

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461128

研究課題名(和文)細胞接着分子を標的とした動脈硬化治療戦略開発のための基盤構築

研究課題名(英文) Base construction for the development of therapeutic strategies for targeting cell adhesion molecules in atherosclerosis

研究代表者

力武 良行 (Rikitake, Yoshiyuki)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50419488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化における細胞接着分子の機能と作用機構について解析し、以下の知見を得た。(1) Nectin-5は、平滑筋細胞の収縮型から合成型への脱分化、運動と増殖を促進して、総頸動脈結紮後の内膜肥厚を促進した。(2) Nectin-4は、血管内皮細胞がコンフルエントになると発現が増加し、PTPN13を介して血管内皮増殖因子受容体の自己リン酸化を抑制して、運動と増殖の接触阻害を誘導した。(3) FAM5Cは、血管内皮細胞において、炎症性刺激で増加し、活性酸素の産生亢進とNF- κ Bの活性化を介して、単球接着分子の発現を促進した。

研究成果の概要(英文)：The following findings were obtained by analyzing the functions and mode of action of cell adhesion molecules in atherosclerosis. (1) Nectin-5 facilitated dedifferentiation of smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype, cell movement and proliferation, and intimal thickening after the common carotid artery ligation. (2) Nectin-4, whose expression increased as vascular endothelial cells become confluent, induced contact inhibition of movement and proliferation by suppressing autophosphorylation of the vascular endothelial growth factor receptor via PTPN13. (3) In vascular endothelial cells FAM5C increased in response to inflammatory stimuli and promoted expression of monocyte adhesion molecules via enhanced production of reactive oxygen species and activation of NF- κ B.

研究分野：血管細胞生物学

キーワード：細胞接着分子 血管内皮細胞 シグナル伝達 内膜肥厚 血管炎症

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化はまず、血管内皮機能障害が生じ、炎症細胞が内皮下へ浸潤することにより始まる。内皮細胞間に発現する細胞接着分子は炎症細胞の内皮下への浸潤に重要な役割を果たしており、このような細胞接着分子の作用を制御できれば動脈硬化の発症と進展を抑制できる可能性も考えられる。しかし、内皮細胞間に発現する細胞接着分子を標的とした炎症細胞浸潤を阻害する治療戦略は未だ確立されていない。細胞接着分子ネクチンとその関連分子は細胞の接着、極性形成、運動、増殖、生存、分化などの高次機能を制御しているが、血管機能調節や動脈硬化における役割については不明のままである。

2. 研究の目的

血管機能調節と動脈硬化の病態形成における細胞接着分子ネクチンと構造が類似するネクチン様分子(Necl)の生理的・病態生理的機能を解明する。Necl を一つのモデルとして、心血管病における細胞接着分子の重要性を明らかにし、細胞接着分子が動脈硬化を基盤に発症する心血管病の治療標的となるか更に検討を進めるための基盤を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 内膜肥厚形成における Necl-5 の機能

- 野生型及び Necl-5 ノックアウトマウスの総頸動脈結紮後の内膜肥厚や血管壁での DNA 合成をそれぞれ、HE 染色、BrdU の取り込みにより評価した。
- 野生型及び Necl-5 ノックアウトマウスの大動脈から平滑筋細胞を初代培養し、細胞の運動と増殖、遺伝子発現、MAP キナーゼの活性化をそれぞれ、Boyden チャンバーアッセイ、細胞数の計測、real-time PCR、ウエスタンブロットにより評価した。

(2) 血管内皮細胞の運動と増殖の接触阻害における Necl-4 の機能

- ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において siRNA を用いて Necl-4 をノックダウンし、血管内皮増殖因子 (VEGF) 刺激後の細胞の運動と増殖、管腔形成、細胞内シグナルの活性化をそれぞれ、創傷治癒アッセイ、細胞数の計測、マトリゲル上でのネットワーク形成、ウエスタンブロットにより評価した。

(3) 血管炎症における FAM5C の機能

- HUVEC に FAM5C を過剰発現、もしくは、siRNA により FAM5C をノックダウンし、遺伝子発現、NF- κ B の活性化、活性酸素の産生、単球接着をそれぞれ、real-time PCR、ルシフェラーゼアッセイ、ジヒドロエチジウム染色、THP-1 を用いた接着アッセイにより評価した。

4. 研究成果

(1) 内膜肥厚形成における Necl-5 の機能

Necl-5 はマウス総頸動脈結紮後の新生内膜の平滑筋細胞で発現が増加しており、Necl-5 ノックアウトマウスでは内膜肥厚の形成が減弱し、血管壁での DNA 合成も減少していた。Necl-5 ノックアウトマウス大動脈の初代培養平滑筋細胞では、野生型マウス平滑筋細胞と比べて、MAP キナーゼの活性化が抑制されており、血管平滑筋細胞の収縮型マーカー分子の発現が増加して合成型マーカー分子の発現が減少し、細胞の運動と増殖が減弱していた。以上の結果より、Necl-5 は収縮型から合成型への脱分化を促進することにより、平滑筋細胞の運動と増殖を促進して、総頸動脈結紮後の内膜肥厚を促進することが明らかになった。

(2) 血管内皮細胞の運動と増殖の接触阻害における Necl-4 の機能

Necl-4 は HUVEC がコンフルエントになると細胞間接着部位に局在し、蛋白レベルでの発現が増加した。Necl-4 を過剰発現させると、血管内皮増殖因子 (VEGF) に応答した VEGF 受容体の自己リン酸化は抑制され、Rac1 と ERK の活性化は抑制された。その結果、HUVEC の運動と増殖は抑制された。反対に、siRNA により Necl-4 をノックダウンすると、VEGF に応答した VEGF 受容体の自己リン酸化は亢進した。Necl-4 と結合する PTPN13 をノックダウンしても、同様に VEGF に応答した VEGF 受容体の自己リン酸化は亢進し、Necl-4 と PTPN13 を同時にノックダウンしても、VEGF に応答した VEGF 受容体の自己リン酸化はそれ以上には亢進しなかった。以上の結果より、Necl-4 はコンフルエントになると発現が増加して、PTPN13 を介して VEGF 受容体の自己リン酸化を抑制し、Rac1 と ERK の活性化を抑制して、運動と増殖の接触阻害を誘導することが明らかになった。

