

平成21年 4月 13日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590861

研究課題名（和文） 血管病態を機軸とした認知症の次世代治療戦略の構築

研究課題名（英文） Novel therapeutic concept of dementia through vascular axis

研究代表者

中神 啓徳 (NAKAGAMI HIRONORI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20325369

研究成果の概要：

パーキンソン病の原因遺伝子である ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1(UCHL1)、が血管細胞に発現し脱ユビキチン化作用によって抗炎症作用を所持していた。また血管に存在するその他の脱ユビキチン化酵素である CYLD(cylindromatosis)に関しても同様に血管で脱ユビキチン化作用を介して血管リモデリングを抑制した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：脱ユビキチン化酵素、血管リモデリング、認知症

1. 研究開始当初の背景

長寿国の我が国で急速に進行する高齢化社会においては認知症の予防および早期対策は急務である。認知症の危険因子が、動脈硬化症の危険因子と共通することが多い点に着目し、動脈硬化の進展が脳血管性認知症だけではなく、ADあるいはDLBの発症および進展に直接関与する可能性を考えた。本研究ではこれらの認知症関連分子の血管系での発現調節機構の検討および動脈硬化に対する直接作用を検討する。

2. 研究の目的

パーキンソン病の病態形成の主体をなす α -synuclein(SNCA)とその分解調節因子である ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1(UCHL1)、さらに血管に存在する他の脱ユビキチン化酵素に着目し、これらの分子の血管系での発現調節機構の検討および動脈硬化に対する直接作用を検討する。

3. 研究の方法

(1) UCHL1の血管系細胞での機能解析

先行研究により我々は既に UCHL1 が血管

内皮細胞・平滑筋細胞の両方に発現し、興味深いことに傷害血管での新生内膜で特にその発現が増加することを見出している。そこで、UCHL1 は動脈硬化進展に関与するか否かを遺伝子過剰発現あるいは siRNA を用いたノックダウンの実験系を用い、さらにユビキチン・プロテアソームシステムの関与も加味した検討を行う。

(2) 血管に内在する他の脱ユビキチン化酵素の解析

上記の UCHL1 が血管に内在する最初の脱ユビキチン化酵素の研究であったことから、他の脱ユビキチン化酵素も同様に動脈硬化へ関与している可能性を検討する。

(3) SNCA の血管系での機能解析

SNCA は血管平滑筋細胞よりも内皮細胞に比較的強い発現を認めた。そこで血管系に発現する SNCA の機能解析として、SNCA 欠損マウスを用いて血管新生機能への関与の検討や動脈硬化進展への関与の検討を行う。動脈硬化に対しては、ApoE 欠損マウスを用い、SNCA と ApoE のダブルノックアウトマウスを作成することにより、血管内皮細胞で発現している SNCA の動脈硬化に対しての作用を検討する。

4. 研究成果

(1) UCHL1 の血管系細胞での機能解析

我々は動脈硬化の新規治療標的分子・治療用分子を探索するために、独自に開発した遺伝子機能スクリーニング法を用いてヒト血管内皮細胞 (EC) 由来の cDNA library から細胞増殖抑制および Nuclear factor kappa B (NF- κ B) 活性抑制作用を有する分子をスクリーニングしたところ、脱ユビキチン化酵素 (DUB) である Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) を得た。本遺伝子は主として脳に発現し、その変異はユビキチン化システムの異常を引き起こすことで家族性 Parkinson 病の原因遺伝子と報告されている分子であった。ユビキチンシステムはプロテアソームの活性化による異常蛋白の除去のみならず、シグナル伝達物質のユビキチン化により細胞内情報伝達系などにも関与することが知られている。また近年、動脈硬化に伴いユビキチンシステムが活性化されることも報告され、プロテアソーム阻害薬によって血管リモデリングの抑制がみられることから、ユビキチンシステムが動脈硬化の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。脱ユビキチン化酵素とはユビキチン化を

負に制御する分子であるが、これまで血管における DUB の発現および機能についての報告は皆無である。そこで、UCHL1 の機能解析として、NF- κ B の活性制御を中心とする検討を行った。

① 血管での発現調節の検討

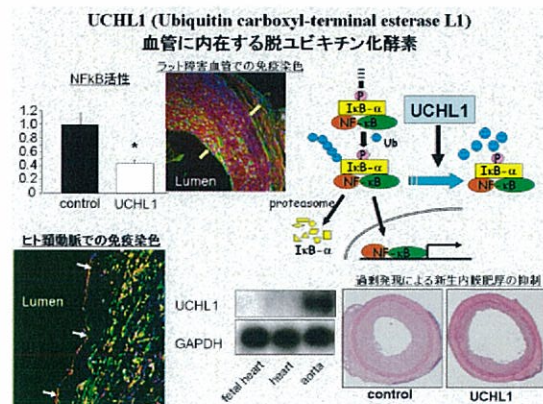
UCHL は EC 及びヒト血管平滑筋細胞 (SMC) に発現を認め、real time PCR による mRNA の定量ではコントロールに比し、TNF- α 刺激により有意な発現の上昇を認めた。また、ラット総頸動脈のバルーン障害後の新生内膜においてその発現の上昇を認め、頸動脈内膜剥離術を施行された症候性患者より得たヒト頸動脈の動脈硬化巣でも UCHL1 の発現が認められた。つまり、UCHL1 は血管で発現しており、さらに傷害部位での発現上昇が認められた。

② 血管細胞での機能解析

EC および SMC において UCHL1 を過剰発現させることにより、TNF- α 刺激下の NF- κ B 活性上昇は有意に抑制され、細胞免疫染色にても NF- κ B のコンポーネントである p65 の TNF- α 刺激による核移行を抑制した。また、TNF- α 刺激による EC での eNOS 蛋白の減衰は UCHL1 を過剰発現することにより抑制された。NF- κ B により制御される下流の iNOS や Mn-SOD、HO-1、接着分子 (ICAM-1、VCAM-1、E-selectin) の TNF- α による発現増加は UCHL1 を過剰発現することにより有意に抑制された。その機序としては、UCHL1 の脱ユビキチン化作用による I κ B- α の安定化が示唆された。つまり、UCHL1 は I κ B- α を安定化させて NF- κ B の活性を抑制し、抗炎症作用を有することが示唆された。

③ ラット頸動脈傷害モデルでの検討

更に *in vivo* における UCHL1 の機能を検討するために、ラット総頸動脈バルーン傷害血管に HVJ-liposome 法を用いて UCHL1 を遺伝子



導入した。すると、バルーン障害後 1 週間目の新生内膜ではコントロールに比し、UCHL1 の遺伝子導入群では活性型 p50 や活性型 p65、ICAM-1、MMP-9 の発現は減少し、バルーン障害後 2 週間目では UCHL1 遺伝子導入群では有意に新生内膜の形成は抑制された。つまり、UCHL1 を傷害血管に過剰発現させると血管リモデリングが抑制されることが分かった。

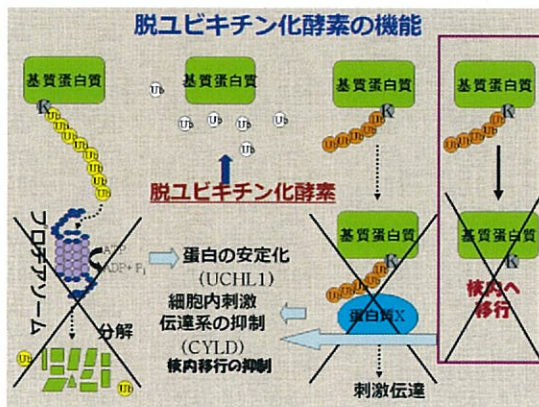
以上の結果より、UCHL1 は血管に内在する脱ユビキチン化酵素として、血管炎症にブレーキをかけている分子だと推察された。

(2) 血管に内在する他の脱ユビキチン化酵素の解析

血管に内在して NF-κB を活性制御する他の DUB をスクリーニングした結果、cylindromatosis (CYLD) 遺伝子が血管にも高発現していることを見出した。血管系に存在する DUB を総合的に解析するために、UCHL1 と同様の解析を行った。

① 血管での発現調節の検討

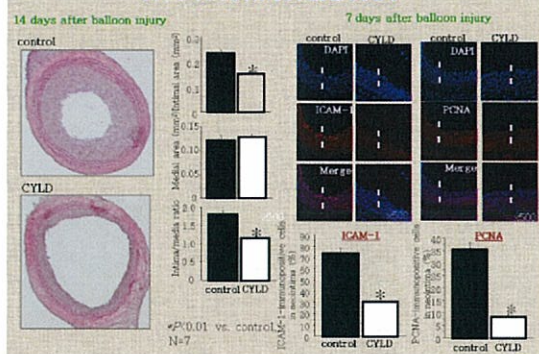
CYLD は UCHL1 と同様に EC 及び SMC に発現を認め、ラット総頸動脈のバルーン障害後の新生内膜においてその発現の上昇を認めた。しかし、そのタイムコースを調べてみると炎症性サイトカインや接着因子が障害後すぐに上昇するのに対して、数日から数週間にかけてゆっくりと発現上昇することが示された。頸動脈内膜剥離術を施行された症候性患者より得たヒト頸動脈の動脈硬化巣でも発現が認められた。



