

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591107

研究課題名(和文)新規遺伝子ARIAによる血管新生・血管発生制御機構の解明と虚血性疾患への治療応用

研究課題名(英文)Characterization of ARIA that regulates angiogenesis and vasculogenesis: its therapeutic application to ischemic diseases

研究代表者

池田 宏二 (KOJI, IKEDA)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90423871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：私達は血管内皮細胞の機能を調節する新規遺伝子ARIAを世界に先駆けて発見した。本研究課題ではARIA欠損マウスを用いて、生体内におけるARIAの機能を解析した。ARIA欠損マウスは野生型マウスと比較して虚血誘導性の血管新生が著明に亢進していた。この機能亢進は血管内皮細胞および血管内皮前駆細胞におけるPI3K/Aktシグナルが増強することで生じることがわかった。さらに私達はin silicoスクリーニングにより、ARIAの機能を阻害する低分子化合物を発見した。ARIA阻害剤は虚血性疾患に対する新しい治療薬として有望である。

研究成果の概要(英文)：We have identified a novel gene termed ARIA that regulates angiogenic functions in endothelial cells. Here, we further characterized its function by using ARIA-deficient mice. ARIA-deficient mice demonstrated substantially enhanced neovessel formation comparing to WT mice assessed by hindlimb ischemia model. Moreover, we revealed that enhanced PI3K/Akt signaling in both endothelial cells and endothelial progenitor cells is attributable to the increased neovessel formation in ARIA-deficient mice. Also, we found a small compound that potentially inhibit ARIA function by in silico screening. Inhibition of ARIA is a new therapeutic approach to treat ischemic diseases.

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：血管新生 血管内皮細胞 PI3K Akt

1. 研究開始当初の背景

虚血性心血管疾患は本邦に於ける死亡原因の上位を占めるだけでなく、罹患患者の生活の質を著しく低下させ、社会復帰の障害となることが重大な問題である。血液を全身に供給するライフラインである血管には自ら新しい血管を作り出し、虚血部位の血流を改善する機能が備わっている(新生血管形成)。新生血管形成は大きく2つの機序により行われる; 1. 既存の血管内皮細胞が虚血部位へ遊走・増殖して新しい血管を作り出す Angiogenesis(血管新生)、2. 骨髄中の血管内皮前駆細胞(EPC)が血中に動員され、虚血部位に集積して血管内皮細胞へと分化し、新しい血管を作り出す Vasculogenesis(血管形成)。しかしながら急性心筋梗塞や脳梗塞など大血管の急性閉塞の際には生理的な新生血管形成では代償できず、虚血に陥った組織は機能低下~壊死に至ってしまう。そこで血管新生・血管形成を人為的に増強することで虚血部位の血流を改善・回復させ、壊死に陥る組織を最小限に抑えるとともに低下した細胞機能を回復させる血管新生療法の開発・臨床応用が進んでいる。**私達のグループでは世界に先駆けて重症下肢虚血患者に対する自家骨髄移植を実施し、他に治療法の存在しない虚血肢の救済に少なからず貢献できた(Lancet. 2002 Aug 10; 360)**。しかしその治療効果は万全ではなく、全く新しい観点からアプローチした、より治療効果の高い血管新生療法の開発が急務であると切実に感じている。そこで私達はシグナルシークエンストラップ法を用いて血管内皮機能を制御する未知の分子の単離を試みた(J Biol Chem. 2004 Dec 31;279)。その結果、**血管内皮細胞に高い発現を示す新規遺伝子を発見し、ARIA と名付けた。ARIA は血管内皮細胞において抗アポトーシス分子である cIAP-1, cIAP-2 の発現調節を介して血管内皮アポトーシスを強力に制御する新規分子であることを明らかとした(Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 19;106)**。さらに私達は最近、ARIA は EPC に於いて、血管内皮細胞の 50 倍近い極めて高い発現を示すことを見出した(図 1)。実際、EPC 中の ARIA 発現を siRNA を用いてノックダウンすると血管内皮細胞同様にアポトーシスが著明に抑制された。さらに驚いたことに ARIA ノックダウンにより EPC の遊走能が著明に亢進し、マトリゲル上での管腔形成能が顕著に促進された。これら結果から **ARIA は血管内皮細胞だけでなく、EPC の機能を強力に制御することで Angiogenesis, Vasculogenesis の両者をコントロールし、新生血管形成に寄与すると考えられた**。ARIA の血管新生・血管形成における役割を詳細に解析するために私達は ARIA ノックアウトマウスを作成した。