(3) 血管炎症における FAM5C の機能

HUVEC に FAM5C を過剰発現させると、活性酸素の産生が亢進し、NF- κ B の活性化が生じた。その結果、単球接着分子の ICAM-1 や VCAM-1、E-selectin の発現が増加し、単球接着が増加した。HUVEC を炎症性サイトカインの TNF- α で刺激すると FAM5C の発現は上昇し、FAM5C のノックダウンにより、TNF- α による単球接着分子の発現増加は抑制された。以上の結果より、FAM5C は炎症性刺激で増加し、活性酸素の産生亢進と NF- κ B の活性化を介して、単球接着分子の発現に関与していることが明らかになった。

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 4 件)

<全て査読あり>

Yamana S, Tokiyama A, Mizutani K, Hirata K, Takai Y, Rikitake Y. The cell adhesion molecule Necl-4/CADM4 serves as a novel regulator for contact inhibition of cell movement and proliferation. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0124259. DOI: 10.1371/journal.pone.0124259

Terao Y, Satomi-Kobayashi S, Hirata K, Rikitake Y. Involvement of Rho-associated protein kinase (ROCK) and bone morphogenetic protein-binding endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER) in high glucose-increased alkaline phosphatase expression and activity in human coronary artery smooth muscle cells. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:104. DOI: 10.1186/s12933-015-0271-7

Sato J, Kinugasa M, Satomi-Kobayashi S, Hatakeyama K, Knox AJ, Asada Y, Wierman ME, Hirata K, Rikitake Y. Family with sequence similarity 5, member C (FAM5C) increases leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells: Implication in vascular inflammation. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e107236. DOI: 10.1371/journal.pone.0107236

Kureha F, Satomi-Kobayashi S, Kubo Y, Kinugasa M, Ishida T, Takai Y, Hirata KI, Rikitake Y. Nectin-like molecule-5 regulates intimal thickening following carotid artery ligation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(6):1206-1211. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301425

〔学会発表〕(計 10 件)

寺尾 侑也、小林 成美、平田 健一、力武 良行 血管平滑筋細胞における高グルコース誘導性のアルカリフォスファターゼ (ALP) 遺伝子発現増加および ALP 活性亢進への Rho-ROCK 経路および BMPER の関与 第 23 回日本血管生物医学会学術集会, 2015.12.11, 兵庫・神戸

Yoshiyuki Rikitake. Regulation of Angiogenesis by the Immunoglobulin-like Molecule Necl-5. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015.12.4, 兵庫・神戸

Toru Tagashira, Muneaki Miyata, Terunobu Fukuda, Shota Yamana, Ken-ichi Hirata, Yoshiyuki Rikitake. ArhGAP29, a RhoGAP, Interacts with Afadin in the Regulation of ROCK Activity, Network Formation and

Migration of Endothelial Cell. 第 79 回日本循環器学会総会・学術集会, 2015.4.25, 大阪・大阪

Shota Yamana, Amina Tokiyama, Yuya Terao, Ken-ichi Hirata, Yoshiyuki Rikitake. A Dual Role of Cell Adhesion Molecule Necl-4 in Endothelial Cells: Promotion of Migration Under Sparse Conditions and Inhibition of Proliferation Under Confluent Conditions. Scientific Sessions 2014, American Heart Association, 2014.11.17, Chicago (USA)

Yoshiyuki Rikitake. Nectin and heterotypic cell-cell adhesion. The 2014 Annual Meeting of Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2014.5.14, Seoul (Korea)

Shota Yamana, Amina Tokiyama, Mitsuo Kinugasa, Yuya Terao, Yoshimi Takai, Ken-ichi Hirata, Yoshiyuki Rikitake. Regulation of Network Formation and Migration of Vascular Endothelial Cells by Necl-4 through the PTPN13-ROCK Pathway. IVBM2014. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014.4.14-17, 京都・京都

Shota Yamana, Mitsuo Kinugasa, Yuya Terao, Ken-ichi Hirata, Yoshiyuki Rikitake. Regulation of Vascular Endothelial Cell Functions by Necl-4 through the PTPN13-ROCK Pathway. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会, 2014.3.23, 東京・東京

Mitsuo Kinugasa, Yoshiyuki Rikitake, Seimi Satomi-Kobayashi, Kinta Hatakeyama, Shota Yamana, Fumie Kureha, Junya Satoh, Yujiro Asada, Ken-ichi Hirata. Expression and pro-inflammatory functions of FAM5C, a genetic risk factor for acute myocardial infarction, in vascular endothelial cells. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会, 2014.3.21, 東京・東京

山名祥太、力武良行、高井義美、平田健一 Necl-4 による血管内皮細胞の運動と管腔形成の制御 第 43 回日本心臓血管作動物質学会, 2014.2.15, 兵庫・神戸

山名祥太、力武良行、高井義美、平田健一 Necl-4 による血管内皮細胞の運動と管腔形成の制御 第 21 回日本血管生物医学会学術集会, 2013.9.26, 大阪・豊中

〔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〕

ホームページ

http://www.med.kobe-u.ac.jp/sigtra/Signal_Transduction/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

力武 良行 (Rikitake, Yoshiyuki)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50419488

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし