

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16175

研究課題名（和文）ARDS治療を指向したROCKの新規血管透過性制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of pulmonary vascular permeability based on the ROCK signaling

研究代表者

赤嶺 孝祐（Akamine, Takahiro）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60799435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ARDSは肺胞の血管内皮細胞障害により血管透過性が亢進し、血液液体成分が肺胞内へ漏出・貯留することで起こる予後不良かつ死亡率の高い疾患であるが、その機序には不明な点が多く有効な治療方法が少ないのが現状である。そこで、本研究では肺血管透過性の亢進が認められるROCK1およびROCK2ダブルコンディショナルノックアウトマウスを解析することでROCKによる血管透過性制御機構の解明を目指した。その結果、ROCKは細胞接着因子（VE-cadherinや -cateninなど）の肺血管内皮細胞膜への局在を制御することで血管透過性の調節に寄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

本研究は肺の血管透過性制御にROCKが寄与することを明らかにした。本研究で明らかとなったROCKの機能をより詳細に解析することでARDSの治療薬開発基盤を構築することが期待される。また、ARDSのみならず敗血症・浮腫・アナフィラキシーショック・がん・糖尿病網膜症など血管透過性制御機構の破綻に起因する疾患の治療法開発への貢献も期待でき、波及効果が高い。

さらに、本研究では従来の培養細胞を用いた研究により明らかとなったROCKの機能とは異なる機能が生体内で認められることを明らかにした。本研究で解析したROCK遺伝子欠損マウスはROCKの分子機能の新しい概念の創出に資することが大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：ARDS is a disease with a poor prognosis and a high mortality rate. This is caused by leakage of blood components in lung cells due to increased vascular permeability due to vascular endothelial cell damage of lung. Few effective drug treatment modalities for ARDS. In this study, to elucidate the mechanism of vascular permeability regulation by ROCK, ROCK1 and ROCK2 double-conditional knockout mice, in which pulmonary vascular permeability is increased, were analyzed. The results in this study suggested that ROCK contributes to the maintenance of vascular permeability by regulating the localization of cell adhesion factors, such as VE-cadherin and -catenin, to the pulmonary vascular endothelial cell membrane.

研究分野：薬理学

キーワード：ROCK 血管透過性 ARDS

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がドライに保たれ、ガス交換が正常に営まれるためには、肺胞の隔壁機能が維持され、水溶性分子に対する透過性を低く保つことが不可欠である。肺胞隔壁機能は肺胞上皮と血管内皮細胞が担っており、肺胞上皮細胞は外界と組織との隔離に、また血管内皮細胞は血液-組織間の物質移動、すなわち“血管透過性”を制御し、血管内と肺組織との隔離に寄与することで、肺組織の恒常性維持に関わっている。通常、血管透過性は低い状態に維持されているが、炎症などの刺激により、血管透過性が亢進することで、細胞や血漿成分の漏出が惹起され、ARDS (acute respiratory distress syndrome, 急性呼吸促進症候群) などの重篤な障害が認められる。このように内皮細胞には、厳密な血管透過性の制御機能が備わっており、その制御機構の破綻は、ARDS のみならず、浮腫、アナフィラキシーショック、がん、糖尿病網膜症、慢性炎症などさまざまな疾患と関連している。

血管透過性の制御には、Adherence Junction (AJ) を構成する主要な接着分子である vascular endothelial (VE) -cadherin が重要な役割を担う。VE-cadherin 接着は、血管透過性を調節するさまざまな因子によって制御されている (Fukuhara S, et al., J Biochem Mol Biol., 2006., Daneshjou N, et al., J Cell Biol., 2015)。またその裏打ちに存在するアクチン線維の再編成も血管透過性に寄与していることが明らかになっており、その主たる調節シグナリングの中心的な役割を担うのが低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho、Rac、Cdc42、Rap である。これらの蛋白質は、互いにクロストークをしながら、血管透過性を正または負に調節している。特に Rho シグナリングと Rap1/Rac/Cdc42 の機能は相反しており、Rho-ROCK 系は血管透過性を負に制御すると報告もある (Beckers CM, et al., Vascul Pharmacol., 2015.)。

研究代表者が研究対象としている Rho は、その活性化に伴い下流の 2 つの標的蛋白質 ROCK (Rho kinase) と mDia を活性化し、アクチン細胞骨格再編成を調節している。特に、ROCK は分子量 160KDa のセリン・スレオニンキナーゼであり、活性型 Rho との結合によりキナーゼとして機能する。哺乳類細胞では ROCK1・2 の 2 つのアイソフォームが発現しており、これらアイソフォームは同じ分子を基質としてリン酸化する。既報での血管透過性との関連は、トロンピン、ヒスタミンや LPS 刺激などにより Rho-ROCK 経路が活性化すると、内皮細胞のアクトミオシン系が活性化される。その結果、VE-cadherin を含む AJ に張力がかかり、その張力に抵抗するために、VE-cadherin は放射状に配置されたアクチン繊維束に結合し、不連続な点状の接着構造 (punctate AJ) を形成する。この接着構造の形成と血管透過性亢進とは正に相関することが報告されている。すなわち、Rho-ROCK シグナリングは血管透過性亢進に寄与するとされてきた。

