

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08976

研究課題名(和文) Epac1欠損マウスを用いた骨髄由来細胞の血管内膜肥厚促進機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of promotion of vascular intimal thickening by bone marrow-derived cells using Epac1-deficient mice

研究代表者

加藤 優子 (Kato, Yuko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：50580875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管の内膜肥厚を促進するシグナル伝達分子Exchange protein directly activated by cyclic AMP 1 (Epac1)を中心に、内膜肥厚形成メカニズムを明らかにした。内膜肥厚形成における骨髄由来細胞の影響は限定的で、Epac1は骨髄由来細胞より血管組織由来の細胞に作用して内膜肥厚形成に関与すると考えられた。さらにEpac1は血管傷害後の内膜肥厚形成に重要な塩基性線維芽細胞増殖因子の刺激により活性化されるAkt/GSK3 を介するシグナル伝達経路に関与することで血管内膜肥厚形成促進に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に虚血性心疾患患者に対して行われる経皮的冠動脈形成術では、施術により損傷した血管組織の治癒過程で血管内膜肥厚が起こる。約40%の患者ではこの血管内膜肥厚が過剰となり、血管の再狭窄や閉塞を起こす。現在臨床ではこれらを抑制するための薬剤流出ステントが使用されているものの、遅発性の血栓症など別の問題が発生しており、別の新しい治療法の開発が望まれている。本研究で明らかにした血管内膜肥厚形成の新しいメカニズムは血管再狭窄を抑制する新しい治療法を提案する基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the mechanism of intimal thickening by focusing on Exchange protein directly activated by cyclic AMP 1 (Epac1), a signaling molecule that promotes intimal thickening. The effect of bone marrow-derived cells on the formation of intimal thickening was limited, and Epac1 was thought to be involved in the formation of intimal thickening by acting on cells derived from vascular tissue rather than bone marrow-derived cells. Furthermore, Epac1 is involved in the Akt/GSK3<sup>-</sup>mediated signaling pathway that is activated by basic fibroblast growth factor, which is important for the formation of intimal thickening after vascular injury, suggesting that Epac1 is involved in the promotion of intimal thickening.

研究分野：細胞生理学

キーワード：血管内膜肥厚 血管平滑筋細胞

## 1. 研究開始当初の背景

一般に虚血性心疾患患者に対して行われる経皮的冠動脈形成術では、施術により損傷した血管の治癒過程で、血管平滑筋細胞が内膜側へ遊走・増殖することで、血管の内膜肥厚が起こるが、約 40% の患者では術後の血管内膜肥厚が過剰におこることで血管の再狭窄が起こり、大きな問題となっている。しかし、再狭窄の発症予測や病態を把握するためのマーカーは無い。

血管傷害では、生体内の主要なセカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP (cAMP) が活性化され、細胞の様々な反応をが引き起こされる[1]。1998 年に PKA を介さない cAMP の新たな標的分子として Exchange protein activated by cAMP (Epac) が発見された。Epac には Epac1 と Epac2 の 2 つのアイソフォームが知られているが、研究代表者らは、世界に先駆けて Epac1 欠損型マウスの作成に成功し[2]、その血管病変に対する役割を明らかにしてきた[3,4]。加えて、研究代表者は、この Epac1 欠損型マウスで血管傷害モデルマウスを作成し、その血管傷害後の内膜肥厚に対する Epac1 の役割を *in vivo* で検討した結果、Epac1 欠損型マウスに血管傷害を与えても内膜肥厚を起こさないことを明らかにした[5]。さらに、*in vitro* での検討により、Epac1 が内膜肥厚形成に重要な血管平滑筋細胞の遊走促進の分子メカニズムも解明している[5]。このように我々は、Epac1 が血管組織の細胞に作用して内膜肥厚を促進することを明らかにしてきたが、内膜肥厚形成には血液中に含まれる骨髄由来の細胞の関与も重要である。傷害により活性化した血小板や傷害組織に動員された単球は、PDGF-BB などのメディエーターを放出し、血管中膜の平滑筋細胞や血管外膜の線維芽細胞の遊走、増殖、分化を誘導し内膜肥厚形成を促進する[6]。加えて、2002 年には、骨髄由来の血管前駆細胞が血中に存在することが報告されたが[7]、近年骨髄由来の血管前駆細胞が、傷害組織に動員され、接着したのち、傷害血管組織で内皮細胞や平滑筋細胞に分化して内膜肥厚組織の形成に関与するという新たなメカニズムが提唱され、非常に注目を集めている[8,9]。しかし、これら骨髄由来細胞の役割はまだよくわかっていない。

Epac1 は、単球を活性化し、単球マクロファージのケモカインの産生を促進することや[10]、接着やケモタキシスを促進することが報告されている[11]。さらに、研究代表者は先行研究にて、Epac1 欠損型の血管平滑筋細胞では分化マーカー SM1 の発現が抑制されていることを見出ししている。このように、Epac1 は血管傷害後の内膜肥厚における骨髄由来細胞の作用に非常に重要な働きを持つと考えられる。

そこで、本研究では骨髄細胞の働きや血管内膜肥厚に重要な Epac1 を指標として、血管傷害後の内膜肥厚形成における骨髄由来細胞の役割を解明することを目的とし、血管形成術後の再狭窄の発症予測や病態を把握するためのマーカーの発見を目指す。

## 2. 研究の目的

### (1) 骨髄由来細胞の内膜肥厚形成への貢献度の評価

血管傷害により血管壁の細胞が失われると、血流中に存在する骨髄由来の血管前駆細胞が損傷部位へ動員され、内皮細胞や平滑筋細胞へと分化し、血管を修復、内膜を肥厚させるという過程に重要な Epac1 の骨髄キメラマウスを用いて血管モデルを作成し、内膜肥厚組織での骨髄由来細胞の分布やマーカー蛋白の発現を比較検討することで、骨髄由来細胞がどの程度血管内膜肥厚の形成に関与するのか明らかにする。

### (2) 骨髄由来細胞の内膜肥厚形成に対する Epac1 を介した作用メカニズムの解明

骨髄由来細胞は傷害血管組織に動員され、接着、分化する。これらの機能には Epac1 が関与していることから、Epac1 欠損型の骨髄細胞を持つマウスの血管内膜肥厚組織を解析することで、Epac1 を介したこれらの骨髄由来細胞の内膜肥厚形成に対する役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨髄キメラマウスの作製

横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学講座で繁殖させた Epac1 欠損型マウス(骨髄由来細胞に Ly5.2 抗原(CD45.1)を発現するマウス)と、Epac1 野生型マウス(骨髄由来細胞に Ly5.1 抗原(CD45.1)を発現する遺伝子を導入したマウス)間で骨髄移植をおこない骨髄キメラマウスを作製した。

移植 4 週間後にマウス末梢血中の白血球成分の Ly 抗原を、フローサイトメトリーを用いて解析し、移植細胞の定着を確認した。

### (2) 血管傷害モデルの作成

(1) で作成した骨髄キメラマウスの大腿動脈より分岐する小動脈に挿入口を作り、ラージワイヤーを大腿動脈の内腔に挿入して内膜剥離、拡張傷害した[12]。

### (3) 内膜肥厚形成組織の評価

骨髄由来細胞の影響が大きい術後 4 週間後に傷害した大腿動脈組織を取り出し、組織学的解析により、内膜肥厚の形成を確認したのち、CD45.1 または CD45.2 抗体を用いた免疫組織染色により内膜肥厚部における骨髄由来細胞の分布を野生型コントロール、野生型レシピエント、欠損型レシピエント、欠損型コントロールの 4 種類のマウスについて比較検討する。さらに、平滑筋細

