

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790558

研究課題名(和文) Epac1欠損マウスを用いた血管再狭窄の分子機構の解明

研究課題名(英文) Epac1 promotes neointimal thickening via calcium/calcineurin-dependent smooth muscle cell polarization and migration after vascular injury.

研究代表者

加藤 優子 (Kato, Yuko)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・助教

研究者番号：50580875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：血管が傷害を受けると、修復の過程で血管を主に構成する血管平滑筋細胞が内腔側へ移動する。しかし、この移動が過度になると血管内膜が肥厚し、血管が狭窄する。我々は今回の研究で、血管平滑筋細胞内の分子である「サイクリックAMPグアニンヌクレオチド交換因子1(Epac1)」が細胞移動に重要な役割を果たすことを見出した。さらに血管平滑筋細胞内でのEpac1の活性化による細胞移動は血管平滑筋細胞内のカルシウム濃度上昇を介していることを明らかにした。加えて、Epac1を欠損させたマウスでは血管障害後の血管内膜の肥厚が抑制されることも明らかにした。この研究成果は血管狭窄の治療に有用となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Vascular remodeling after mechanoinjury largely depends on migration of aortic smooth muscle cell (ASMC). We have reported that activation of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1) promotes ASMC migration. However, the role of Epac1 in advancing vascular remodeling upon vascular injury in vivo, and the intracellular mechanisms remain unknown.

PDGF-BB-induced directional migration of Epac1KO ASMCs was significantly decreased. PDGF-BB-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation of Epac1KO ASMCs was significantly reduced. To assess the establishment of cell polarization under stimulation with PDGF-BB, activation of cofilin in Epac1KO ASMCs was significantly decreased. Activation of cofilin in WT ASMCs was suppressed by cyclosporine A, a calcineurin inhibitor. Ratio intimal thickening to smooth muscle layer of Epac1KO was significantly lower than that of WT. These results suggest that Epac1 promotes directional migration of ASMC via calcium/calcineurin-mediated activation of cofilin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学 病態検査学

キーワード：血管内膜肥厚

## 1. 研究開始当初の背景

一般に虚血性心疾患患者に対して行われる経皮的冠動脈形成術では、施術により損傷した血管の治癒過程で、血管平滑筋細胞が内膜側へ遊走・増殖し内膜の肥厚が起こり、血管の再狭窄が起こることが大きな問題である。特に、傷害された内皮細胞からの及び血小板由来増殖因子(PDGF)が血管内膜肥厚に大きく貢献することが報告されており、血管平滑筋細胞が PDGF の刺激により極性を形成し、内膜方向へ遊走することで内膜肥厚が起こる。

血管傷害では、生体内の主要なセカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP(cAMP)が活性化され、細胞の様々な反応を引き起こされる(Ishikawa Y, et al. Circ Res 1997、以下はすべて研究室よりの関連報告)。近年、cAMP の標的分子として Epac が発見され非常に注目を集めている。Epac には Epac1 と Epac2 の 2 つのアイソフォームが知られているが、研究代表者らは、世界に先駆けて Epac1K0 の作成に成功しその役割を明らかにしてきた (Suzuki S, Kato Y et al. J Biol.Chem, 2010)。我々の研究室では、野生型マウスの血管傷害モデルの傷害組織において Epac1 蛋白の発現が増加していること (Yokoyama U et al. J Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008) を報告している。研究代表者は先行研究にて、Epac1K0 マウスに血管障害を与えても内膜肥厚を起こさないことを示した (Kato Y. 日本循環器学会 2010 口頭発表)。

さらに、Epac1K0 の血管平滑筋細胞は PDGF の刺激による遊走距離が有意に低下し、特に方向性を保った移動能が有意に低下していることを明らかにした。研究代表者の所属研究室では、ラット血管平滑筋細胞において Epac が遊走に重要な細胞骨格形成を促進することを報告しており (Yokoyama U et al. J Biol Chem, 2008)、先行研究結果を強く支持するものである。

