

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590884

研究課題名（和文） 心血管ストレスに応答するチロシンキナーゼの作用機序解明とその制御による創薬の試み

研究課題名（英文） Mechanical role of tyrosine kinase PYK2 in cardiovascular stress response and therapeutic regulation of the kinase activity

研究代表者

沖垣 光彦 (OKIGAKI MITUHIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10333197

研究成果の概要（和文）：

これまでの我々の検討によりストレス環境下においては、ストレス応答性チロシンキナーゼ PYK2が、NADPH-Oxidaseの活性化を介し活性酸素産生を増強し、引き続いて産生された活性酸素が、サイトカイン転写、細胞遊走機能の亢進、細胞生存を促進し、動脈硬化、心筋の圧負荷・虚血後の組織リモデリング、血管新生、内皮細胞障害後の内膜肥厚などの病態を促進すると考えられる。そこでPYK2を抑制すればそれらの病態の制御が可能になると考えられる。今回、PYK2-mRNAにたいするshRNAを作成し、adenovirus vector に組み込み、マウスに経静脈的に導入したところ、血管内皮細胞に高効率の発現がみられ、PYK2の発現量が30%以下に抑制された。このマウスにおいて、ガイドワイヤによる大腿動脈内膜障害モデルを作成したところ、内皮細胞障害後の血管再内皮化が促進され内膜肥厚が抑制されることを見出した。さらにApoE欠損動脈硬化モデル、あるいはAngiotensinII持続注入モデルにおいて、それぞれ粥状動脈硬化の抑制・炎症性リモデリングの抑制がみられた。そのメカニズムとして障害血管においてサイトカイン産生が抑制され、活性酸素の発現が低下していた。さらに、大動脈結さつによる圧負荷モデルでも 同じくadenovirus組み換えPYK2-shRNA導入マウスにおいて心肥大の抑制が見られた。これらの結果により、PYK2が血管の炎症性のストレス性病変に中心的役割をはたすこと、PYK2に対する分子標的療法の開発が、これらの疾患の新たな治療戦略につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We have clarified that various cardiovascular stress activates tyrosine kinase PYK2. The activated PYK2 subsequently produce Reactive Oxygen Species (ROS) production and the ROS promotes cardiovascular inflammation, leading to many cardiovascular disease such as atherosclerosis, cardiovascular remodeling after myocardial ischemia and pressure-overload by aortic banding, neointimal hypertrophy after endothelial damages. In this study, we studied whether inhibition of PYK2 in vivo may attenuate the cardiovascular diseases in mice model. We intravenously introduced PYK2-shRNA into mice to knockdown PYK2 in vivo. Expression levels of PYK2 in heart, aorta and kidney decreased less than 30% of the control. Then, 14 days after introducing shRNA for PYK2, the mice was conducted the cardiovascular injury model described above. We observed that endothelial injury by guide wire, hypercholesterolemia under Apo-E deficiency, medial hypertrophy after Angiotensin- II infusion, myocardial hypertrophy after aortic banding was markedly attenuated. Thus, PYK2 is novel and potential therapeutic target of various cardiovascular diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：(1)ストレス(2)PYK2(3)チロシンキナーゼ(4)活性酸素(5)血管生物学

1. 研究開始当初の背景

心血管系は、伸展刺激や血流ずり応力などの恒常的な機械的ストレスのほか、病的状態においては虚血、圧負荷、炎症性サイトカインなど、種々の強いストレス環境にさらされる。このため、心血管系においては恒常性維持の為に、ストレスにตอบสนองするシステムが発達している。とりわけストレスの多くは、細胞質内に活性酸素を産生させるので、活性酸素応答性の刺激伝達系が発達している。しかしその詳細は未だ不明な点が多く、その解明は循環器疾患の新たな治療法開発につながる。PYK2は1)細胞接着分子インテグリンと細胞骨格に結合し、外界の機械的ストレス環境を細胞内に伝え、2)心血管ストレスにより、細胞内に流入したカルシウムにより活性化を受け、3)NADPH-Oxidaseの構成分子であるNOX1の転写を促進し、また低分子量G蛋白質Racを活性化することで、NADPH-Oxidaseを活性化し、大量、かつ持続的な活性酸素の産生を誘導し、4)引き続き活性酸素依存性のリン酸化酵素-転写因子系のカスケードの活性化をひきおこし、最終的に、細胞の遊走、サイトカインの転写、細胞生存の制御に必須の役割をする。5)またPYK2自身が、活性酸素でキナーゼ活性が上昇し、転写が促進される(活性酸素によるポジティブフィードバック

ループ)。あるいはPYK2がPLCγの活性を介してCaの動員をさらに増強する。これらのデータから、PYK2は心血管ストレス応答に必須の役割を果たし、その制御が新たな治療法の開発につながると予想される。

2. 研究の目的

今回申請の研究においては、

1)個々の心血管ストレス環境下において、細胞質内に流入したCa(2+)で活性化されたPYK2が、どのようにNADPH-Oxidaseを活性化し、活性酸素産生を増強するか、また、活性酸素が、どのようにしてサイトカイン転写、細胞遊走機能の亢進、細胞生存に如何に関わり、ひいては、動脈硬化、心筋の圧負荷・虚血後の組織リモデリング、血管新生、内皮細胞障害後の内膜肥厚などの病態にいかに関わるかを、さらに詳細に追求する。

2)PYK2は、PYK2と同様に活性酸素や各種ストレスで活性化を受ける、一連のチロシンキナーゼ群Src、Ab1、JAKと複合体を形成し相互に活性化する。われわれは、PYK2欠損マウスでは、それらのチロシンキナーゼの作用の活性低下もみられることを見いだした。そこで、それらのキナーゼ群の、活性酸素を介した心血管系のストレス応答における役割も追求し、PYK2の作用と比較検討を行う。

3)PYK2は、従来のわれわれの検討では、PY

K2は、PI-3-Kinase, 低分子量G蛋白質Rho, Ca(2+)の細胞質内動員など活性酸素非依存性のシグナルも活性化するが、それらが、どのように各種病態に関わるか検討を行う。

4):PYK2の制御による新たな創薬をめざして、adenovirus-vectorを利用し、shRNA法をもちいたPYK2のin vivoでのKnock-down法を開発し、動脈硬化や、血管内皮細胞障害による新生内膜肥厚、心筋圧負荷や心筋虚血後のリモデリングの抑制が見られるか検討を行う。

### 3. 研究の方法

ApoE 欠損マウスとの掛け合わせによる動脈硬化、大動脈縮窄による圧負荷心筋、冠動脈・大腿動脈結さつによる虚血心筋・下肢筋モデル、アンジオテンシン II 負荷による中膜肥厚・外膜炎モデルなどの疾患モデルにおいて、チロシンキナーゼ PYK2 がどのように NADPH-Oxidase を活性化し、また発生した活性酸素が、それらの心血管ストレスにどのように応答するかその機序を追求する。また、PYK2 は Src・JAK・Abl など、他の活性酸素感受性のチロシンキナーゼと複合体を形成し、相互活性化するが、それぞれのチロシンキナーゼの心血管系ストレス応答の役割の違いを、明らかにする。さらに、Adenovirus により、PYK2 に対する shRNA をマウスに導入し、PYK2 を vivo において心血管系においてノックダウンを行い、各種疾患モデルを作成しその病態の軽減を確認し、PYK2 を標的とする分子標的療法が、新たな治療薬となりうることを示す。

### 4. 研究成果

1) 動脈硬化モデル: ApoE ノックアウトマウスとの交配により、ApoE-PYK2-ダブルノックアウトマウスを作成し、高コレステロール食負荷を行い、動脈硬化を作成した。結果、PYK2 欠損にて動脈硬化の抑制が、見出され

た。その機序としてPYK2欠損マウスにおいては、循環血液中、および動脈硬化組織に動員される、単球、血管内皮前駆細胞数がFACS解析および、免疫組織学的検討で減弱していることが確認された。また、血管壁から産生されるサイトカイン、増殖因子、発現がReal-time PCRで減少していた。さらにDCFや8-OH-dGを用いた活性酸素の定量評価において、PYK2欠損マウスではその発現が抑制されていた。また、初代培養内皮細胞を樹立し、酸化LDLやその主要ComponentであるLysophosphatidyl Cholin(LPC)で刺激した。結果PYK2が活性酸素発現を亢進させそれによりサイトカイン産生や、細胞遊走を起こすことがあきらかになった。

2) アンジオテンシン II 負荷による血管リモデリングモデル: PYK2 欠損マウスでは、アンジオテンシン II の皮下埋め込みポンプによる持続皮下注による昇圧反応および、中膜平滑筋の肥厚が低下することを見出した。そのメカニズムは、14日間のアンジオテンシン II 持続負荷後血管の活性酸素産生レベルを、DHE染色、8-OH-dG染色を用いて調べたところ減弱していることを見出した。さらに、初代平滑筋細胞培養をおこない、アンジオテンシン II 刺激後の活性酸素の産生を、DCFを用いて定量化し、PYK2 欠損平滑筋細胞でその産生の低下を見出した。さらなる解析により、その原因は、NADPH-Oxidase の活性が低下していること、その活性低下は、Oxidase の構成分子であるNOX1、NOX4の発現レベルの低下、低分子量Gたんぱく質Racの活性や細胞膜への移行低下によることを見出した。さらに、Racの活性化減弱はRacの活性化にかかわるRac-GEF(Vav)の活性化障害であり、PYK2はVavをチロシンリン酸化こと、また細胞膜上でのPI-4,5-P2,

PI-3,4,5-P3 の発現を促進させることで、Vav の細胞膜移行を促進することで、PYK2 は、Vav/Rac-1/NADPH Oxidase 系を活性化することを見出した。また PYK2 は、アンギオテンシン刺激によるしたカルシウム流入も活性化させ更にアンギオテンシン刺激後の Rho,PI-3-Kinase 活性も促進させた。なお、野生型マウスではアンギオテンシン II 負荷後、血管壁での活性酸素産生に一致して血管壁での NO が Scavenging され、尿中 NO<sub>x</sub> 排泄量の顕著な減少が確認されたが、PYK2 欠損マウスではアンギオテンシン II 負荷後においても NO<sub>x</sub> 排泄量の減少はおこらないことを確認した。

3) 血管内皮障害による内膜肥厚モデル: 大腿動脈のガイドワイヤによる血管内膜障害後の新生内膜肥厚が、PYK2 欠損マウスで顕著に抑制されることを見出した。この原因として、擦過障害局所において、数時間で誘導されるサイトカイン IL-1,TNF $\alpha$  や、ケモカイン MCP-1 の発現が、PYK2 欠損マウスで顕著に抑制されていた。さらにそのメカニズムとして PYK2 は、内膜障害血管の中膜層、あるいは、早期に局所に浸潤してきた炎症細胞において活性化され、同細胞から、活性酸素の産生を介して、活性サイトカインの発現を誘導することが見出された。

4) 心筋圧負荷モデル: 心筋の圧負荷モデルでは、PYK2 欠損マウスにおいて、線維化の抑制とアポトーシスの低下が見られた。このメカニズムは PYK2 が圧負荷において活性酸素産生を介して、線維化に関わる、アンギオテンシン II,TGF $\beta$ , CTGF などの産生を介して線維化を誘導することを明らかにした。

5) 心筋・下肢虚血モデル: 心筋虚血モデルにおいては PYK2 欠損マウスで、虚血下での

Apoptosis の減少があることを見出した。さらに培養心筋細胞、培養心線維芽細胞を用いて 1% 低酸素においても PYK2 欠損細胞で Apoptosis の抑制があった。詳細な解析の結果、PYK2 は低酸素で強い持続的な活性化を受け、活性化された PYK2 が NADPH-Oxidase 活性化し活性酸素を過剰発現させる、あるいは PYK2 が PLC $\gamma$  の過剰な活性化をもたらす細胞質へのカルシウム動員の過剰をもたらす、さらに PYK2 が小胞体ストレスから JNK 活性化-Apoptosis をもたらす系を増強することを見出した。