胞マーカー，SM1 に対する抗体を用いて骨髄由来前駆細胞の分化と Epac1 の影響を検討した。

(4) 内膜肥厚組織を用いた骨髄由来細胞産生物質の評価

平成 29 年度に作成した骨髄キメラマウスの内膜肥厚組織切片を用いて，マクロファージの分布を，CD68 および CD45 抗体を用いた免疫組織染色にて確認した。

#### 4. 研究成果

骨髄移植により野生型コントロール，野生型レシピエント，欠損型レシピエント，欠損型コントロールの 4 種類のマウスを作製し，これらの血管傷害後の血管内膜肥厚を定量した結果では，骨髄が Epac1 欠損型の野生型レシピエントでは野生型コントロールに比べ内膜肥厚部の面積が 16%低下し，骨髄が Epac1 野生型の欠損型レシピエントでは欠損型コントロールに比べ内膜肥厚が 7%大きい結果であった。この結果から，骨髄由来細胞は血管内膜肥厚の 10%程度に影響すると予想された。さらに，内膜肥厚組織において，血管平滑筋細胞の分化マーカーである SM1 の発現を免疫染色により評価したところ，Epac1 欠損型マウスの内膜肥厚組織では，分化マーカー SM1 の発現が低下していた。以上より，骨髄由来の前駆細胞から平滑筋細胞へ分化した細胞は Epac1 欠損型では少ないことが予想され，内膜肥厚形成の減少の機序の 1 つとなっていると考えられた。しかしながら，血管傷害モデルマウスの内膜肥厚組織における骨髄由来細胞の分布を，CD45 抗体を用いた免疫組織染色にて確認したところ，最も影響が大きいと予想された野生型コントロールにおいても内膜肥厚部に存在する骨髄由来細胞は非常に少ない結果であった。さらに，Epac1 は骨髄由来細胞よりむしろ血管組織由来の細胞に作用して血管内膜肥厚形成に関与することが明らかとなった。加えて，近年の Fate Mapping や細胞系譜トレース研究により，内膜肥厚が基盤病態である動脈硬化では，肥厚部のプラーク細胞のうち血管平滑筋細胞が最大 70%を占めていることや[13]，ECM を産生する  $\alpha$ -smooth muscle actin 陽性細胞と並んで，マクロファージ様細胞，フォーム細胞，骨軟骨細胞，間葉系幹細胞など，複数のプラーク細胞の表現型に寄与していることが報告された[14]。これらの報告と今回得られた結果から，血管傷害後の内膜肥厚形成には骨髄由来細胞よりむしろ血管組織由来の血管平滑筋細胞の役割が大きいことが示唆された。そこでその後は，血管平滑筋細胞を介した血管内膜肥厚形成促進作用に着目し検討を進めた。その結果，血管傷害後の内膜肥厚形成に重要な塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の刺激により血管平滑筋細胞内で活性化される Akt/GSK3 を介するシグナル伝達経路に Epac1 が関与することを見出した[15]。この論文は 2019 年度第 10 回日本生理学会入澤宏・彩記念 JPS 心臓・循環論文賞を受賞した。さらに，内膜肥厚形成が初期病態である肺高血圧症例についても検討し，Enolase-1 を介した血管平滑筋細胞の遊走が内膜肥厚の一因になっている可能性を見出し論文発表した[16]。最終年度は，内膜肥厚部に蓄積する細胞外基質に着目し，骨髄由来細胞が深く関連する炎症と細胞外基質の構成分子である Fibulin-1 を介した血管傷害後の内膜肥厚形成促進機序を明らかにし，第 98 回日本生理学会大会にて口頭発表をおこなったほか，第 53 回日本結合組織学会にて口頭発表をおこなう予定である。加えて，細胞外基質と血管内膜肥厚に関する論文を発表した[17]ほか，生理的な血管内膜肥厚である胎児動脈管の閉鎖に関する分子を検討した論文も発表した[18]。今後はこれらの知見を発展させ，血管内膜肥厚の形成メカニズムを包括的に明らかにしていく予定である。

