

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：37111
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K09523
研究課題名(和文)mDia1による血管内皮機能調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of Endothelial Function by mDia1

研究代表者
川浪 大治 (Kawanami, Daiji)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：50568889
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)：動脈硬化は血管内皮機能障害で発症することが知られている。血管内皮機能を調節する因子としてmDia1に着目して研究を行った。mDia1は低分子量GタンパクRhoの下流に存在するエフェクターである。RhoのエフェクターにはmDia1の他にRho-kinaseが知られている。Rho-kinaseとmDia1が相互に作用しながら血管内皮機能を調節していることを想定し、Rho-kinaseのROCK2アイソフォームを血管内皮特異的に欠損させたマウスや血管内皮細胞を用いて検討を行ったが、mDia1は血管内皮機能調節に主要な役割を果たしていないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子量GタンパクRhoに関連するシグナルとしては、動脈硬化の治療標的としてmDia1よりもROCK2がふさわしいことが明らかになった。今後はROCK2を標的とした創薬を行うことが動脈硬化治療における新たな戦略となり得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerosis is known to occur due to vascular endothelial dysfunction. This study focused on mDia1 as a factor that regulates vascular endothelial function. mDia1 is an effector located downstream of small G protein Rho. Rho-kinase is known as an effector of Rho in addition to mDia1. We hypothesized that Rho-kinase and mDia1 interact with each other to regulate vascular endothelial function. We performed experimental studies using mice and cultured cells in which the endothelial ROCK2 isoform of Rho-kinase was deficient. It was revealed that mDia1 does not play a major role in the regulation of vascular endothelial function.

研究分野：糖尿病学

キーワード：動脈硬化 血管内皮機能 Rho mDia1 Rho-kinase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の飛躍的な診断・治療技術の進歩にも関わらず、心血管疾患は依然として我が国における主要な死因であり、その成因の解明が火急の課題となっている。心血管疾患は動脈硬化を基盤として発症するが、そのプロセスに血管内皮機能障害が極めて重要な意義を持つ。低分子量 G 蛋白 Rho は、Ras スーパーファミリーの単量体型 GTPase に属する。Rho は増殖因子や高血糖など細胞外からの刺激に応じて不活性型である GDP 結合型から活性型である GTP 結合型に転じることにより下流シグナルの活性化をもたらす。非刺激下の細胞においては、Rho は、GDP 結合型として主に細胞内に局在しているが細胞外からの刺激が加わると、細胞膜へ translocation して GTP 結合型となる(Narumiya et al. FEBS Lett 1997)。このように Rho は GDP 結合型、GTP 結合型を往来することにより細胞の分子スイッチとして機能し、アクチン系細胞骨格の再構築や接着斑の形成を介して、細胞形態、細胞運動、細胞増殖、平滑筋収縮を制御する。Rho の作用は活性型 Rho がエフェクター分子に働くことによって発揮される。主なエフェクター分子として、Rho-kinase(ROCK)と mammalian diaphanous homolog (mDia)1 が存在する。mDia1 はユビキタスに発現する Formin 蛋白質の一つで、細胞の極性に関係する N 末端の Rho 結合領域に加え Formin 蛋白質群で保存度の高い FH 1, FH 2, FH 3 という領域を持つ(Narumiya et al. Cancer Metastasis Rev 2009)。このうち FH 1 は poly-proline 配列に富み、the receptor for advanced glycation product (RAGE) の細胞内ドメインと結合し、血管平滑筋細胞の遊走を誘導することが明らかにされている(Toure et al. Circ Res 2012)。さらに、血管平滑筋特異的に dominant-negative mDia1 を発現させたマウスでは頸動脈傷害モデルでの新生内膜の形成が抑制されることが示されている(Weise-Cross et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2015)。申請者らは、Rho-kinase の活性化が血管内皮機能障害を誘導し動脈硬化を促進することを報告してきた(Kawanami et al. Biochem Biophys Res Commun 2011, 2013)。しかしながら、mDia1 の血管内皮機能調節機構はこれまでのところ明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

低分子量 G 蛋白 Rho のエフェクターである mDia1 はアクチンの重合を促進し、微小管の配向を決定することで細胞の極性および遊走を制御するアダプター分子である。最近の研究により mDia1 が血管平滑筋細胞の遊走に重要な役割を持つことが明らかにされ、mDia1 の動脈硬化形成への関与が示唆されている。しかしながら、血管内皮細胞における mDia1 の機能については明らかにされていない。申請者は予備的検討において、mDia1 が血管内皮機能障害を誘導する可能性を見出した。本研究では mDia1 ノックダウン血管内皮細胞および血管内皮特異的 mDia1 ノックアウトマウスの解析を通じて mDia1 による血管内皮機能調節機構を解明し、その治療学的意義を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

mDia1 ノックダウン血管内皮細胞および血管内皮特異的 ROCK2 欠損マウスを用いて、mDia1 による血管内皮機能調節機構を検討した。遺伝子発現はリアルタイム PCR を用いて mRNA の発現レベルを解析した。またタンパクの発現は Western blot または ELISA を用いて行った。培養ヒト大動脈内皮細胞(human aortic endothelial cells: HAEC)に対する siRNA のトランスフェクションはリポフェクション法にて行った。血管内皮特異的 ROCK2 ノックアウトマウスは、まず ROCK2 flox マウスを作製し、Cre-loxP システムを用いて exon 3 を欠損させるようにした。VE-Cadherin Cre マウスとこの ROCK2 flox マウスを交配させ、血管内皮特異的 ROCK2 ノックアウトマウス