加えて、Epac1K0 の血管平滑筋細胞では PDGF 刺激下において方向性の決定に重要な極性形成が有意に低下し、極性形成に重要な活性化 Cofilin および IQGAP1 の発現が減弱していることを発見した (Kato Y. American Heart Association 2011)。

以上の先行研究により研究代表者は、Epac1 が内膜肥厚に重要な PDGF による血管平滑筋細胞の極性形成に関与することで遊走を促進し、内膜肥厚を促進することを明らかにし、Epac1 の抑制が血管傷害後の内膜肥厚形成を抑制する可能性を示した。しかし現在 Epac1 を選択的に阻害する薬剤は開発されておらず、現実的に Epac1 の作用を抑制し内膜肥厚を抑制するターゲットを検討するため、PDGF

から極性形成に至る Epac1 を介した細胞内シグナル伝達経路を詳細に解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、世界に先駆けて作製した Epac1K0 マウスの血管傷害モデルを用い、Epac1 の血管内膜肥厚形成における分子メカニズムを解明し、血管傷害後の内膜肥厚を抑制する方法を見出す。

## 3. 研究の方法

野生型および Epac1K0 マウスの胸部大動脈より初代培養をおこない、血管平滑筋細胞を得た。

(1) 初代培養細胞を用いた細胞内カルシウム活性の測定。

Epac1K0 の血管平滑筋細胞では PDGF の刺激下において極性形成に重要な Cofilin および IQGAP1 の活性が低下していたが、Cofilin はおよび IQGAP1 細胞内カルシウム濃度の上昇により活性化される (Wang Y et al. J Biol Chem. 2005 Scott C et al. J Biol Chem. 1997)。そこで、PDGF 刺激時による Epac1K0 の血管平滑筋細胞内のカルシウム濃度の変化を調べ、細胞内カルシウムが PDGF から極性形成に至る Epac1 を介した細胞内シグナル伝達経路に関与しているかを検討した。

方法：(1) で得られた野生型および Epac1K0 の血管平滑筋細胞内に Fura 2-AM を導入する。これらの細胞を PDGF で刺激し細胞内カルシウム濃度の変化を測定比較した。

初代培養細胞を用いたシグナル伝達経路の解明

(2) PDGF から細胞遊走に至る Epac1-カルシウムを介した細胞内シグナル伝達経路に関与する分子の検索。

方法：血管傷害時の内膜肥厚形成に重要な血小板由来成長因子 (PDGF) を刺激の指標として用い、血管平滑筋細胞の内膜肥厚形成に係わる細胞内メカニズムを、(1) で得られた細胞で SiRNA、リアルタイム PCR、蛍光免疫染色、ELISA 法による細胞内 cAMP 濃度測定を用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1) 初代培養細胞を用いた細胞内カルシウム活性の測定

初代培養にて得られた野生型および Epac1K0 マウスの血管平滑筋細胞を PDGF で刺激し細胞内カルシウムの濃度変化を測定した結果、Epac1K0 マウスの血管平滑筋細胞では野生型マウスの血管平滑筋細胞と比べ

て細胞内カルシウムの増加が有意に低かった。

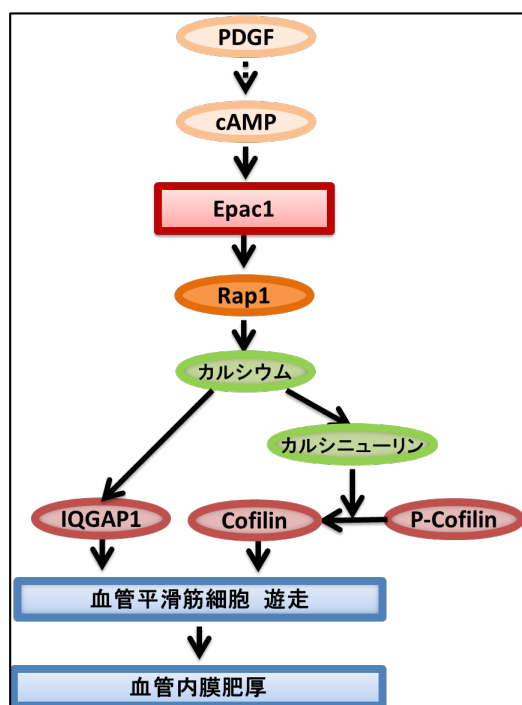
(2) PDGF から細胞遊走に至る Epac1-カルシウムを介した細胞内シグナル伝達経路に関する分子の検索