#### 参考論文

1. Ishikawa, Y.; Homcy, C.J. The adenyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circulation research* **1997**, *80*, 297-304, doi:10.1161/01.res.80.3.297.
2. Suzuki, S.; Yokoyama, U.; Abe, T.; Kiyonari, H.; Yamashita, N.; Kato, Y.; Kurotani, R.; Sato, M.; Okumura, S.; Ishikawa, Y. Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 24248-24259, doi:10.1074/jbc.M109.094581.
3. Yokoyama, U.; Minamisawa, S.; Quan, H.; Akaike, T.; Jin, M.; Otsu, K.; Ulucan, C.; Wang, X.; Baljinyam, E.; Takaoka, M.; et al. Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2008**, *295*, H1547-1555, doi:10.1152/ajpheart.01317.2007.
4. Yokoyama, U.; Ishiwata, R.; Jin, M.H.; Kato, Y.; Suzuki, O.; Jin, H.; Ichikawa, Y.; Kumagaya, S.; Katayama, Y.; Fujita, T.; et al. Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation. *PloS one* **2012**, *7*, e36724,

doi:10.1371/journal.pone.0036724.

5. Kato, Y.; Yokoyama, U.; Yanai, C.; Ishige, R.; Kurotaki, D.; Umemura, M.; Fujita, T.; Kubota, T.; Okumura, S.; Sata, M.; et al. Epac1 Deficiency Attenuated Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2015**, *35*, 2617-2625, doi:10.1161/atvbaha.115.306534.
6. Perlman, H.; Maillard, L.; Krasinski, K.; Walsh, K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* **1997**, *95*, 981-987, doi:10.1161/01.cir.95.4.981.
7. Simper, D.; Stalboerger, P.G.; Panetta, C.J.; Wang, S.; Caplice, N.M. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* **2002**, *106*, 1199-1204, doi:10.1161/01.cir.0000031525.61826.a8.
8. Daniel, J.M.; Bielenberg, W.; Stieger, P.; Weinert, S.; Tillmanns, H.; Sedding, D.G. Time-course analysis on the differentiation of bone marrow-derived progenitor cells into smooth muscle cells during neointima formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2010**, *30*, 1890-1896, doi:10.1161/atvbaha.110.209692.
9. Tanaka, K.; Sata, M.; Hirata, Y.; Nagai, R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circulation research* **2003**, *93*, 783-790, doi:10.1161/01.Res.0000096651.13001.B4.
10. Hertz, A.L.; Bender, A.T.; Smith, K.C.; Gilchrist, M.; Amieux, P.S.; Aderem, A.; Beavo, J.A. Elevated cyclic AMP and PDE4 inhibition induce chemokine expression in human monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 21978-21983, doi:10.1073/pnas.0911684106.
11. Lorenowicz, M.J.; van Gils, J.; de Boer, M.; Hordijk, P.L.; Fernandez-Borja, M. Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis. *Journal of leukocyte biology* **2006**, *80*, 1542-1552, doi:10.1189/jlb.0506357.
12. Sata, M.; Maejima, Y.; Adachi, F.; Fukino, K.; Saiura, A.; Sugiura, S.; Aoyagi, T.; Imai, Y.; Kurihara, H.; Kimura, K.; et al. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2000**, *32*, 2097-2104, doi:10.1006/jmcc.2000.1238.
13. Bennett, M.R.; Sinha, S.; Owens, G.K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research* **2016**, *118*, 692-702, doi:10.1161/circresaha.115.306361.
14. Feil, S.; Fehrenbacher, B.; Lukowski, R.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K.; Schaller, M.; Feil, R. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circulation research* **2014**, *115*, 662-667, doi:10.1161/circresaha.115.304634.
15. Kato, Y.; Yokoyama, U.; Fujita, T.; Umemura, M.; Kubota, T.; Ishikawa, Y. Epac1 deficiency inhibits basic fibroblast growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration. *The journal of physiological sciences : JPS* **2019**, *69*, 175-184,

doi:10.1007/s12576-018-0631-7.

16. Kato, Y.; Kasama, T.; Soejima, M.; Kubota, T. Anti-enolase 1 antibodies from a patient with systemic lupus erythematosus accompanied by pulmonary arterial hypertension promote migration of pulmonary artery smooth muscle cells. *Immunology letters* **2020**, *218*, 22-29, doi:10.1016/j.imlet.2019.12.005.
17. Ito, S.; Yokoyama, U.; Nakakoji, T.; Cooley, M.A.; Sasaki, T.; Hatano, S.; Kato, Y.; Saito, J.; Nicho, N.; Iwasaki, S.; et al. Fibulin-1 Integrates Subendothelial Extracellular Matrices and Contributes to Anatomical Closure of the Ductus Arteriosus. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2020**, *40*, 2212-2226, doi:10.1161/atvbaha.120.314729.
18. Saito, J.; Kojima, T.; Tanifuji, S.; Kato, Y.; Oka, S.; Ichikawa, Y.; Miyagi, E.; Tachibana, T.; Asou, T.; Yokoyama, U. Transcriptome Analysis Reveals Differential Gene Expression between the Closing Ductus Arteriosus and the Patent Ductus Arteriosus in Humans. *Journal of cardiovascular development and disease* **2021**, *8*, doi:10.3390/jcdd8040045.

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kato Y., Kasama T., Soejima M., Kubota T.	4. 巻 218
2. 論文標題 Anti-enolase 1 antibodies from a patient with systemic lupus erythematosus accompanied by pulmonary arterial hypertension promote migration of pulmonary artery smooth muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 22 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2019.12.005	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 Kato Yuko, Yokoyama Utako, Fujita Takayuki, Umemura Masanari, Kubota Tetsuo, Ishikawa Yoshihiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Epac1 deficiency inhibits basic fibroblast growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 175 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0631-7	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 Ito Satoko, Yokoyama Utako, Nakakoji Taichi, Cooley Marion A., Sasaki Takako, Hatano Sonoko, Kato Yuko, Saito Junichi, Nicho Naoki, Iwasaki Shiho, Umemura Masanari, Fujita Takayuki, Masuda Munetaka, Asou Toshihide, Ishikawa Yoshihiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Fibulin-1 Integrates Subendothelial Extracellular Matrices and Contributes to Anatomical Closure of the Ductus Arteriosus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 2212 ~ 2226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.120.314729	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 Saito Junichi, Kojima Tomoyuki, Tanifuji Shota, Kato Yuko, Oka Sayuki, Ichikawa Yasuhiro, Miyagi Etsuko, Tachibana Tsuyoshi, Asou Toshihide, Yokoyama Utako	4. 巻 8
2. 論文標題 Transcriptome Analysis Reveals Differential Gene Expression between the Closing Ductus Arteriosus and the Patent Ductus Arteriosus in Humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Development and Disease	6. 最初と最後の頁 45 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcdd8040045	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kato Y, Yokoyama U, Fujita T, Uemura M, Kubota T, Ishikawa Y.
2. 発表標題 Epac1 deficiency inhibits basic fibroblast growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration.
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Kato, Utako Yokoyama, Takayuki Fujita, Tetsuo Kubota, Yoshihiro Ishikawa
2. 発表標題 Epac1 deficiency inhibits bFGF-induced neointimal formation via diminished phosphorylation of GSK3
3. 学会等名 The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Kato, Shota Tanifuji, Yuki Okumura, Kiku Shimizu, Utako Yokoyama
2. 発表標題 PGE2-EP4-induced fibulin-1 expression promotes intimal thickening after vascular injury
3. 学会等名 The 98th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Kato, Shota Tanifuji, Utako Yokoyama
2. 発表標題 Fibulin-1 promotes intimal thickening after vascular injury in mice
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	横山 詩子  (Utako Yokoyama)  (70404994)	東京医科大学・医学部・主任教授   (32645)	

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
---------	---------