

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08111

研究課題名(和文) Caveolin-Cavinシステムによる肺高血圧症発症機序解明と新規治療法探索

研究課題名(英文) Mechanism and new therapeutic target through Caveolin-Cavin system in pulmonary hypertension

研究代表者

中西 直彦 (Nakanishi, Naohiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10637911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜カベオラ構成蛋白であるCaveolin-1 (Cav1) は肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の原因遺伝子の一つであるが、Caveolin-CavinシステムのPAH発症・進展における役割は不明である。

肺動脈血管内皮細胞においてCav1はBMPR2を細胞膜に局在させSmad 1/5/9のリン酸化を調節し、血管内皮細胞のアポトーシスに關与していた。またCavin-1はCav1とBMPR2の結合を競合阻害しBMPR2の細胞膜への局在を阻害して、下流のSmadシグナルを調節していた。以上より、Cav1とCavin1の結合阻害が肺高血圧症に対する治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の我々の研究結果からは、CaveolinおよびCavinがカベオラでのBMPRIIの局在に關与し、下流のSmadシグナルを調節していることが判明した。CaveolinとCavinの結合がBMPRIIの細胞膜上への局在に重要であり、肺高血圧症の発症に關与している可能性が示唆された。肺動脈性肺高血圧症は発症・進展のメカニズムが未だ不明であり根治的治療が確立していない難病である。今回の結果はCaveolin-Cavinシステムの肺高血圧症における役割を明らかにし、肺動脈のリバースリモデリングを可能とする治療法の開発に寄与することが出来たと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Caveolin-1 (Cav1) and Cavin-1 are components of caveolae, and Cav1 is identified as a related gene of pulmonary arterial hypertension (PAH). BMPRII, which is the common gene mutation in PAH, is localized in caveolae. However, the role of the Caveolin-Cavin system in PAH has not been well-known.

Cav1 knockdown in human pulmonary artery endothelial cells (hPAECs) reduced BMPRII at the plasma membrane and Smad 1/5/9 phosphorylation, and increased hypoxia-induced apoptosis. Cavin-1 inhibited the interaction of BMPRII with Cav1 and reduced BMPRII localization on the membrane of hPAECs. Both Cavin-1 and BMPRII were associated with the Cav1 scaffolding domain. Cavin-1 knockdown reversed BMPRII localization at the plasma membrane and Smad 1/5/9 phosphorylation induced by Cav1 knockdown. These results suggest that Cavin-1 interacts with Cav1 and inhibits the association of Cav1 with BMPRII, resulting in modulating Smad signaling pathway and involving in the development of PAH.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺高血圧症 カベオラ Caveolin Cavin BMPR2

### 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺血管の内膜・中膜の肥厚、血栓などにより肺血管抵抗が上昇し、低酸素血症、右心不全を経て死亡する予後不良な疾患である。近年、プロスタサイクリン製剤やエンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ-5 阻害薬が治療に使われるようになり、患者の生存率はかなり改善した。しかし現在の治療は肺動脈の拡張による肺動脈圧低下が主体の治療法であり根治的治療とはならず、積極的に肺血管内膜肥厚を縮小させることにより血管リモデリングを改善させる新たな治療法が必要とされている。

これまで BMP/Smad シグナルを中心としたいくつかの遺伝子変異 (BMPR2, ALK1, Smad9 など) が PAH 発症に重要であることが明らかにされている。遺伝性 PAH の約 70% に BMPR2 遺伝子変異があることや、さらに家族歴の確認されていない特発性 PAH と診断された例でも約 20% に BMPR2 遺伝子の変異の存在が確認されている。近年、カベオラ構成蛋白 (図 1) である Caveolin-1 (Cav1) の遺伝子異常がヒト PAH 患者で報告され<sup>1)</sup>、遺伝性 PAH の原因遺伝子の一つに分類された。

Caveolin-Cavin システムは PAH 発症・進展に関係していることが報告されているが、それらの遺伝子異常の PAH 発症における役割・機序に関してはいまだ不明な点が多い。また、Caveolin-Cavin システムは、PAH の遺伝子異常として最も頻度の高い TGF- $\beta$ /BMP スーパーファミリーと密接な関係を有していることが示唆されているが、Caveolin-Cavin システムの TGF- $\beta$ /BMP スーパーファミリーに対する役割および PAH 発症・進展の関係についてはいまだ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺高血圧症の新規治療ターゲットを視野に、Caveolin-Cavin ファミリータンパクの機能ならびに TGF- $\beta$ /BMP スーパーファミリーとの関係性を包括的に解析することにより、肺動脈性肺高血圧症に対する未知の発症・進展機構ならびに退縮機構を検討し、積極的に肺血管内膜肥厚を縮小させることにより血管リモデリングを改善させる新たな治療法を探索することである。

肺高血圧症における Caveolin-Cavin システムの役割についてはいまだ解明されていない。また、Caveolin-Cavin システムと TGF- $\beta$ /BMP スーパーファミリーの相互作用を検討した研究報告はこれまでにない。本研究によって、TGF- $\beta$ /BMP スーパーファミリーとの関係をも含め、PAH の発症機序に Caveolin-Cavin ファミリータンパクが関わることまで明らかにすることが出来れば、今後の PAH 治療法の開発のための基礎的知見になると考えられる。また、肺動脈リモデリングの分子学的機序を明らかにすることは、肺動脈のリバースリモデリングを可能とする治療法の開発へ大きく寄与することができ、予後不良な疾患である肺動脈性肺高血圧症患者の症状改善のみならず、長期予後改善に貢献できると考えられる。

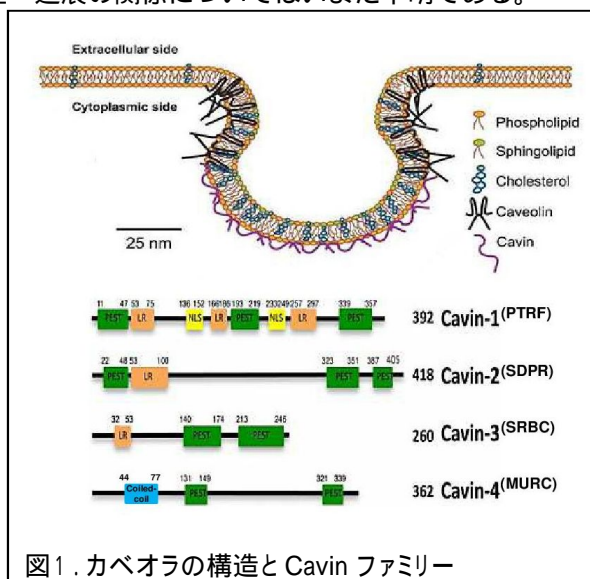


図1. カベオラの構造と Cavin ファミリー

### 3. 研究の方法

#### 1) Caveolin-Cavin システムの肺高血圧症発症・進展における関与の検討

Caveolin-1<sup>-/-</sup>マウス、PTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスを用いて肺高血圧の程度や肺動脈における内膜肥厚の程度を比較検討する。また、Caveolin-1<sup>+/-</sup>・PTRF/Cavin-1<sup>+/-</sup>マウスを作成し肺高血圧症が改善するかを検討する。さらに、肺組織からの肺動脈血管内皮細胞を単離し、mRNA やタンパク発現などを使い、TGF- $\beta$ /BMP シグナルを中心に比較して、肺高血圧における Caveolin-Cavin ファミリーの役割を詳細に検討する。

#### 2) TGF- $\beta$ /BMP スーパーファミリーのシグナル伝達における Cavin-Caveolin システムの関与の検討

肺動脈血管内皮細胞 (PAEC) に Caveolin-Cavin ファミリータンパクを過剰発現もしくは発現抑制を行い Smad のリン酸化ならびに増殖・遊走に関係するシグナル (ERK や Akt など) のリン酸化をコントロール群と比較して検討する。

#### 3) Caveolin-Cavin と BMPR2 の相互結合調節による、BMP シグナル経路の下流へのシグナル伝達調節機構の解明

Cav1 と BMPR2 の相互結合における Cavin ファミリーの関与を免疫沈降や GST-pull down アッセイにて検討する。Cavin ファミリータンパクが Cav1 と BMPR2 の結合を調節しているのであれば、Cav1 を発現抑制した PAEC に Cavin ファミリータンパクを過剰発現もしくは発現抑制すること

で、BMP/Smad シグナルに影響を与えることができるかを検討する。

4) Caveolin-Cavin システムを介した TGF- $\beta$ /BMP スーパーファミリーのシグナル調節による肺高血圧症の新規治療法の探索

Cav1 と Cavin-1 ならびに BMPR2 の結合部位を pull-down assay および免疫沈降にて検討し、Cavin-1 による Cav1 と BMPR2 の結合調節に関して検討を行い、その結合を阻害する既存薬剤を探索する。

#### 4. 研究成果

1) 既報で示されている通り<sup>2)</sup>、Cav1 ノックアウトマウスは Wild タイプマウスと比較して、右室収縮期圧の上昇と右室肥大を認め、組織学的にも微小肺動脈の血管壁肥厚が認められた。また、Cav1 ノックアウトマウスの肺微小血管内皮細胞ではカベオラ構造が消失していた(図2)。肺組織全体では、Wild タイプマウスと Cav1 ノックアウトマウス間で Smad1/5/9 のリン酸化に有意差は認めなかった。そこで抗 CD31 抗体を用いて MACS で単離培養したところ肺微小血管内皮細胞を単離出来ていることを免疫染色で確認できたため、今後はその細胞を用いて Smad のリン酸化やアポトーシスを検討していく予定である。

2) ヒト肺動脈血管内皮細胞(hPAEC)で Cav1 をノックダウンすると Smad1/5/9 のリン酸化が抑制されていた。肺高血圧症の発症には初期の肺動脈内皮細胞のアポトーシスが重要で血管平滑筋細胞の増殖を引き起こすと報告されているため<sup>3)</sup>、Cav1 ノックダウン hPAEC におけるアポトーシスを検討したところ、低酸素刺激による細胞アポトーシスが亢進していた。次に hPAEC において Cav1 と BMPR2 の関係性を検討した。血管平滑筋細胞において Cav1 は BMPR2 と直接結合し、BMPR2 の細胞膜への移送と Smad への下流シグナリングに重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>4)</sup>。hPAEC において Cav1 をノックダウンしたところ、hPAEC の細胞膜分画の BMPR2 が減少し細胞質分画での増加が認められた。また、hPAEC に低酸素刺激を行ったところ細胞膜分画の BMPR2 の発現は低下していた。さらに、Cav1 と BMPR2 の相互作用を Proximal Ligation Assay(PLA)で評価すると、低酸素刺激にて hPAEC での Cav1 と BMPR2 の結合が減少していることが確認された。

3) Caveolin と Cavin は複合体を形成しており、その結合を調節することでカベオラに存在する様々なレセプターの下流シグナルを調節していると考えられる。そこで Cavin による Cav1 と BMPR2 の結合への影響を評価したところ、Cav1 と BMPR2 の結合は Cavin-1 の過剰発現にて抑制され、この結合阻害は細胞内においても PLA にて確認できた(図3)。

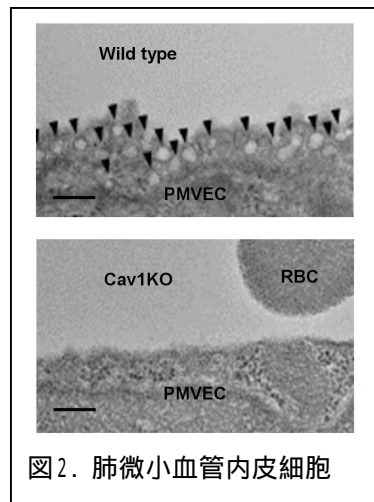


図2. 肺微小血管内皮細胞

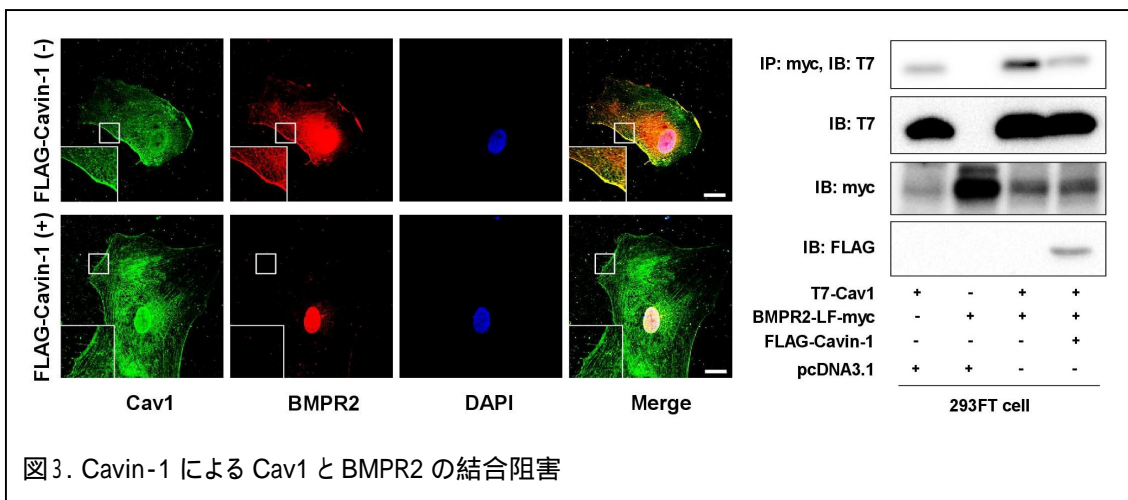


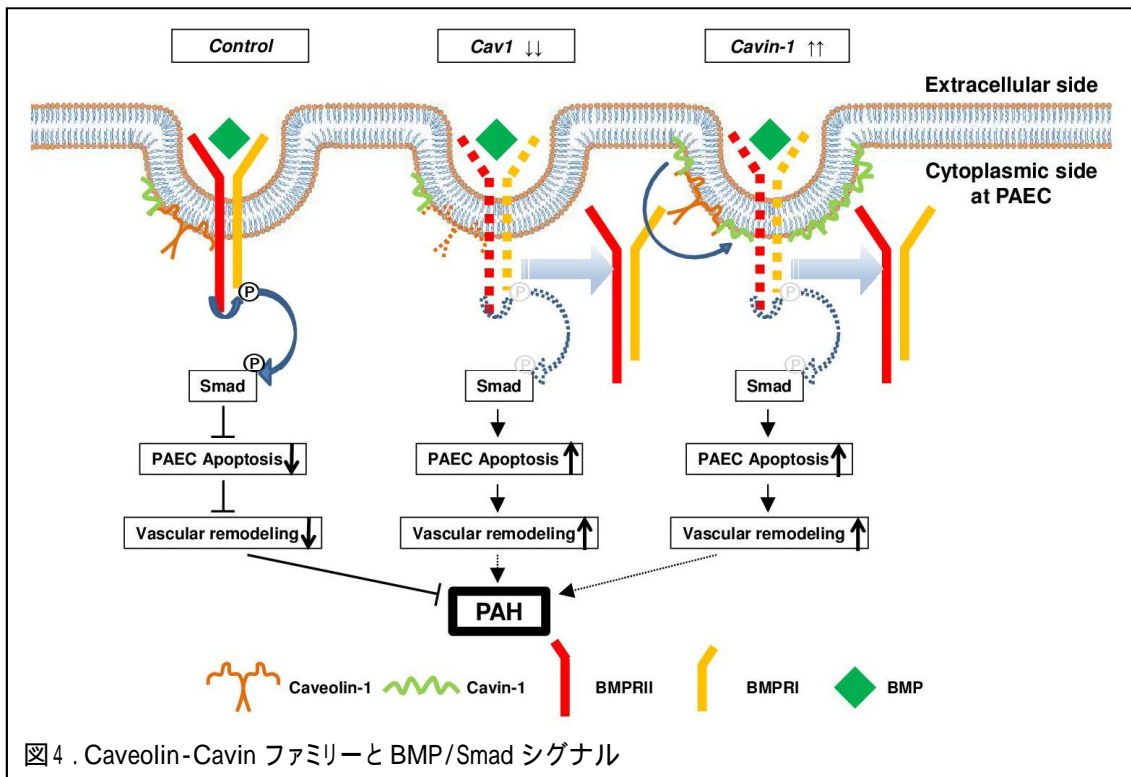
図3. Cavin-1 による Cav1 と BMPR2 の結合阻害

逆に Cavin-1 のノックダウンにて、Cav1 ノックダウンで減少していた hPAEC 細胞膜分画での BMPR2 発現が回復し、細胞膜上での Cav1 と BMPR2 の共局在が回復していた。機能的にも、Cav1 ノックダウンにて低下していた Smad1/5/9 のリン酸化は Cavin-1 のノックダウンにて回復していた。以上より、Cav1 と BMPR2 の結合は Cavin-1 にて阻害を受け、細胞膜上への BMPR2 の移行に Cavin-1 と Cav1 の結合が関与していることが示唆された(図4)。

4) 上記の結果より、Cav1 と Cavin-1 の結合阻害が Cav1 と BMPR2 の結合を増加させ、下流の Smad シグナルを活性化し肺高血圧症進行抑制につながる可能性が示唆されたため、Cav1 と Cavin-1 ならびに BMPR2 の結合部位に関して検討を行った。GST pull-down にて Cav1 fragment と Cavin-1 および BMPR2 の結合を評価したところ、Cavin-1 も BMPR2 もともに Cav1 の scaffolding domain と結合していることがわかった。この結果より、Cavin-1 が BMPR2 と Cav1 の結合を競合的に阻害していると考えられた。Cavin-1 の細胞膜上への局在には leucine-zipper domain 1 が



重要であると報告されており<sup>5)</sup>、今後は Cav1 との結合に Cavin-1 のどのドメインが重要であるかを検討し、それぞれのドメインの構造解析から Cav1 と Cavin-1 の結合を調節する分子の探索を行っていく。



<引用文献>

1. Austin ED, et al. Circ Cardiovasc Genet. 2012;5(3):336-43
2. Zhao YY, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(17):11375-80
3. Sakao S, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006;291(3):L362-8
4. Wertz, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2008;375(4):557-61
5. Wei, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2015;456(3):750-6

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masahiro Nishi	4. 巻 8
2. 論文標題 1.Systems Network Genomic Analysis Reveals Cardioprotective Effect of MURC/Cavin-4 Deletion Against Ischemia/Reperfusion Injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 e012047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.119.012047	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Shinya Tomita, Naohiko Nakanishi, Takehiro Ogata, Yumika Tsuji, Akira Sakamoto, Yusuke Higuchi, Satoaki Matoba
2. 発表標題 Cavin-1 regulates BMP/Smad signaling through the interaction of Caveolin-1 with BMPRII
3. 学会等名 ESC Congress 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinya Tomita, Naohiko Nakanishi, Takehiro Ogata, Takaomi Suga, Yumika Tsuji, Akira Sakamoto, Yusuke Higuchi, Satoaki Matoba
2. 発表標題 Cavin-1 modulates BMP/Smad signaling through the interaction of Caveolin-1 with BMPRII in pulmonary artery endothelial cells.
3. 学会等名 The 85th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideo Tsubata
2. 発表標題 Pulmonary artery blood flow dynamics in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension; Analysis by computational fluid dynamics.
3. 学会等名 ERS international congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Tomita
2. 発表標題 Cavin-Caveolin system associates with pulmonary hypertension by regulating BMP/Smad signaling.
3. 学会等名 American Heart Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi
2. 発表標題 Cavin-2 Regulates Adipocyte Differentiation with Suppression of PPAR and C/EBP Expressions in 3T3L1 Cells.
3. 学会等名 American Heart Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi
2. 発表標題 Cavin-2/SDPR in Cardiac Fibroblasts Regulates Cardiac Fibrosis and Function via TGF-β/Smad Signaling in Pressure-Overloaded Hearts.
3. 学会等名 2019 XXIII ISHR WORLD CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Tomita
2. 発表標題 Cavin-Caveolin system associates with pulmonary hypertension by regulating BMP/Smad signaling.
3. 学会等名 Scientific Meeting of ISHR-The 36th Annual Meeting of the Japanese Section
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi
2. 発表標題 SDPR/Cavin-2 Deficiency Preservers Cardiac Function in TAC-induced Heart Failure via PTEN/Akt-mediated Apoptosis.
3. 学会等名 第1回日本循環器学会基礎研フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi
2. 発表標題 SDPR/Cavin-2 Deficiency Attenuates Interstitial Fibrosis and Preserves Cardiac Function in Pressure Overload-induced Heart Failure in Mice.
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideo Tsubata
2. 発表標題 The wall shear stress of the pulmonary arteries in the patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension before and after balloon pulmonary angioplasty; analysis using computational fluid dynamics.
3. 学会等名 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi
2. 発表標題 SDPR/Cavin-2 Deficiency Attenuates Myofibroblast Differentiation via the Actin-MRTF-SRF Signaling Axis and Cardiac Fibrosis in Pressure Overload-Induced Heart Failure.
3. 学会等名 American Heart Association 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------