初代培養にて得られた野生型および Epac1KO マウスの血管平滑筋細胞を PDGF で刺激し Epac1 の活性化因子である cAMP 濃度を測定した結果、野生型、Epac1KO マウスともに cAMP 濃度が増加し、増加率に有意な差は無かった。

野生型マウスの平滑筋細胞の Epac1 のエフェクターである Rap1 の発現を SiRNA を用いてノックダウンした後、PDGF にて刺激し Cofilin の変化を蛍光免疫染色にて確認した結果、Cofilin の活性化が有意に低下した。

野生型マウスの平滑筋細胞にカルシニューリン阻害剤を加えたのち、Epac1 活性化剤で刺激したところ、Cofilin の活性化の有意な抑制がみられた。

先行研究および今回の研究より、Epac1 が血管傷害後の内膜肥厚において重要な働きを担っていることを明らかにした。加えて、傷害により産生された PDGF が cAMP-Epac1-Rap1-細胞内カルシウム-カルシニューリン-Cofilin という経路(図1)を介して血管平滑筋細胞の遊走を促進するという内膜肥厚に重要な細胞遊走のメカニズムも



明らかにした。

図1 Epac1 を介した血管平滑筋細胞遊走を促進するシグナル伝達経路

この血管傷害後の内膜肥厚は、血管形成術後の血管再狭窄の病態の主体であるが、

Epac1KO マウスの血管障害モデルでは血管障害後の内膜肥厚形成が減少していたことから、今回明らかとなった Epac1 を含むシグナル伝達経路の阻害は、新たな血管再狭窄の治療のターゲットとなりうると期待される。

従来、cAMP を介するシグナル伝達の研究は PKA を主体として行われてきた。cAMP-PKA 経路は血管平滑筋細胞の遊走を阻害し、内膜肥厚を抑制することが報告されているが (Indolfi C et al. Nat Med 1997)、血管収縮や弛緩に与える影響が非常に大きく、内膜肥厚抑制薬には使用できない。本研究を通して、cAMP の新規標的分子である Epac に着目し、血管傷害における内膜肥厚への役割を検証することで、cAMP-PKA 経路の作用だけでは説明出来なかった現象が解明される可能性が非常に高い。

研究代表者らは世界に先駆けて Epac1KO マウスを独自に作成し (S Suzuki, Y Kato et al. J Biol.Chem, 2010)、世界初の Epac1/Epac2 ダブル KO マウスの作成にも成功しており、本研究に学術的な特色を与えるものである。

現在、PCI 後の再狭窄を完全に予防する薬剤はない。本研究により Epac1 の内膜肥厚促進の分子メカニズムが解明され、Epac の作用を抑制しうる新たな分子を抑制することで血管傷害後の再狭窄を抑制することが示されると予想される。Epac1 を介した血管傷害シグナル伝達経路の抑制は新たな血管再狭窄の治療につながる可能性が高く、PCI 施行例が急増する今日において人類の健康に多大な貢献を及ぼすものと考えられる。

## 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, Minamisawa S, Ishikawa S: Epac1 promotes smooth muscle cell migration via calcium/calcineurin-dependent cell polarization. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, 27th-29<sup>th</sup> 2013, March [図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 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

加藤 優子 (Yuko Kato)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究  
科・助教

研究者番号：50580875

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：