2. 研究の目的

本研究課題では ARIA による胎生期血管発生制御および成体内での新生血管形成制御の分子機構を詳細に解析し、ARIA 機能阻害による全く新しい血管新生療法を開発するための基礎データの収集を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ARIA による Angiogenesis/Vasculogenesis の制御

私達はすでに ARIA ノックアウト/GFP マウスの作出に成功している。ARIA ノックアウト/GFP マウスおよび GFP マウスの骨髄を採取して致死放射線を行った ARIA ノックアウトマウスもしくは野生型マウスに移植し、[骨髄]野生型・[全身]野生型、[骨髄]ARIA ノックアウト・[全身]野生型、[骨髄]野生型・[全身]ARIA ノックアウト、[骨髄]ARIA ノックアウト・[全身]ARIA ノックアウト、の 4 系統のマウスを作成する。これらマウスに下肢虚血を作成し、虚血誘導性新生血管形成能を 4 群間で比較・検討する。レーザードップラーで虚血肢の血流回復を 2 週間、経時的に (Day 0, 3, 7, 14) 計測した後に虚血筋を摘出する。虚血筋の切片作成後に GFP/Isolectin 2 重染色を行い、Isolectin 陽性の微小血管数を定量評価するとともに骨髄由来血管内皮細胞 (GFP/Isolectin 両方陽性の細胞) を定量評価することで Vasculogenesis をより直接的に評価する。

ARIA による新生血管形成調節の分子機構の解明

私達はこれまでの検討結果より ARIA は PTEN との相互作用を介して PI3K/Akt/eNOS シグナルを調節していると考えている(図 4)。PTEN は PI3K に拮抗する脱リン酸化酵素であり、細胞膜上の PIP3 の第 3 位を脱リン酸化して不活性型の PIP2 に変換することで PI3K/Akt シグナルを負に調節している。したがって、PTEN は膜近傍に局在できないとその機能を発揮することが出来ない。ARIA は細胞膜表面に発現する膜蛋白であり、PTEN と結合することで PTEN を膜近傍に局在させる足場蛋白として機能していると考えている。従って ARIA が欠損すると膜近傍に局在する PTEN が減少する結果、PI3K/Akt/eNOS シグナルが活性化されると考えている。この仮説を証明するために以下の実験を行う。

- 1、細胞膜に局在する PTEN の定量：
内皮細胞・EPC 中の ARIA をノックダウンし、細胞膜分画を超遠心法にて単離して細胞膜に局在する PTEN をウェスタンブロットにて定量し、コントロール群と比較する。また野生型および ARIA ノックアウトマウス大動脈より単離した血管内皮細胞を用いて同様の検討を行う。さらにもともと ARIA を発現しない CHO 細胞に ARIA を安定的に発現させた細胞株を樹立し、同様に ARIA 発現による細胞膜分画中の PTEN が増加することを確認する。またこれら細胞膜上の PIP2/PIP3 を定量することで PTEN/PI3K pathway の変化を定量的に評価する。
- 2、野生型および ARIA ノックアウトマウスに PI3 キナーゼ阻害剤および NOS 阻害剤を投与した上で下肢虚血を作成し、ARIA 欠損による新生血管形成亢進に PI3 キナーゼ/Akt/eNOS シグナルの増強が必須の経路であることを検証する。

ARIA 阻害剤の探索とその治療効果の

検証

ARIA は PTEN とその細胞内ドメインで結合すると考えられるため、ARIA の細胞内ドメインに干渉し、PTEN との結合を阻害する可能性の高い化合物を in silico でスクリーニングする。候補化合物を購入あるいは合成し、ARIA を安定的に発現させた CHO 細胞に作用させて膜分画中の PTEN が減少するか確認する。ARIA と PTEN の結合を阻害する化合物が見つかり次第、血管内皮細や EPC の遊走能、管腔形成能、アポトーシスに対する効果を検討する。有効性が確認出来れば、下肢虚血モデルを作成した野生型マウスに投与して in vivo における血管新生増強効果を検討する。

4. 研究成果

ARIA による Angiogenesis/Vasculogenesis

の制御

骨髄移植モデルを解析した結果、ARIA は既存の内皮細胞の血管新生能亢進による Angiogenesis 増強、血管内皮前駆細胞の機能亢進による Vasculogenesis 増強の両方を介して虚血誘導性血管増生を制御していることが明らかとなった。

ARIA による新生血管形成調節の分子機構の解明

ARIA ノックダウンにより、EPC 中の PTEN の細胞膜局在は著明に減少した。一方、CHO 細胞に ARIA を過剰発現させると PTEN の細胞膜局在は有意に増加し、その結果、細胞膜中の PIP3 が減少した。以上より、ARIA は PTEN の細胞膜局在の調節を介して血管内皮 PI3K/Akt シグナルを制御することが明らかとなった。さらに ARIA ノックアウトマウスで認められた虚血誘導性血管新生の増強は NOS 阻害剤および PI3K 阻害剤の投与で完全にキャンセルされた。これら結果から、ARIA は生体内においても PI3K/Akt/eNOS シグナルを調整し、血管新生を制御していることがわかった。

ARIA 阻害剤の探索とその治療効果の検証

In silico スクリーニングの結果、ARIA と PTEN の結合を阻害する低分子化合物 (compound-30) を発見した。今後、compound-30 の薬理作用をより詳細に検討する予定である。

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 7 件)

1. Ecsr regulates insulin sensitivity and predisposition to obesity by modulating endothelial cell functions. Akakabe Y, Ikeda K et al. (10 人中 10 番目) *Nat Commun.*, 2013 Sep 10.

2. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. Hoshino A, Ikeda K, Matoba S et al. (9 人中 7 番目) *Nat Commun.* 4:2308, 2013 Aug 6.

3. Periaortic adipose tissue-specific activation of the renin-angiotensin system contributes to atherosclerosis development in uninephrectomized apoE^{-/-} mice. Kawahito H, Yamada H, Ikeda K et al. (14 人中 10 番目) *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*

305(5):H667-75, 2013

4. Macrophages play a unique role in the plaque calcification by enhancing the osteogenic signals exerted by vascular smooth muscle cells. **Ikeda K**, Souma Y,

et al. (11 人中 1 番目) *Biochem Biophys Res Commun.* 425(1):39-44, 2012

5. p53 promotes cardiac dysfunction in diabetic mellitus due to excessive mitochondrial respiration-mediated ROS generation and lipid accumulation. Nakamura H, Matoba S, **Ikeda K**, et al (16 人中 11 番目) *Circ Heart Fail.* 5(1):106-15, 2012

6. p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to exacerbate cardiac damage after ischemia. Hoshiono A, Matoba S, **Ikeda K** et al. (14 人中 11 番目) *J Mol Cell Cardiol.* 52(1):175-84, 2012

7. Apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) controls PI3K/Akt pathway in endothelial and endothelial progenitor cells. Koide M, **Ikeda K**, Akakabe Y, Kitamura Y, Ueyama T, Matoba S, Yamada H et al. (9 人中 2 番目) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(23):9472-7, 2011

[学会発表](計 20 件)
国際学会

1. ARIA regulates the Cardiomyocyte Death in Doxorubicin-induced Cardiomyopathy by Modulating the PI3k/ Akt/ Bad Pathway.

Yohei Kitamura, **Koji Ikeda**, Yoshiki Akakabe, Kiyonari Matsuo, Yoshiaki Shimoda.

AHA 2012 Scientific Session, November 4-7, 2012 at Los Angeles, CA

2. ARIA (Apoptosis Regulator Through Modulating Iap Expression) Regulates Insulin Sensitivity and Predisposition to Obesity Through a Modification of Endothelial Cell Functions.

Yoshiki Akakabe, **Koji Ikeda**, Masahiro Koide, Youhei Kitamura, Kiyonari Matsuo.

AHA 2012 Scientific Session, November 4-7, 2012 at Los Angeles, CA

3. The Anti-atherosclerotic Effect of Statin is Augmented In Patients With Impaired Renal Function: A Sub-analysis of The PEACE Study
Yoshiaki Shimoda, **Koji Ikeda**, Tomosaburo Takahashi, Hiroyuki Yamada, Kiyooki Matsui, Takahisa Sawada, Takashi Nakamura.

AHA 2012 Scientific Session, November 4-7, 2012 at Los Angeles, CA

4. ARIA Modifies the Plaque Vulnerability Through the Control of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Macrophage Apoptosis,
Kiyonari Matsuo, **Koji Ikeda**, Masahiro Koide, Yoshiki Akakabe, Youhei Kitamura, Yoshiaki Shimoda.

AHA 2012 Scientific Session, November 4-7, 2012 at Los Angeles, CA

5. Genetic deletion of ARIA attenuates the doxorubicin-induced cardiomyopathy by activating the Akt pathway in cardiomyocytes.

Kitamura Y, **Ikeda K**, Akakabe Y, Koide M, Ueyama T, Matoba S, Yamada H.

