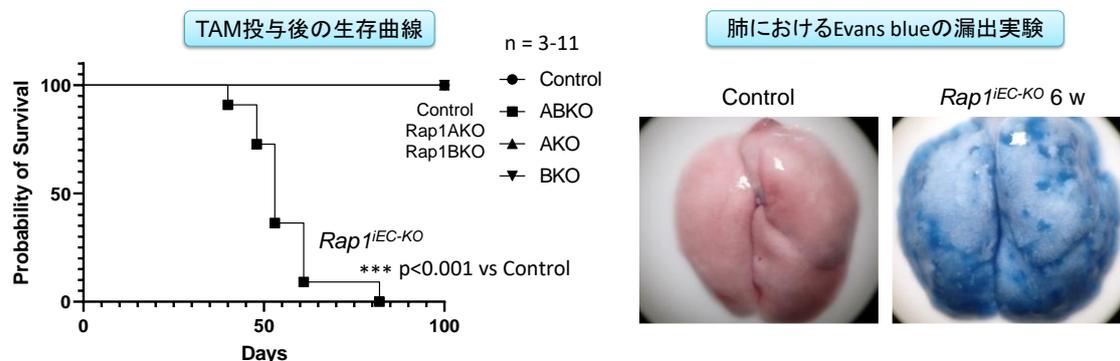


図 1 : $Rap1^{iEC-KO}$ 群の生存率と肺における血管透過性の変化

加えて、肺泡毛細血管の VE-cadherin を 3D 蛍光免疫染色法で解析したところ、control 群では直線性を有していた VE-cadherin が、 $Rap1^{iEC-KO}$ 群では乱雑な形状に変化していた。以上の結果から、 $Rap1^{iEC-KO}$ マウスは肺泡毛細血管における VE-cadherin 接着の障害により肺水腫を引き起こしていることが示唆された。これまでの結果を踏まえ、 $Rap1^{iEC-KO}$ による VE-cadherin 接着の変化をさらに詳細に解析するため、ホールマウント蛍光免疫染色法により肺動脈血管内皮細胞の Actin と VE-cadherin を Tamoxifen 投与後 2, 4, 6 週目と経時的に染色・定量を行った。Control マウスの肺動脈では、内皮細胞間の接着部位に CAB が形成されており、VE-cadherin は CAB に沿って直線状に局在することでタイトな内皮細胞間接着を形成していた。一方で、 $Rap1^{iEC-KO}$ マウスの肺動脈では、細胞間接着部位に CAB は認められず、stress fiber の形成も有意に増加しており、VE-cadherin 接着の崩壊も起こっていた。Rap1 が KO されたことで Rho が活性化して stress fiber が形成され、Cdc42 が活性化しないことで CAB が形成されない状態にあると考えられた (図 2)。

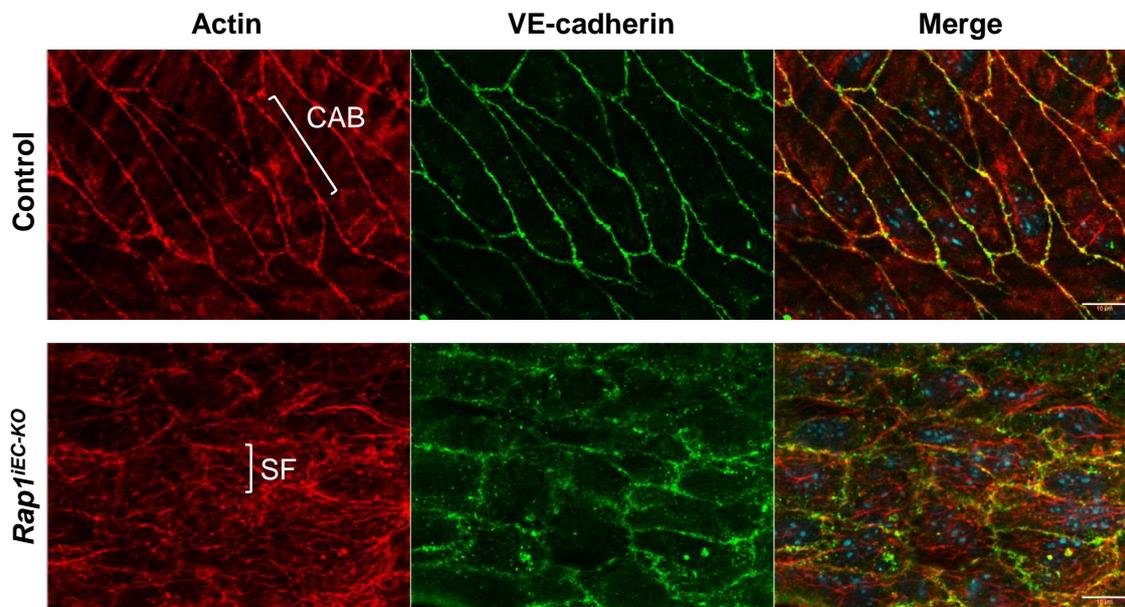


図 2 : $Rap1^{iEC-KO}$ による肺動脈内皮細胞の形態変化

(2) Rap1 を基軸とした血管透過性制御機構の破綻により ARDS が発症する機序の解明

これまでの結果から、Rap1 は、*in vivo* においても Rho を抑制することで stress fiber の形成を抑制し、VE-cadherin 接着を増強すると考えられる。そこで、 $Rap1^{iEC-KO}$ による stress fiber 形成や VE-cadherin 接着の崩壊が Rho の抑制によりレスキューできるかを明らかにするため、 $Rap1^{iEC-KO}$ マウスから肺動脈を摘出し、Rho の下流シグナル分子である Rho-associated protein kinase、ROCK の阻害剤である Y-27632 の曝露を行った。その結果、stress fiber の形成が減少

するとともに、細胞間接着部位にアクチン繊維が形成され、VE-cadherin 接着が増強することを明らかにした。この結果から、Rap1 は Rho を抑制することで、VE-cadherin 接着を増強し、肺組織の血管透過性を低い状態に維持していることが示唆された。しかしながら、Rho の抑制のみでは CAB が完全には回復しなかった。これは CAB の形成に Cdc42 が関与していることが示唆されており、当初の仮説の通り、血管透過性の制御には Rho と Cdc42 のバランスが重要であると考えられる。

これまでの結果から、Rap1 シグナルを亢進により Rho の抑制と Cdc42 を活性化することができれば、血管透過性を低く保つことが出来ると考えられる。そこで、炎症による血管透過性の亢進を Rap1 シグナルの活性化により抑制できるかを明らかにするため、LPS 誘発性急性肺障害モデルマウスに対し、Rap1 シグナルの上流にある Epac を活性化する 007 の投与を行い、血管透過性を解析するためにエバンスブルーを投与した。その結果、LPS 投与により血管透過性が亢進するが、この亢進を 007 投与により有意に抑制することができた。この結果から、Epac-Rap1 シグナルを亢進することで肺組織の血管透過性を低い状態に維持できることが示唆された (図 3)。

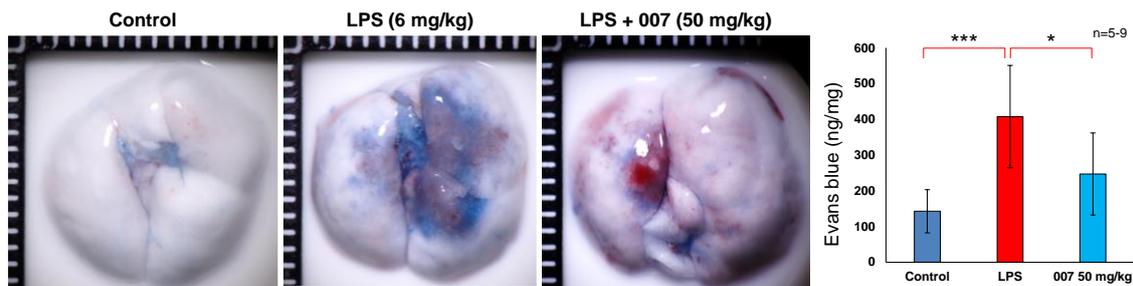


図 3 : LPS 誘発性急性肺障害モデルマウスに対する 007 投与による血管透過性の変化

これまでの結果から、正常組織において Rap1 は Rho を抑制することで stress fiber の形成を抑制し、Cdc42 を活性化することで CAB の形成を促進し、VE-cadherin 接着を増強することで血管透過性を制御していると考えられる。この制御機構は生体内、特に肺において機能しており、この Rap1 による制御機構が破綻すると致死的な肺水腫を引き起こすことを明らかにした。逆に、Rap1 シグナルを活性化することができれば、炎症などによる肺における血管透過性の過剰な亢進を抑制できると明らかにした。今後、Rap1 を基軸とした血管透過性制御機構をさらに詳細に明らかにすることができれば、ARDS を始めとする血管透過性が関与している疾病の新規治療法開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Kiyotake, Watanabe Takano Haruko, Oguri Nakamura Eri, Matsuno Hitomi, Horikami Daiki, Ishii Tomohiro, Ohashi Ryuji, Kubota Yoshiaki, Nishiyama Koichi, Murata Takahisa, Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 37
2. 論文標題 Rap1 small GTPase is essential for maintaining pulmonary endothelial barrier function in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202300830RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 清威, 渡邊-高野晴子, 高木夕希, 堀上大貴, 安藤康史, 石井智裕, 久保田義顕, 村田幸久, 望月直樹, 福原茂朋
2. 発表標題 Rap1低分子量Gタンパク質は肺の血管バリア機能維持に必須である
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 清威, 渡邊-高野 晴子, 堀上 大貴, 高木 夕希, 石井 智裕, 大橋 隆治, 久保田 義顕, 村田 幸久, 望月 直樹, 福原 茂朋
2. 発表標題 Rap1低分子量Gタンパク質による血管透過性制御とそれを標的とする血管透過性亢進がかかわる疾患の治療戦略
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 清威, 渡邊-高野 晴子, 堀上 大貴, 石井 智裕, 久保田 義顕, 村田 幸久, 大橋 隆治, 望月 直樹, 福原 茂朋
2. 発表標題 Rap1低分子量Gタンパク質は肺における血管透過性制御に必須である
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 清威, 渡邊-高野 晴子, 堀上 大貴, 石井 智裕, 久保田 義顕, 村田 幸久, 大橋 隆治, 望月 直樹, 福原 茂朋
2. 発表標題 Rap1低分子量Gタンパク質はVE-cadherin接着を増強することで肺の血管バリア機能を維持している
3. 学会等名 第8回 血管生物医学会 若手研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本 清威, 渡邊-高野 晴子, 小栗-中村 エリ, 松野 仁美, 堀上 大貴, 石井 智裕, 大橋 隆治, 久保田 義顕, 西山 功一, 村田 幸久, 望月 直樹, 福原 茂朋
2. 発表標題 Rap1シグナルは肺内皮バリア機能の維持に必須である
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------