② 血管細胞での機能解析

EC および SMC において CYLD を過剰発現させることにより、TNF-α 刺激下の NF-κB 活性上昇は有意に抑制され、細胞免疫染色にても NF-κB のコンポーネントである p65 の TNF-α 刺激による核移行を抑制した。CYLD は上流の TRAF2 の脱ユビキチン化作用により NF-κB の活性化を抑制するが分かった。すなわち、これら 2 種類の脱ユビキチン化酵素は

CYLDの遺伝子導入によりラットバルーン傷害血管での新生内膜形成は抑制される。



異なる作用機序で NF-κB の活性化を制御していることがわかった。また、CYLD はまた BCL-3 のユビキチン化の抑制を介した核移行の抑制により cyclinD1 の活性化を阻害して抗増殖作用を有することも分かった。

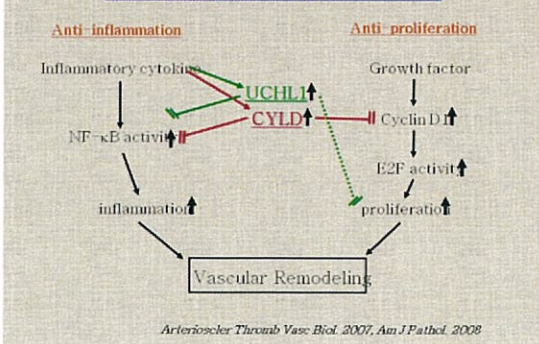
③ ラット頸動脈傷害モデルでの検討

更に *in vivo* における CYLD の機能を検討するために、ラット総頸動脈バルーン傷害血管に HVJ-liposome 法を用いて CYLD を遺伝子導入した。すると、CYLD 遺伝子導入群では有意に新生内膜の形成は抑制され、抗炎症および抗増殖作用を発揮していることが示唆された。

(3) SNCA の血管系での機能解析

SNCA は血管平滑筋細胞よりも内皮細胞に比較的強い発現を認めた。そこで血管系に発現する SNCA の機能解析として、SNCA 欠損マウスを用いた検討を行った結果、高脂肪食負荷下で血管内皮機能の低下 (アセチルコリンに対する反応性低下) が認められ、高血圧も呈していた。また、高脂肪食負荷により肥満傾向を呈するという興味深いフェノタイプも示した。動脈硬化に対しては、ApoE 欠損マウスを用い、SNCA と ApoE のダブルノックアウトマウスを作成したところ、ApoE 単独のノックアウトマウスに比して Oil Red 染色陽性の動脈硬化巣の拡大が認められた。

脱ユビキチン化酵素 UCHL1、CYLD の血管リモデリングにおける機能



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 2 件)

- ① Takami Y, Nakagami H, Morishita R, Katsuya T, Hayashi H, Mori M, Koriyama H, Baba Y, Yasuda O, Rakugi H, Ogihara T, Kaneda Y. Potential role of CYLD (Cylindromatosis) as a deubiquitinating enzyme in vascular cells. *Am J Pathol.* 2008 Mar;172(3):818-29. (査読有)
- ② Takami Y, Nakagami H, Morishita R, Katsuya T, Cui TX, Ichikawa T, Saito Y, Hayashi H, Kikkuchi Y, Nishikawa T, Baba Y, Yasuda O, Rakugi H, Ogihara T, Kaneda Y. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, a novel deubiquitinating enzyme in the vasculature, attenuates NF- κ B activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(10):2184-90 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 鷹見洋一、中神啓徳他 Pivotal role of CYLD (Cylindromatosis) as a Deubiquitinating enzyme in vasculature. 日本循環器学会 平成 20 年 3 月 28 日 マリンメッセ福岡
- ② 中神啓徳 脱ユビキチン化酵素と動脈硬化 血管生物医学会 平成 19 年 12 月 14 日 九州大学百年講堂
- ③ Yoichi Takami, Hironori Nakagami, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, a novel deubiquitinating enzyme in vasculature, plays a pivotal roles in vascular remodeling through the inhibition of NF- κ B activation 平成 19 年 11 月 4 日 Orland, USA
- ④ Yoichi Takami, Hironori Nakagami, et al. Pivotal role of CYLD (Cylindromatosis) as a Deubiquitinating enzyme in vasculature. 平成 19 年 11 月 5 日 Orland, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中神 啓徳 (NAKAGAMI HIRONORI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20325369

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし