

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860172

研究課題名(和文) 内皮間葉転換を介した糖尿病性血管石灰化病変形成におけるERK5の役割解明

研究課題名(英文) The role of ERK5 in diabetic vascular calcification mediated by endothelial-to-mesenchymal transition

研究代表者

石澤 有紀 (IZAWA-ISHIZAWA, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：40610192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず、血管内皮細胞においてERK5の活性化を惹起する可能性のある物質を探索した。その結果、脂質異常症治療薬の一つであるピタバスタチンが強力にERK5活性化を惹起することが明らかとなった。ピタバスタチンは、ERK5活性化を介しeNOSの発現を増加させた。また、eNOSの発現に伴って内皮細胞マーカーであるVE-カドヘリン発現を増加させる傾向が観察された。NO産生は内皮細胞の形質の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆されることから、ピタバスタチンがERK5活性化を介しeNOS発現、NO産生を惹起することによりVE-カドヘリン発現を増加させ、内皮間葉転換を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：First of all, we found that pitavastatin, one of lipid lowering agents, can activate ERK5 in endothelial cells by high throughput screening. Pitavastatin increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression via ERK5 activation. As eNOS was increased, VE-cadherin, a marker of endothelial cell, was also increased by pitavastatin treatment. NO generation is suggested to regulate VE-cadherin expression and play an important role in the maintain of endothelial cell character. Therefore, it was suggested that pitavastatin might prevent endothelial cells from endothelium-to-mesenchymal transition via ERK5 activation-eNOS expression-NO generation pathway.

研究分野：薬理学

キーワード：血管石灰化 内皮間葉転換 ERK5 スタチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性大血管合併症や大動脈弁膜症などには異所性石灰化の形成が観察される。その成因として、血管平滑筋細胞 (VSMC) や心筋細胞自身の骨芽細胞様分化やカルシウム沈着の関与が報告されているが、その詳細は未だ明らかでない。そこで近年、国内外において血管内皮細胞 (EC) VSMC 間のクロストークや内皮間葉転換 (endothelial-to-mesenchymal transition: EndMT) の関与が示唆されており、内皮の役割に注目が集まってきている。

(2) EC での石灰化誘導シグナルを活性化させる誘因としては、血流すなわち flow 刺激の変化や高血糖が挙げられる。これまでに disturbed flow (DF: 乱流) 刺激によって VSMC の骨芽細胞様分化を惹起する蛋白である BMP4 (bone morphogenetic protein 4) が EC から分泌されることが報告されている。さらに血管の石灰化は、DF 刺激に晒される大動脈弓部小弯に好発していることが臨床研究から明らかとなった。一方で DF や高血糖刺激が EndMT を誘導することがすでに報告されている。以上の知見から DF および高血糖による EndMT が糖尿病性血管石灰化形成に関与する可能性が極めて高いことが推察されるが、内皮を介した石灰化病変形成の詳細な分子機構は依然報告が少なく、ほとんど解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) ERK5EK0 における血管石灰化病変形成への EndMT 関与の解明

- ・頸動脈部分結紮術 (partial carotid ligation: PCL) (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003) を行うことによって DF による動脈硬化発症モデルを作製し、頸動脈に形成される病変内へのカルシウム沈着が ERK5EK0 で WT マウスに比べ増悪するか否かを検討を行う。
- ・上記モデルマウスにおいて EndMT 関連蛋白発現の変化 (EC マーカーの発現低下および間葉系細胞マーカーの発現上昇) を検討する。

(2) EndMT シグナル、石灰化シグナルに対する ERK5 の役割解明

- ・ERK5 の欠失、または ERK5 を活性化させることが明らかとなっているスタチン系薬物 (Biochem Pharmacol 2013) が高血糖刺激による EndMT に影響を与えるか否かを培養 EC を用いて検討する。

- ・EndMT を起こした EC へのカルシウム沈着の有無を in vitro にて観察する。

(3) 糖尿病モデルマウスおよびヒト石灰化病変における ERK5、EndMT 関連蛋白の発現検討

- ・糖尿病モデルマウスの大動脈を摘出して en face 免疫染色 (Circulation 2013) を行い、内膜において ERK5 および EndMT 関連蛋白発現の変化を検討する。

- ・徳島大学病院病理部より得られたヒト剖検

組織を用い、石灰化病変部において上記蛋白発現の変化を免疫染色にて確認する。

3. 研究の方法

(1) ERK5EK0 に動脈硬化を惹起し、石灰化病変の組織学的・生化学的な解析を行う。

(2) ERK5EK0 の大動脈内膜について、DF による EndMT 関連蛋白の発現を検討する。

(3) 培養 EC を用い、EndMT および石灰化の抑制に ERK5 が関与するか否かを検討する。

(4) 糖尿病モデルマウスの大動脈内膜における ERK5 および EndMT について検討する。

(5) ヒト剖検組織における ERK5 および EndMT 関連蛋白の発現を検討する。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞における ERK5 活性化物質の探索

High Throughput Screening 法により 2000 の小分子化合物ライブラリーから ERK5 の活性化を惹起する可能性のある物質を探索した。その結果、脂質異常症に用いられる HMG-CoA 還元酵素阻害剤の一つであるピタバスタチンが ERK5 の強力な活性化作用を有することを見出した (図 1)。また食品由来成分で ERK5 活性化作用を有するものを探索した結果、ポリフェノールの一種であるケルセチンの代謝物、Q3GA に ERK5 活性化の可能性が示された。以後、ERK5 活性化薬としてピタバスタチン、Q3GA を用いて検討を行った。

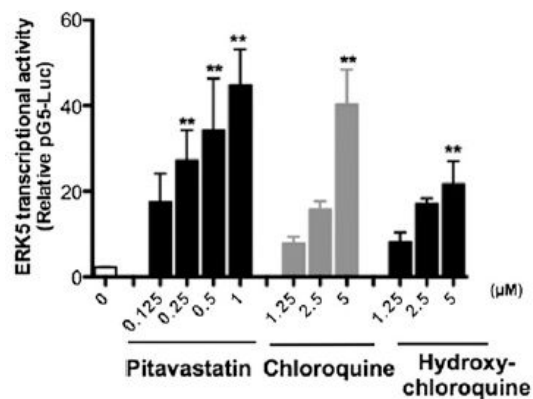


図 1

(2) 内皮障害モデルマウスにおける内皮細胞マーカー発現の観察

C57Bl/6J マウスに一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤である L-NAME を 3 週間飲水投与を行い内皮障害モデルマウスを作成した。その結果、マウスの大動脈において、内皮細胞マーカーである VE-カドヘリンの発現が低下していることが、en face 免疫染色及びウエスタンブロッティングにて観察された (次頁図 2)。このことから、L-NAME 投与マウスにおいて EndMT が惹起されている可能性が示唆された。

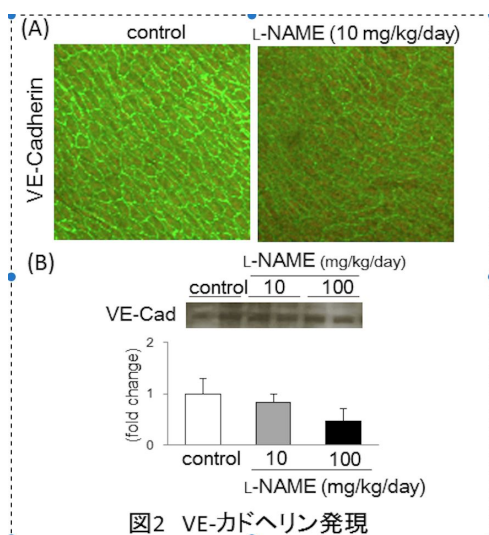


図2 VE-カドヘリン発現

(3) ピタバスタチンによる内皮細胞マーカー発現と内皮障害モデルマウスへの影響

ピタバスタチンは培養血管内皮細胞において、ERK5 活性化を介し eNOS の発現を増加させた。またピタバスタチンは、eNOS の発現に伴って VE-カドヘリン発現を増加させる傾向が観察された。また、NO の供与体あるいは消去剤の効果を検討したところ、NO 産生が VE-カドヘリン発現を増加させたことから、内皮細胞の形質の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。以上より、ピタバスタチンが ERK5 活性化を介し eNOS 発現、NO 産生を惹起することにより VE-カドヘリン発現を増加させ、EndMT を抑制する可能性が考えられる。

また、ピタバスタチンは L-NAME 投与マウスにおいて大動脈解離発症を抑制し得ることが明らかとなった。

(4) 内皮細胞特異的 ERK5 欠損マウスの作製

テキサス大学 MD アンダーソン癌センターの阿部純一教授のご厚意により ERK5^{flox/flox} マウスを譲り受けた。京都大学にすでに供与されていた当マウスを生殖工学の技術を用いて無菌化した後に、徳島大学へ導入した。また、内皮特異的に発現するカドヘリンに対する Cre マウスを導入し、繁殖した。現在、両マウスを掛け合わせ ERK5-^{flox/flox}-Cdh5-Cre マウスを交配・増やしている。さらに本マウスを使用して詳細な検討を継続する。

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)

- 1 Izawa-Ishizawa Y (他 11 名, 7 番目), Iron-induced skeletal muscle atrophy involves an Akt-forkhead box O3-E3

ubiquitin ligase-dependent pathway. J Trace Elem Med Biol. 査読あり 2016;35:66-76.

doi:10.1016/j.jtemb.2016.01.011.

- 2 Izawa-Ishizawa Y (他 9 名, 5 番目), Bilirubin exerts pro-angiogenic property through Akt-eNOS-dependent pathway. Hypertens Res. 査読あり 2015;38(11):733-740.

doi:10.1038/hr.2015.74.

- 3 Izawa-Ishizawa Y (他 9 名, 4 番目), A long-term high-fat diet changes iron distribution in the body, increasing iron accumulation specifically in the mouse spleen. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 査読あり 2015;61(1):20-27.

doi: 10.3177/jnsv.61.20.

- 4 Izawa-Ishizawa Y (他 7 名, 4 番目), Hypoxia decreases glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. Biol Pharm Bull. 査読あり 2015;38(4):514-521.

doi:10.1248/bpb.b14-00612.

- 5 Izawa-Ishizawa Y (他 10 名, 6 番目), Angiotensin II alters the expression of duodenal iron transporters, hepatic hepcidin, and body iron distribution in mice. Eur J Nutr. 査読あり 2015;54(5):709-719.

doi:10.1007/s00394-014-0749-1.

- 6 Izawa-Ishizawa Y (他 10 名, 6 番目), Overexpressed HIF-2 in Endothelial Cells Promotes Vascularization and Improves Random Pattern Skin Flap Survival. Plast Reconstr Surg Glob Open. 査読あり 2014;2(4):e132.

doi:10.1097/GOX.0000000000000083.

- 7 Izawa-Ishizawa Y (他 12 名, 1 番目), Identification of activators of ERK5 transcriptional activity by high-throughput screening and the role of endothelial ERK5 in vasoprotective effects induced by statins and antimalarial agents. J Immunol. 査読あり 2014;193(7):3803-3815.

doi: 10.4049/jimmunol.1400571.

- 8 Izawa-Ishizawa Y (他 10 名, 6 番目), Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. PLoS One. 査読あり 2014;9(2):e89355.

doi:10.1371/journal.pone.0089355.

[学会発表](計 54 件)

以下主要な発表

- 1 鍵本優有, 石澤有紀, 他 無機リン刺激による血管平滑筋細胞石灰化における rho-kinase 及び cyclophilinA の関与,

- 日本薬学会第136年会2016年3月26-29日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- 2 細岡真由子,石澤有紀,他 ケルセチン生体内代謝産物 quercetin -3-O-Dglucuronide による血管内皮細胞保護効果,日本薬学会第136年会2016年3月26-29日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 - 3 斎藤尚子,石澤有紀,他 ケルセチン代謝物 Q3GA による血管内皮細胞保護効果の検討,第89回日本薬理学会年会2016年3月9-11日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 - 4 青木友里,石澤有紀,他 神経突起伸長および脳卒中後神経症状に対するニトロソニフェジピンの効果,第89回日本薬理学会年会2016年3月9-11日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 - 5 石澤有紀,他 Development of endothelial dysfunction-induced aortic dissection model and search for a preventive strategy,第89回日本薬理学会年会2016年3月9-11日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 - 6 今西正樹,石澤有紀,他 ニフェジピン光分解産物による血管リモデリング抑制効果,第252回 徳島医学会学術集会(平成27年度冬期)2016年2月14日 長井記念ホール(徳島県・徳島市)
 - 7 今西正樹,石澤有紀,他 ニトロソニフェジピンによる抗大動脈瘤機序の検討,第45回 日本心臓血管作動物質学会2016年2月5-6日 阿波観光ホテル(徳島県・徳島市)
 - 8 石澤有紀,他 高リン刺激は血管平滑筋細胞において rho-kinase-cyclophilin A 経路を活性化させる,第45回 日本心臓血管作動物質学会2016年2月5-6日 阿波観光ホテル(徳島県・徳島市)
 - 9 石澤有紀,他 ニトロソニフェジピンは悪性脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの生命予後を改善する,第25回日本循環薬理学会2015年12月4日 東大寺総合文化センター金鐘ホール(奈良県・奈良市)
 - 10 斎藤尚子,石澤有紀,他 大動脈解離発症における内皮障害の関与,第25回日本循環薬理学会2015年12月4日 東大寺総合文化センター金鐘ホール(奈良県・奈良市)
 - 11 高田真衣,石澤有紀,他 悪性脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの神経症状に対するニトロソニフェジピンの効果,第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会,2015年10月31日-11月1日 高知市文化プラザ かるぽーと(高知県・高知市)
 - 12 戸谷紘基,石澤有紀,他 大動脈解離発症における内皮障害の関与の検討,第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会,2015年10月31日-11月1日 高知市文化プラザ かるぽーと(高知県・高知市)
 - 13 石澤有紀,他 血管石灰化シグナルにおける Rho キナーゼおよびサイクロフィリン A の関与,第47回日本動脈硬化化学会総会・学術集会 2015年7月9-10日 仙台国際センター・新展示施設(宮城県・仙台市)
 - 14 Yuki Izawa-Ishizawa,他 Novel aortic dissection model by pharmacologically-induced endothelial dysfunction, ISA2015 7th International Symposium on Atherosclerosis 2015年5月23-26日 アムステルダム(オランダ)
 - 15 高田真衣,石澤有紀,他 悪性脳卒中易発性高血圧自然発症ラットに対するニトロソニフェジピンの効果,日本薬学会第135回年会2015年3月25-28日 神戸学院大学・兵庫医療大学他(兵庫県・神戸市)
 - 16 石澤有紀,他 ニトロソニフェジピンは悪性脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの生存期間を延長させる,第88回 日本薬理学会年会 2015年3月18-20日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
 - 17 戸谷紘基,石澤有紀,他 大動脈解離発症における血管内皮機能障害の関与,第88回 日本薬理学会年会 2015年3月18-20日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
 - 18 大越瑞穂,石澤有紀,他 血管平滑筋細胞において無機リンによる石灰化シグナルには Rho-kinase および cyclophilin A が関与する,第88回 日本薬理学会年会 2015年3月18-20日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
 - 19 石澤有紀,他 新規薬剤誘発性大動脈解離モデルを用いたスタチンの効果の検討,第24回 循環薬理学会2014年12月5日 山形テルサ(山形県・山形市)
 - 20 小原佑介,石澤有紀,他 大動脈瘤形成に対する新規抗酸化薬の効果,第53回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2014年11月8-9日 広島国際会議場(広島県・広島市)
 - 21 長尾朋子,石澤有紀,他 HMG-CoA 還元酵素阻害薬の大動脈解離に対する効果,第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会,2014年11月8-9日 広島国際会議場(広島県・広島市)
 - 22 長尾朋子,石澤有紀,他 大動脈解離に対するピタバスタチンの効果,第126回 日本薬理学会近畿部会 2014年10月24

- 日 和歌山県 JA ビル (和歌山県・和歌山市)
- 23 Keisuke Ishizawa, Yuki Izawa-Ishizawa, 他
Nitrosonifedipine ameliorates the progression of aortic aneurysms by exerting antioxidative effects, ESC Congress 2014 2014年8月30日-9月3日 バルセロナ(スペイン)
- 24 小原佑介, 石澤有紀, 他 ニトロソニフェジピンは大動脈瘤の形成を抑制する, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014 2014年8月30日 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市)
- 25 戸谷紘基, 石澤有紀, 他 血管内皮障害を介する新規大動脈解離モデルの作製, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014 2014年8月30日 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市)
- 26 小原佑介, 石澤有紀, 他 薬剤誘導性大動脈瘤モデルに対するニトロソニフェジピンの効果, 第125回日本薬理学会近畿部会 2014年6月20日 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石澤 有紀 (IZAWA-ISHIZAWA, Yuki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 40610192