European Society of Cardiology 2011, Paris

6. Association of IL-6 but not hsCRP with subclinical carotid atherosclerosis: a sub-analysis of the PEACE study.

Ikeda K, Takahashi T, Yamada H, Matsui T,

Sawada T, Nakamura T.
European Society of Cardiology 2011, Paris

7. Pitavastatin evaluation of atherosclerosis regression by intensive cholesterol-lowering therapy trial (PEACE study).

Ikeda K, Takahashi T, Yamada H, Matsui T, Sawada T, Nakamura T.
European Society of Cardiology 2011, Paris

8. ARIA controls developmental and postnatal angiogenesis by regulating the PI3K/Akt/eNOS pathway.

Koide M, **Ikeda K**, Kitamura Y, Akakabe Y.
European Society of Cardiology 2011, Paris

9. Identification of ARIA as novel factor in the pathophysiology of metabolic syndrome. Akakabe Y, **Ikeda K**, Kitamura Y, Koide M, Uraoka M, Nakagawa Y.
European Society of Cardiology 2011, Paris

国内学会

招請講演

1. A role of ARIA in angiogenesis; a potential target for the therapeutic angiogenesis.

Koji Ikeda

第 2 1 回日本血管生物医学学会学術集会 2013年9月26日 大阪

2. Vascular Smooth Muscle Cells in the Pathogenesis of Vascular Calcification: Their Distinctive Roles in Plaque Calcification and Medial Calcification

Koji Ikeda

Plenary Session 2, The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 17, 2012 at Hakata, Fukuoka

一般講演

1. ARIA modifies the plaque vulnerability

through the control of macrophage foam cell formation.

Kiyonari Matsuo, **Koji Ikeda**

第 7 7 回日本循環器学会総会 2013年3月16日 横浜

2. ARIA regulates the cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiomyopathy by modulating the PI3K/Akt/Bad pathway.

Youhei Kitamura, **Koji Ikeda**

第 7 7 回日本循環器学会総会 2013年3月16日 横浜

3. ARIA regulates the cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiomyopathy by modulating the PI3K/Akt/Bad pathway.

Koji Ikeda, Youhei Kitamura

第 2 1 回日本血管生物医学学会学術集会 2013年9月26日 大阪

4. ARIA modifies the plaque vulnerability through the control of macrophage foam cell formation.

Kiyonari Matsuo, **Koji Ikeda**

第 2 1 回日本血管生物医学学会学術集会 2013年9月26日 大阪

5. Genetic Deletion of ARIA Attenuates the Doxorubicin-induced Cardiomyopathy by Modulating the PI3K/Akt/Bad Pathway in Cardiomyocytes.

Youhei Kitamura, **Koji Ikeda**, Kiyonari Matsuo, Yoshiki Akakabe, Tomomi Ueyama, Satoaki Matoba, Hiroyuki Yamada.

The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 17, 2012 at Hakata, Fukuoka

6. ARIA modifies the progression of atherosclerosis through the control of

macrophage foam cell formation

Yohei Kitamura, **Koji Ikeda**, Kiyonari Matsuo, Yoshiki Akakabe.

第 20 回血管生物医学会総会、2012 年 12 月 5 日、徳島

7. 老化血管内皮細胞では Bcl-2 の発現低下がミトコンドリア酸化ストレスを増大し、血管新生能を障害する、**池田 宏二**、浦岡 真季、松尾 清成、北村 洋平、赤壁 佳樹、小出 正洋

第 3 4 回日本高血圧学会総会、2011 年、栃木

8. メタボリックシンドロームおよびインスリン抵抗性における新規遺伝子 ARIA の意義 赤壁 佳樹、**池田 宏二**、松尾 清成、北村 洋平、赤壁 佳樹、小出 正洋

第 34 回日本高血圧学会総会、2011 年、栃木

9. Macrophages and vascular smooth muscle cells cooperatively accelerate the atherosclerotic intimal calcification.

Yuka Souma, **Koji Ikeda**, Kiyonari Matsuo, Youhei Kitamura, Yoshiki Akakabe.

The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization、2011 年、東京

〔図書〕(計 1 件)

血管平滑筋細胞の老化とスタチン 池田 宏二、栗本 律子、松原 弘明 Angiology Frontier 10(191):23-28, 2011

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：肥満・インスリン抵抗性を制御する遺伝子

発明者：池田宏二、赤壁佳樹、松原弘明

権利者：

種類：

番号：特願 2011-9375

出願年月日：

国内外の別：国内および国外(米国、ドイツ、

フランス、英国)

取得状況(計 1 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

(池田 宏二)

研究者番号：90423871

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：