を得た。マウスに対する高脂肪食負荷は 12 週間行った。

4 . 研究成果

Rho の強力な activator として知られるリソホスファチジン酸(lysophosphatidic acid: LPA)により HAEC を刺激したところ、plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 (Western blot)および monocyte chemoattractant protein(MCP)-1 (ELISA)の発現が誘導されたが、siRNA を用いて mDia1 をノックダウンすると、LPA による PAI-1、MCP-1 の誘導が抑制されることを確認した。この LPA 刺激下での mDia1 の発現レベルを検討したが、mRNA およびタンパクいずれのレベルにおいても変化がみられなかった。Rho 活性化状態での mDia1 と ROCK がどのような相互作用を持つのかを明らかにするため、ROCK 阻害薬で HAEC を処理し、その後に LPA で刺激を行ったが、やはり mDia1 の発現レベルに変化は認められなかった。mDia1 の活性を直接的に測定する方法は現在のところ確立されていないが、c-Src が mDia1 によって活性化されることが知られているため、c-Src の活性測定を行った。しかしながら、ROCK を阻害しても c-Src 活性に一定した活性の変化は捉えられなかった。しかしながら、c-Src は多くの因子によって活性調節を受けていることから、mDia1 の活性という点からは特異性に乏しい可能性が考えられたが、いずれにしても、ROCK 阻害下での mDia1 による代償機構は明らかではなかった。血管内皮機能調節において mDia1 や ROCK といった Rho エフェクター間の相互作用を明確にすることは出来なかった。mDia1 は血管内皮における炎症系のシグナルに一定の寄与はしているものの、mDia1 自体は炎症が起きている条件下においても発現やターゲットする c-Src の活性に影響を与えなかったことから、Rho のエフェクターとしての働きは、少なくとも血管内皮機能障害の成立においては主要な働きをしているという結果を得ることが出来なかった。

そこで、Rho の mDia1 以外のエフェクターが血管内皮機能障害の成立機転に重要な働きをしていると考え、検討を進めた。ROCK には ROCK1 と ROCK2 の 2 つのアイソフォームが存在することが知られている。このうち、ROCK2 をノックダウンした HAEC に LPA 刺激を行うと、NF- κ B の活性化(p65 のリン酸化および p65 の核内移行)が抑制されることが明らかとなった(Takeda et al. Int J Mol Sci 2019)。ROCK1 をノックダウンしても同様の結果は認められなかった。さらに、ROCK2 がノックダウンされた状態では、NF- κ B の抑制に伴い下流に存在する接着分子である E-selectin そしてケモカインである MCP-1 の発現レベルが抑制されることが明らかになった(Takeda et al. Int J Mol Sci 2019)。最後に血管内皮特異的 ROCK2 ノックアウトマウスに高脂肪食負荷を行い、胸部大動脈から RNA を抽出してリアルタイム PCR を施行した。コントロールマウスでは高脂肪食負荷により血管内皮機能障害が生じていたが、血管内皮特異的 ROCK2 欠損マウスではこれらの変化が抑制されていた。mDia1 の動態についても検討を行った。しかしながら、高脂肪食負荷、そして ROCK2 の有無に関わらず mDia1 の発現レベルには変化がみられなかった。

以上の結果から、mDia1 の血管内皮機能調節機構は明らかではなく、少なくとも血管内皮においては Rho に関連するエフェクターとしては mDia1 よりも ROCK2 が重要であり、動脈硬化における治療標的になる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeda Y, Matoba K, Kawanami D, Nagai Y, Akamine T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K	4. 巻 20
2. 論文標題 ROCK2 Regulates Monocyte Migration and Cell to Cell Adhesion in Vascular Endothelial Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20061331	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 -
1. 著者名 Kawanami D, Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Akamine T, Yokota T, Sango K, Utsunomiya K.	4. 巻 18
2. 論文標題 SGLT2 Inhibitors as a Therapeutic Option for Diabetic Nephropathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18051083.	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 -
1. 著者名 Matoba K, Kawanami D, Nagai Y, Takeda Y, Akamine T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Rho-kinase blockade attenuates podocyte apoptosis by inhibiting the Notch signaling pathway in diabetic nephropathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18081795	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 -
1. 著者名 Takaku S, Yako H, Niimi N, Akamine T, Kawanami D, Utsunomiya K, Sango K.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Establishment of a myelinating co-culture system with a motor neuron-like cell line NSC-34 and an adult rat Schwann cell line IFRS1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-018-1649-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daiji Kawanami, Keiichiro Matoba, Kazunori Sango, Kazunori Utsunomiya	4. 巻 17
2. 論文標題 Incretin-based Therapies for Diabetic Complications: Basic Mechanisms and Clinical Evidence	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms17081223	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 -

1. 著者名 Daiji Kawanami, Keiichiro Matoba, Kazunori Utsunomiya	4. 巻 31
2. 論文標題 Signaling pathways in diabetic nephropathy	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 1059-1067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-11-777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	宇都宮 一典 (Utsunomiya Kazunori) (50185047)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	