6) これまでの我々の検討によりストレス環境においては、ストレス応答性チロシキナーゼ PYK2 が、NADPH Oxidase の活性化を介し活性酸素産生を増強し、引き続いて産生された活性酸素が、サイトカイン転写、細胞遊走機能の亢進、細胞生存を促進し、動脈硬化、心筋の圧負荷・虚血後の組織リモデリング、血管新生、内皮細胞障害後の内膜肥厚などの病態を促進すると考えられる。そこで PYK2 を抑制すればそれらの病態の制御が可能になると考えられる。今回、PYK2 にたいする shRNA を作成し、adenovirus vector に組み込み、マウスに経静脈的に導入したところ、血管内皮細胞に高効率の発現がみられ、PYK2 の発現量が 30% 以下に抑制された。

このマウスにおいて、ガイドワイヤによる大腿動脈内膜障害モデルを作成し、内皮細胞障害後の血管再内皮化が促進され内膜肥厚が抑制されることを見出した。さらに ApoE 欠損動脈硬化モデル、あるいは Angiotensin II 持続注入モデルにおいて、それぞれ粥状動脈硬化の及び炎症性リモデリングが抑制された。そのメカニズムとして障害血管においてサイトカイン産生が抑制され、活性酸素の発現が低下

していた。さらに、大動脈結さつによる圧負荷モデルでも adenovirus 組み換え PYK2-hnRNA導入マウスにおいて心肥大の抑制が見られた。これらの結果により、PYK2が血管の炎症性のストレス性病変に中心的役割をはたし、PYK2に対する標的療法の開発が、これらの疾患の新たな治療法開発につながると考えられた。

#### 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 3 件)

- 1) Katsume A, **Okigaki M**, Matsui A, Che J, Adachi Y, Kishita E, Yamaguchi S, Ikeda K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Matsubara H. Early inflammatory reactions in atherosclerosis are induced by proline-rich tyrosine kinase/reactive oxygen species-mediated release of tumor necrosis factor-alpha and subsequent activation of the p21Cip1/Ets-1/p300 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1084-92.
- 2) Kusaba T, **Okigaki M**, Matui A, Murakami M, Ishikawa K, Kimura T, Sonomura K, Adachi Y, Shibuya M, Shirayama T, Tanda S, Hatta T, Sasaki S, Mori Y, Matsubara H. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca<sup>2+</sup> channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:19308-13.
- 3) Endothelial FGF receptor signaling accelerates atherosclerosis. Che J, **Okigaki M**, Takahashi T, Katsume A, Adachi Y, Yamaguchi S, Matsunaga S, Takeda M, Matsui A, Kishita E, Ikeda K,

Yamada H, Matsubara H. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H154-61.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Aldosterone promotes vascular inflammation mediated by trans-activation of Caveolin/Angiotensin-II-Receptor-Type-1/tyrosine kinase PYK2 pathway Yamaguchi S, Matui A, **Okigaki M**, Fukai K, Matsubara H American Heart Association Scientific Sessions 2011 Nov12-16, Orland, USA
- 2) Yamaguchi S, Matui A, **Okigaki M**, Matsubara H Non-genomic action of Aldosterone in VSMC requires translocation of Mineralocorticoid Receptor to the Caveolae in the plasma-membrane and sub-sequent trans-activation of AngiotensinII Type1 Receptor and its downstream tyrosine kinase PYK2/ROS/MAPK pathway American Heart Association Scientific Sessions 2010 Nov13-17, Chicago, USA
- 3) Ca<sup>2+</sup>/Redox-Sensitive Tyrosine Kinase PYK2 Promotes Atherogenesis Through OxLDL/ROS/p21-Dependent Premature Senescence in Endothelium Katsume A, **Okigaki M**, Matsui A, Jisan C, Yamaguchi S, Yamada H, Matsubara H. American Heart Association Scientific Sessions 2009 Nov14-18, Orland, USA
- 4) Calcium/Redox Sensitive Tyrosine Kinase Pyk2 Aggravates Myocardial Ischemia by Promoting Inflammatory Reactions and Cell Apoptosis. Kishita E, Honsho S, Yamaguchi S, Katsume A, Matsui A, Matsunaga S, **Okigaki M**, Matsubara H. American Heart Association Scientific Sessions 2008 Nov8-12, New Orleans, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖垣 光彦 (OKIGAKI MITUHIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10333197

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし