

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461129

研究課題名(和文)血管内皮接着因子 JCAD が心血管病発症に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) The role of JCAD, an adhesion molecule of endothelial cell, in regulating cardiovascular disease

研究代表者

川合 宏哉 (kawai, hiroya)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20346266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) JCAD発現抑制による血管内皮細胞機能をHUVECを用いて検討した。siRNA法を用いたJCAD発現抑制によって、内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成が抑制された。すなわち、血管新生にJCADが関与していることが証明された。(2) 生体内におけるJCADの血管新生能を検証するために、野生型およびJCADノックアウトマウスの背部にメラノーマ細胞を皮下注入し、新生血管の密度を定量化したところ、JCADノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて血管新生が抑制されていた。JCADが血管の成熟とネットワーク形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cell culture experiments revealed impaired angiogenic ability (proliferation, migration, and tube formation) by the knockdown of JCAD with siRNA. We have generated mice lacking JCAD (mKIAA1462<sup>-/-</sup>) by gene-targeted deletion of JCAD to address in vivo angiogenic function. mKIAA1462<sup>-/-</sup> mice did not show morphological differences in development of retinal vasculature. Ex vivo aortic ring model demonstrated impaired neovascularization in aorta from mKIAA1462<sup>-/-</sup> mice than control wild-type mice ( $p < 0.05$ ). Tumor growth was assessed by monitoring tumor volume after the subcutaneous injection of melanoma cells into the mice. mKIAA1462<sup>-/-</sup> mice exhibited 45% smaller tumor volume compared with wild-type mice ( $p < 0.001$ ). Histological assessment of the tumor exhibited less smooth muscle actin (SMA)-positive neovascularization determined by CD31 staining in tumor of mKIAA1462<sup>-/-</sup> mice than wild-type mice, indicating that knockdown of JCAD inhibited the vascular maturation in angiogenic process.

研究分野：循環器内科

キーワード：JCAD

## 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子解析に基づいた新規心血管病関連遺伝子の検索が広く行われている。いくつかの候補遺伝子において、より詳細な基礎研究が進んでおり、心血管病の機序解明や新規治療法開発が進行している。JCAD (junctional protein associated with coronary artery disease)(旧名 KIAA1462) は、近年ゲノムワイド関連研究にて、冠動脈疾患と強い相関を示すことが報告された細胞接着制御因子の一つである(Nature Genetics 2011)。JCAD は、血管内皮細胞に特異的に発現しており、細胞間接着装置の中でも特に adherens junction(AJ)に局在することが報告されている。AJ に局在する代表的な細胞接着分子として VE-cadherin があるが、VE-cadherin は、アクチンフィラメントの制御や VEGFR-2、RPTP- $\mu$  を介する細胞内シグナル伝達にも関与しており、血管の整合性や構造制御に重要な役割を果たしている。JCAD は、血管内皮間隙においてこの VE-cadherin と同部位に存在していることが報告されている(Akashi, BBRC 2011)。しかしながら、JCAD の血管内皮機能に与える影響については、全く解明されていない。

## 2. 研究の目的

高齢化社会に伴って心血管疾患(虚血性心疾患、心不全)患者が増加している。心血管疾患の機序解明や新規治療法開発は重要な課題である。動脈硬化性疾患は、血管内膜の表層に存在する血管内皮細胞の機能障害から発症する。血管内皮細胞は、細胞間接着因子により、その機能、構造が制御されている。近年、発見された Junctional protein associated with coronary artery disease は、血管内皮細胞の細胞間に局在する新規の分子であり、ヒトゲノムワイド関連研究にて、JCAD の一塩基多型は冠動脈疾患や心筋梗塞と有意な相関を示していた。しかし、JCAD

の心血管病発症、進展における機序は明らかではない。本研究では、基礎研究および臨床研究を駆使して、JCAD の心血管疾患における役割を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) JCAD 発現抑制による血管内皮細胞機能の検討(in vitro)

血管内皮細胞は、バリア機能を有しており、炎症細胞や炎症刺激が血管内へ進行することを制御しており、この制御機能の破綻により動脈硬化、心不全が発症する。ヒト由来の血管内皮細胞である HUVEC に siRNA 法を用いた JCAD 発現抑制または JCAD の過剰発現を行い、血管内皮機能に与える JCAD の影響を検証する。

- a) JCAD 発現阻害による血管内皮細胞増殖能の検討
- b) JCAD 発現阻害による血管内皮透過性の検証
- c) JCAD 発現阻害による血管内皮と単球接着、遊走に関する検証
- d) JCAD 発現阻害による炎症性サイトカインや酸化 LDL 刺激の炎症性マーカーの発現レベルの検証
- d) JCAD 発現阻害・過剰発現による細胞骨格の変化の検討

(2) JCAD による動脈硬化発症機序について JCAD 欠損マウスと動脈硬化モデルマウス apoE 欠損マウスを交叉交配し、JCAD/apoE ダブル欠損マウスを作成する。JCAD 欠損による動脈硬化進展への影響を検証する。並行して、培養血管内皮細胞を用い、siRNA 法にて JCAD 発現を抑制し、血管内皮機能における JCAD の役割を検討する。

(3) JCAD の生体内での血管新生の役割を明らかにするため、野生型および JCAD ノックアウトマウスの背部にメラノーマ細胞を皮下注入し、メラノーマ腫瘍内部に侵入してくる血管内皮細胞量によって新生血管の密度を定量化を行う。

#### 4. 研究成果

(1) JCAD 発現抑制による血管内皮細胞機能の検討： ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に、siRNA 法を用いた JCAD 発現抑制(ノックダウン)を行い、細胞機能に与える JCAD の影響を検証した。まず、HUVEC においてウェスタン法により JCAD ノックダウンが確認できた。JCAD ノックダウンされた HUVEC は、細胞増殖能が低下していた。また、マトリゲルをコートした培養ディッシュ上での in vitro の管腔形成能も低下していた。さらに、細胞遊走能力が低下していた。以上より、JCAD は内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成に関与していることが示され、生体内では血管新生や動脈硬化などに関与することが示唆された。

(2) JCAD ノックアウトマウスを動脈硬化モデルであるアポE ノックアウトマウスと交叉交配し、JCAD とアポE のダブルノックアウトマウスを作成するのに、繁殖能が予想以上に低く、時間を要した。現在、ようやく解析必要数を確保できたため、ダブルノックアウトマウスと対照マウスの動脈硬化病変を現在検討中である。

(3) 生体内での JCAD の機能を明らかにするため、マウスを用いて血管新生を評価した。野生型および JCAD ノックアウトマウスの背部にメラノーマ細胞を皮下注入し、メラノーマ腫瘍内部に侵入してくる血管内皮細胞量によって新生血管の密度を定量化したところ、JCAD ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて血管新生が抑制されていた。とくに、JCAD ノックアウトマウスでは血管の内腔や分岐が障害されていることから、JCAD が血管の成熟とネットワーク形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 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 7件)

(1) Nagao M, Toh R, Irino Y, Mori T, Nakajima H, Hara T, Honjo T, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Hirata K. -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, in press.

(2) Kondo K, Toh R, Ishida T, Mori K, Yasuda T, Hirata K. Comparison of telmisartan/amlodipine and telmisartan/hydrochlorothiazide in the treatment of Japanese patients with uncontrolled hypertension: the TAT-Kobe study. *Blood Press Monit.* 2016 Jun;21(3):171-7.

(3) Mori K, Ishida T, Yasuda T, Hasokawa M, Monguchi T, Sasaki M, Kondo K, Nakajima H, Shinohara M, Shinke T, Irino Y, Toh R, Nishimura K, Hirata K. Serum Trans-Fatty Acid Concentration Is Elevated in Young Patients With Coronary Artery Disease in Japan. *Circ J.* 2015;79(9):2017-25.

(4) Kondo K, Ishida T, Yasuda T, Nakajima H, Mori K, Tanaka N, Mori T, Monguchi T, Shinohara M, Irino Y, Toh R, Rikitake Y, Kiyomizu K, Tomiyama Y, Yamamoto J, Hirata K. Trans-fatty acid promotes thrombus formation in mice by aggravating antithrombogenic endothelial functions via Toll-like receptors. *Mol Nutr Food Res.* 2015 Apr;59(4):729-40.

(5) Tanaka N, Ishida T, Nagao M, Mori T, Monguchi T, Sasaki M, Mori K, Kondo K, Nakajima H, Honjo T, Irino Y, Toh R, Shinohara M, Hirata K. Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of

high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia. Atherosclerosis. 2014 Dec;237(2):577-83.

(6) Haraguchi Y, Toh R, Hasokawa M, Nakajima H, Honjo T, Otsui K, Mori K, Miyamoto-Sasaki M, Shinohara M, Nishimura K, Ishida T, Hirata K. Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. Atherosclerosis. 2014 Jun;234(2):288-94.

(7) Sun L, Ishida T, Miyashita K, Kinoshita N, Mori K, Yasuda T, Toh R, Nakajima K, Imamura S, Hirata K. Plasma activity of endothelial lipase impacts high-density lipoprotein metabolism and coronary risk factors in humans. J Atheroscler Thromb. 2014;21(4):313-21.

〔学会発表〕(計 5件)

- (1) Harada A, Ishida T et al. Cholesterol Uptake Capacity, a New Measure for High-Density Lipoprotein Functionality and Its Association with Incident Cardiovascular Events 日本循環器学会総会 3月17日、2016年、仙台国際センター(宮城)
- (2) Hara T, Ishida T et al. Disruption of JCAD/KIAA1462, a Coronary Artery Disease-associated Gene Product, Inhibits Angiogenic Processes in Vitro and in Vivo. 日本循環器学会総会 3月17日、2016年、仙台国際センター(宮城)
- (3) Nagao M, Toh R, Ishida T et al. Elevated  $\beta$ -hydroxybutyrate Due to Downregulation of SCOT Exerts

Cardioprotective Effects in Failing Hearts 日本循環器学会総会 3月18日、2016年、仙台国際センター(宮城)

- (4) Oshita T, Ishida T et al. Endothelial Lipase Regulates Plasma HDL-C Concentration without Affecting Cholesterol Uptake Capacity of HDL Particle in Patients with Coronary Artery Disease 日本循環器学会総会 3月18日、2016年、仙台国際センター(宮城)
- (5) Tsuda Y, Ishida T et al. High Density Lipoproteins from Coronary Artery Disease Patients Contribute to Inflammatory-prone Lipid Mediator Productions 日本循環器学会総会 3月18日、2016年、仙台国際センター(宮城)

〔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〕  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者  
川合宏哉 (KAWAI HIROYA)  
神戸大学, 医学研究科, 客員教授  
研究者番号: 20346266

(2)研究分担者  
石田達郎 (ISHIDA TATSUEO)  
神戸大学, 医学研究科, 特命教授  
研究者番号: 00379413

(3)連携研究者  
杜隆嗣 (TOH RYUJI)  
神戸大学, 医学研究科, 特命准教授  
研究者番号: 50379418