

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790784

研究課題名(和文)カルパイン・カルパスタチンシステムの制御による新たな腹部大動脈瘤治療戦略の構築

研究課題名(英文)Regulation of abdominal aortic aneurysms by calpain/calpastatin systems

## 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：「カルパイン」は多機能な細胞内プロテアーゼで、循環器領域を含む多くの疾患に対する関与が指摘されている。本研究では、腹部大動脈瘤の血管内皮細胞においてカルパインシステムの過剰亢進が起こることを明らかとした。内皮細胞のみでカルパインシステムの機能不全が発現するマウスを作出したところ、血管外膜の未成熟な新生血管が正常化し、病態の改善が認められた。新生血管の正常化は、マウス癌細胞移植モデルならびに網膜症モデルにおいても認められ、これがJAK/STAT炎症性シグナルの過剰亢進に起因することを見出した。本結果は、カルパインシステムが病的血管新生および関連疾患の分子標的として応用可能であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Calpain, an intracellular multi-functional protease, reportedly participates in the various disorders including cardiovascular diseases. We herein revealed that the calpain systems are over-activated in vascular endothelial cells in abdominal aortic aneurysm in mice. The mice lacking calpain activity specifically in vascular endothelial cells exhibited normalization of adventitial immature neovessels, thereby suppressing progression of aneurysms. Similar normalization of neovessels was detectable in cancer transplantation models and retinopathy models in mice, and was due to the over-activation of JAK/STAT inflammatory signals. These data suggests that calpain inhibition is promising approach for targeting pathological angiogenesis and related diseases.

研究分野：血管生物学

キーワード：腹部大動脈瘤 血管新生 血管内皮細胞 癌 網膜症 カルパイン

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 腹部大動脈瘤

動脈硬化症の進展はしばしば腹部大動脈瘤 (AAA) を引き起こすことが知られているが、一旦瘤が破裂すると多くの場合致命的となる。瘤の形成時には降圧薬投与またはステントなどの外科的療法が唯一の有効な治療法であり、瘤の成長や破裂を抑制できる薬物が渴望されている。発症要因として、AAA 外膜新生血管からのマクロファージ等免疫細胞の浸潤、サイトカイン・マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の増加、血管平滑筋細胞のアポトーシスなどが挙げられ、最終的に弾性板構造の崩壊により脆弱になった部位が拡張・破裂する (Shimizu *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006)。

### (2) カルパインシステム

「カルパイン」は生体内に偏在する細胞内プロテアーゼで、哺乳動物においては 15 の触媒サブユニットのホモログが報告されている。特に従来型の  $\mu$ -または  $m$ -カルパインの 2 サブタイプは、循環器領域を含む多くの疾患に対する関与が指摘されている。細胞内では内因性阻害因子カルパスタチンと共に「カルパインシステム」を形成しており、シグナル伝達分子などの基質を厳密に認識してプロセッシングし、細胞接着や炎症応答を制御する。近年、カルパイン阻害剤がマウス AAA モデルに著効を示すことが報告された (Subramanian *et al.*, *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011)。これはカルパイン阻害剤が AAA 治療に応用できる可能性を示しているが、その分子機構についてはほとんど明らかになっていない。

### (3) 科研費採択前の研究経過

我々は mM オーダーのカルシウムにより起動する  $m$ -カルパインサブタイプが動脈硬化症を制御することを報告してきた (Miyazaki *et al.*, *Circulation*, 2011)。

ヒト及び動脈硬化モデル LDL 受容体欠損マウスの動脈硬化病変近傍の血管内皮細胞において、 $m$ -カルパインの発現がアイソザイム特異的に誘導される。

カルパイン阻害剤は動脈硬化病変の進展を抑制する。

$m$ -カルパインは VE-カドヘリンの切断を通じて内皮バリアを破綻させ、動脈硬化性血管炎を増悪化させる。

## 2. 研究の目的

AAA が代表的な動脈硬化性疾患であることを勘案すると、カルパインシステムが AAA に関与する可能性は極めて高い。そこで本研究では、我々が独自に見出している知見を発展させ、カルパスタチン・カルパインシステムが如何に AAA の発症進展に関わるかの全貌を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管内皮特異的カルパスタチン Tg マウス