研究代表者は成体における ROCK の生体恒常性を明らかにするために、全身性 ROCK 二重遺伝子欠損マウス (ROCK1^{fllox/fllox}:ROCK2^{fllox/fllox}:Ubc-Cre ERT2 マウス) を作出した。タモキシフェン投与依存的に ROCK 遺伝子がノックアウトされる本マウスでは、ROCK が明らかに消失しているにもかかわらず、肺における血液細胞の漏出が観察されることに加え、酸素飽和度 (SpO₂) が有意に低下していることが確認された。さらに肺組織を用いた免疫染色の結果では、VE-cadherin の発現低下が確認されている。これらのことは、本マウスにおいて ROCK を二重欠損させると、血管透過性が亢進することを示唆するものであり、これまでの報告とは明らかに矛盾している。このことから研究代表者はこれまでの培養細胞レベルでの Rho-ROCK 経路の解析では未解明な ROCK による血管透過性制御機構が個体では機能していると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ROCK の個体での新規血管透過性制御機構を明らかにすることで肺の組織恒常性を明らかにし、ARDS などの肺疾患の薬物治療の基盤を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ROCK の生体（成獣）での機能を解析するために Ubc-Cre ERT2 マウスと ROCK1/2 double floxed マウスを交配させることで、タモキシフェン依存的に全身性で ROCK1/2 をノックアウトする Ubc-Cre ERT2;ROCK1/2 floxed (ROCK1/2 DcK0) マウスを作製し、実験に用いた。コントロールマウスとして、ROCK1/2 double floxed マウスを用いた。これらのマウスを用いて以下の解析を行った。

- (1) 肺におけるアクチン細胞骨格への ROCK 遺伝子欠損の影響を解析した。
- (2) 肺血管内皮細胞における細胞接着因子への ROCK 遺伝子欠損の影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ROCK 遺伝子欠損によるアクチン細胞骨格への影響解析

ROCK1/2 DcK0 マウスおよびコントロールマウスにタモキシフェンを 5 日間連日投与し、投与最終日から 0 日目、3 日目、5 日目の肺を採取し、その切片を用いて蛍光ファロイジン染色を行った。その結果、コントロールマウスと比較して ROCK1/2 DcK0 マウスにおいて、タモキシフェン投与後 3 日目からファロイジンの蛍光強度の有意な低下が認められた。この結果から、生体の肺において ROCK 遺伝子の欠損によりアクチン線維の量が低下することが示唆された。

(2) 肺血管内皮細胞における細胞接着因子への ROCK 遺伝子欠損の影響解析

ROCK1/2 DcK0 マウスおよびコントロールマウスにタモキシフェンを 5 日間連日投与し、投与最終日から 5 日目の肺を採取し、その切片を用いて細胞接着因子 (VE-cadherin、 β -catenin、p120-catenin、ZO-1) の血管内皮細胞における局在を蛍光免疫染色法により解析した。その結果、ROCK 遺伝子の欠損により、これらの細胞接着因子の肺血管内皮細胞膜への局在量が低下していることが明らかとなった。さらに、タモキシフェン投与後 5 日目および 7 日目に肺を採取し、 β -catenin 抗体を用いた免疫沈降法により VE-cadherin と β -catenin 複合体の量を調べた。その結果、タモキシフェン投与後 7 日目において、VE-cadherin と β -catenin 複合体の量がコントロールマウスと比較して ROCK1/2 DcK0 マウスにおいて低下することが示された。

以上の結果から、ROCK は肺血管内皮細胞において細胞接着因子の足場として機能するアクチン線維の量を制御することで肺血管内皮細胞間接着および血管透過性の調節に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akamine Takahiro, Terabayashi Takeshi, Sasaki Takako, Hayashi Riku, Abe Ichitaro, Hirayama Fumihiro, Nureki Shin ichi, Ikawa Masahito, Miyata Haruhiko, Tokunaga Akinori, Kobayashi Takashi, Hanada Katsuhiko, Thumkeo Dean, Narumiya Shuh, Ishizaki Toshimasa	4. 巻 14
2. 論文標題 Conditional deficiency of Rho associated kinases disrupts endothelial cell junctions and impairs respiratory function in adult mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 906 ~ 921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13802	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 Tsurudome Yuya, Akamine Takahiro, Horiguchi Michiko, Wada Yukiyo, Fujimura Akio, Ushijima Kentaro	4. 巻 39
2. 論文標題 Potential mechanism of hepatic lipid accumulation during a long-term rest phase restricted feeding in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 1132 ~ 1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2022.2077746	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤嶺孝祐, 寺林健, 佐々木隆子, 石崎敏理
2. 発表標題 The ROCK signaling regulates the pulmonary vascular permeability via maintenance of lung homeostasis.
3. 学会等名 第96回薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------