Cre/LoxP システムならびに Tie-2 プロモーターを用いて、血管内皮細胞特異的なカルパスタチン Tg マウスを作出した。

### (2) マウス AAA モデル

高脂肪食を負荷した LDL 受容体欠損マウスにアンジオテンシン を持続投与することで AAA を惹起する。

### (3) マウス担癌モデル

マウス皮下にルイス肺癌細胞を移植し、腫瘍内に形成される腫瘍血管を解析した。

### (4) マウス網膜症モデル

生後 7 日目の幼若マウスに 5 日間高酸素 (75%) を負荷し、その後通常酸素状態で 5 日間飼育し、網膜に形成される病的新生血管を解析した。

### (5) 細胞培養

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞およびヒト皮膚微小血管内皮細胞を用いた。管腔形成能を評価する場合、重合させたマトリゲル上に細胞を播種し、16 時間後の管腔総延長ならびに単位血管長あたりの分岐数を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) カルパインシステムは AAA 病変において新生血管の未成熟化を引き起こす

高脂肪食を負荷した LDL 受容体欠損マウスにおいて、アンジオテンシンの持続投与に伴い腹部大動脈において瘤の形成が認められたが、同血管では瘤の形成に伴いカルパスタチンの発現低下が認められた。血管内皮での発現低下が顕著であったことから、血管内皮特異的カルパスタチン Tg マウスを作出し、AAA を誘発したところ、瘤の破裂に伴う個体死の割合が低下した。また、カルパスタチン導入により、瘤の外膜新生血管において壁細胞の被覆ならびに IV 型コラーゲンの蓄積が亢進し、新生血管の成熟が認められた。新生血管の成熟が、マクロファージ等免疫細胞の動員を低下させ、瘤の破裂を低下させたと考えられる。

### (2) カルパインの活性化は病的血管新生を促進する

マウス AAA モデルでは新生血管の密度が低く、病的血管新生について精度の高い検討を行うのは難しい。そこで、担癌モデル (ルイス肺癌細胞移植実験) ならびに酸素誘発性網膜症モデルを用いた病的血管新生の検討を行った。両モデルにおいて、血管内皮特異的なカルパスタチンの導入により病的血管新生が抑制され、担癌モデルの場合は腫瘍の縮

小、網膜症モデルの場合は房状血管の抑制が認められた。また、カルパスタチン導入により、新生血管における壁細胞の被覆ならびにIV型コラーゲンの蓄積が亢進し、血管の成熟化が認められた。また、カルパスタチン導入により血管内皮における血管内皮成長因子-C (VEGF-C) の発現低下が認められ、同細胞の JAK/ STAT3 経路の下方制御ならびに同経路の内因性阻害因子 Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) の発現増加が認められた。また、野生型マウスにおける酸素誘発性網膜症は、VEGF-C 中和抗体の硝子体内投与により顕著に抑制されることから、病的血管新生は VEGF-C を介することが示唆される。

(3) カルパインは SOCS3 の分解を引き起こし JAK/STAT 経路の活性化を引き起こす

試験管内で組換え SOCS3 タンパク質と  $\mu$ -カルパインを反応させたところ、 $\mu$ -カルパインは SOCS3 を切断・分解することが明らかとなった。In silico 解析を行い、切断部位を推定したところ、分子内のプロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン残基を豊富に含む配列 (PEST 配列) 付近に切断部位があると推測された。同部位をアラニン置換した SOCS3 変異体を作製したところ、一部の变異体で  $\mu$ -カルパインによる SOCS3 切断効率の低下が認められた。カルパイン耐性 SOCS3 を培養血管内皮細胞に導入したところ、野生型 SOCS3 と比較して強い抗血管新生活性が認められた。カルパイン耐性 SOCS3 変異体は、シクロヘキシミドによりタンパク質合成を停止させた細胞内において、またはカルシウムイオノフォアでカルパインシステムを強制的に活性化した細胞内においても野生型と比較して高い安定性を示した。培養血管内皮細胞において siRNA を用いてカルパスタチン発現を低下させたところ、IL-6 による ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、MMP3 の発現誘導が促進された。さらに、IL-6 による SOCS3 の発現誘導が抑制され、STAT3 のリン酸化が亢進し、その標的遺伝子である VEGF-C の発現が上昇した。また、培養血管内皮細胞の IL-6 誘発性管腔形成はカルパスタチンの欠損により亢進したが、これは JAK/STAT 阻害剤 AG490、非選択的 VEGF 受容体阻害剤 AAL933、2型 VEGF 受容体選択的阻害剤 SU1498 および抗 VEGF-C 中和抗体で抑制された。一方、管腔形成の促進は、抗 VEGF-A 中和抗体では抑制されなかった。カルパスタチン発現の低下は、IL-6 存在下の細胞増殖および遊走速度を亢進した。したがって、カルパスタチン欠損による血管新生の促進は、JAK/STAT3/VEGF-C 分子軸に依存すると考えられる。

(4) 成長因子の作用でカルパスタチンの発現低下が引き起こされる

培養血管内皮細胞を血管内皮成長因子-A (VEGF-A)、インスリン様成長因子 (IGF)、表皮成長因子 (EGF) で刺激したところ、カ

ルパスタチンタンパク質の発現低下が認められた。ヒト剖検体切片を免疫組織化学的に解析したところ、正常組織の血管においてはカルパスタチンが高発現しているのに対して、星状細胞種、肺腺癌、大腸腺癌内に存在する腫瘍血管にはほとんど発現していないことが明らかとなった。同様の手法でマウスにおけるカルパスタチン発現を確認したところ、大動脈血管内皮細胞で認められた発現が、担癌モデル(ルイス肺癌細胞移植モデル)の腫瘍血管では認められないことが明らかとなった。また、酸素誘発性網膜症モデルにおいては、未成熟な新生血管ではカルパスタチン発現が低く、成熟が進んだ血管では発現が高い傾向が認められた。一方、ヒト剖検体切片において SOCS3 の発現分布を確認したところ、カルパスタチンと同様に正常組織の血管において高発現しているのに対して、腫瘍血管にはほとんど発現していないことが明らかとなった。したがって、マウス病的血管新生で認められたカルパインシステムの過剰亢進および JAK/STAT 経路の活性化は、ヒト病的血管新生においても機能していると考えられる。

(5) 考察

病的血管新生は様々な炎症性疾患や腫瘍の進展に關与することが知られている。近年、動脈硬化症ならびに AAA において、血管外膜における新生血管の形成が炎症性細胞の動員を増加させ、病態を悪化させることが明らかになった。これまで、VEGF-A が血管新生において主導的な役割を担うと考えられてきたが、炎症性サイトカインも血管新生促進作用を有することが近年明らかとなった。病的血管新生は、生理的血管新生と異なり、炎症性サイトカイン存在下で管腔形成が起こる場合も多い。成長因子と炎症性サイトカインは異なる細胞内シグナル伝達経路を用いるため、両者の相互作用を正確に理解することが次世代の抗血管新生療法に必要不可欠と考えられる。本研究において、成長因子シグナルの下流でカルパインシステムが活性化し、その結果炎症性 JAK/STAT シグナルが亢進することが明らかとなった。これは、すなわちカルパインシステムが成長因子シグナルと炎症性シグナルを結ぶ鍵となることを示している。JAK/STAT シグナル活性化により、標的分子である VEGF-C が血管内皮細胞においてオートクライン的に作用し、その結果病的血管新生が潜在的に促進される。したがって、同システムをターゲティングすることにより病的血管新生ならびに AAA を含む関連疾患を効率的に抑制することができる。【Miyazaki T. et. al., Circ Res 2015】

## 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 8 件)

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, 1170-1181, 2015.

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*, 105, 361-371, 2015.

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, 2413-2420, 2014.

Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita-Okubo S, Offermanns S, Itabe H, Miyazaki T, Miyazaki A: Identification of Hic-5 as a novel scaffold for the MKK4/p54 JNK pathway in the development of abdominal aortic aneurysms. *J Am Heart Assoc*, 3, e000747, 2014.

Miyazaki T, Koya T, Kigawa Y, Oguchi T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A: Calpain and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 20, 228-237, 2013.

Kim-Kaneyama JR, Miyauchi A, Lei XF, Arita S, Mino T, Takeda N, Kou K, Eto K, Yoshida T, Miyazaki T, Shioda S, Miyazaki A: Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin IIb 3 activation and platelet aggregation in mice. *J Thromb Haemost*, 10, 1867-1874, 2012.

Koya T, Miyazaki T, Watanabe T, Shichiri M, Atsumi T, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A: Salusin- accelerates inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF- B signaling in LDL receptor-deficient mice in vivo and HUVECs in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303, H96-H105, 2012.

Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, Miyauchi A, Miyazaki T, Miyazaki A: Hydrogen peroxide-inducible clone 5

(Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders. *J Atheroscler Thromb*, 19, 601-607, 2012.

### [学会発表](計 17 件)

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(東京, 2014. 7)

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(東京, 2014. 7)

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. The 18th International Vascular Biology Meeting (京都, 2014. 4)

Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita S, Offermanns S, Miyazaki T, Miyazaki A: Identification of Hic-5 as a novel scaffold for the MKK4/JNK2 pathway in the development of abdominal aortic aneurysms. The 18th International Vascular Biology Meeting (京都, 2014. 4)

Kaneyama S, Miyauchi A, Lei XF, Arita S, Eto K, Miyazaki T, Miyazaki A: Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin IIb 3 activation and platelet aggregation in mice. The 18th International Vascular Biology Meeting (京都, 2014. 4)

宮崎拓郎・礪波一夫・秦勝志・雷小峰・金山朱里・反町洋之・栗原裕基・宮崎章: Calpain-6 による動脈硬化病変およびマクロファージ pinocytosis の制御. 第 21 回血管生物医学会学術集会(大阪, 2013. 9)

武富芳隆・宮崎拓郎・佐藤弘泰・村上誠: III 型分泌性ホスホリパーゼ A2 は動脈硬化を制御する. 第 86 回日本生化学会大会(横浜, 2013. 9)

宮崎拓郎・礪波一夫・秦勝志・雷小峰・金山朱里・反町洋之・栗原裕基・宮崎章: Calpain-6 による動脈硬化病変およびマクロファージ pinocytosis の制御. 第 86 回日本生化学会大会(横浜, 2013. 9)

Miyazaki T, Taketomi Y, Takimoto M, Murakami M, Miyazaki A: m-Calpain is

induced in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and accelerates atherosclerotic lesion development through proteolytic disorganization of VE-cadherin. 2013 FASEB Summer Research Conference Calpains Function in Biology and Disease (サクストンリバー, 2013. 7)

宮崎拓郎: Salusin- による動脈硬化性血管炎の制御. 2nd Symposium on Salusins (相模原, 2013. 6)

宮崎拓郎: カルパインシステムによる動脈硬化性疾患の制御. 第14回 Pharmaco-Hematology シンポジウム(東京, 2013. 6)

宮崎拓郎: カルパインシステムによる動脈硬化性疾患の制御. 第55回 東京脂質代謝研究会(東京, 2013. 2)

宮崎拓郎, 雷小峰, 金山朱里, 宮崎章: 血管内皮細胞におけるリゾホスファチジルコリンによる m - カルパイン発現誘導とその動脈硬化症における意義. 第85回 日本生化学会大会(福岡, 2012. 12)

宮崎拓郎・雷小峰・金山朱里・宮崎章: Roles of calpain systems in endothelial barrier dysfunctions and atherogenesis. 第20回 血管生物医学会学術集会(徳島, 2012. 12)

Miyazaki T: Regulation of atherosclerosis by calpain and drug metabolism. 2012 Annual Meeting of the Korean Society of Applied Pharmacology. (春川, 2012. 10)

宮崎拓郎・雷小峰・有田茂子・金山朱里・宮崎章: m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. 第44回 日本動脈硬化学会学術集会(福岡, 2012. 7)

宮崎拓郎: ヒト及びマウス動脈硬化病変において認められる m-カルパイン発現誘導ならびにその VE-カドヘリン崩壊および動脈硬化進展における役割. 第4回 Cholesterol Dynamics 研究会(東京, 2012. 6)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www10.showa-u.ac.jp/~biochem/Takuro\\_Miyazaki/Takuro\\_Miyazaki.html](http://www10.showa-u.ac.jp/~biochem/Takuro_Miyazaki/Takuro_Miyazaki.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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