

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860588

研究課題名(和文) TGF- β 1誘導性分子Hic-5を標的とした大動脈瘤の治療へ向けた基礎研究

研究課題名(英文) Roles of hydrogen peroxide-induced clone 5 in pathogenesis of thoracic aortic aneurysm in marfan syndrom

研究代表者

雷 小峰 (Lei, Xiao Feng)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：00595069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマウス腹部大動脈瘤モデルにおいて、Hic-5欠損により腹部大動脈瘤の形成および動脈瘤破裂による死亡をほぼ完全に抑制できることを見出した。本研究では詳細な分子メカニズムの解析と共に、胸部大動脈瘤発症を伴う代表的先天性疾患であるマルファン症候群へのHic-5の関与を検討した。Hic-5欠損によりマルファン症候群の胸部大動脈瘤拡張の増加が顕著に見られた。メカニズムではHic-5が血管平滑筋細胞内TGF- β 1シグナルであるSmad2/3シグナルを介して血管組織のリモデリングを制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We reported that Hic-5 deficiency resulted in the effective suppression of abdominal aortic aneurysms (AAA) in an animal model. However the role of Hic-5 in thoracic aortic aneurysms (TAA) has not yet been explored. The most common familial TAA is Marfan syndrome (MFS). In this study, we used a murine model of MFS (Fbn1C1039G/+) to generate an MFS murine model in combination with genetic Hic-5 deletion. Fbn1C1039G+/Hic-5-/- mice displayed more severe dilation of TAA compared with Fbn1C1039G/+ mice. The mRNA and protein expression of several mediators of aortic remodeling, including MMP-2, collagen and elastin, was markedly reduced in the aorta and cultured VSMC from Fbn1C1039G+/Hic-5-/- mice relative to Fbn1C1039G/+ mice. These results suggest that Hic-5 contributes to extracellular matrix (ECM) synthesis and degradation. Aortic aneurysm is the outcome of the unbalance between ECM synthesis and degradation. The TAA formation in MFS could be more susceptible to defect in ECM synthesis.

研究分野：血管生物学

キーワード：大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

Hic-5 (hydrogen peroxide-inducible clone-5, 別名: Tgfb1i1: TGF- β 1-inducible transcript-1) は、1994年に過酸化水素と TGF- β 1 に応答し発現誘導される遺伝子としてクローニングされた。この分子は細胞外マトリックス (ECM) と細胞の接着点にある細胞接着斑タンパク質である。Hic-5 欠損マウスはメンデルイズムに従って誕生し、発育、生殖能は共に正常であった。しかし申請者は、マウス腹部大動脈瘤モデルにおいて、Hic-5 欠損により腹部大動脈瘤の形成および動脈瘤破裂による死亡をほぼ完全に抑制できることを見出した (Lei XF. et al. J Am Heart Assoc. 3(3):e000747; 2014.)。この現象は、平滑筋細胞特異的な Hic-5 コンディショナルターゲットマウス (SMMHC-CreER Tg) においても再現され、平滑筋細胞内の Hic-5 が動脈瘤発症に重要であることを示した。またその分子メカニズムとして、Hic-5 が JNK2-MKK4 間のリン酸化反応の scaffold (足場) として機能し、下流の MMP2 や MMP14 の発現抑制を介して ECM のリモデリングを抑制した結果、動脈瘤の発症を抑制したことを明らかにした。

大動脈瘤は病変部位に炎症細胞の浸潤、ECM 分解亢進の組織特徴を示す血管疾患である。その形成過程では様々な分子作用が制御され、特に活性酸素種が病変部で著明に増加し、動脈瘤形成に深く関与することがよく知られている。本疾患のリスク因子である高血圧や動脈硬化が近年、高齢化とともに増加傾向にあることを考えると、本疾患は今後さらに増え続けることが予想される。よって大動脈瘤、大動脈解離は心臓血管領域の臨床、研究の双方における最重要課題の一つであり、動脈瘤の発症メカニズムを分子レベルで明らかにし治療ターゲットを確立させる必要性と緊急性がある。

2. 研究の目的

大動脈瘤発症を伴う代表的先天性疾患であるマルファン症候群 (MFS) は現在、国の難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されており、我が国の患者数は推定約 2 万人である。しかし MFS の有効な内科治療法は確立されていない。2013 年 6 月にヨーロッパでアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ロサルタン) の臨床治験が行われたが、コントロール群に対して僅か 2 割の症例で大動脈瘤拡張抑制が認められたに過ぎず (Eur Heart J. 2013) より有効な治療ターゲット分子を提唱する必要性が高まっている。興味深いことに近年 MFS 患者や MFS モデルマウスの血中 TGF- β 1 濃度上昇が報告され、さらに細胞内 TGF- β 1 シグナルである Smad2/3 シグナルおよび JNK などの MAP kinase シグナルを介する経路の存在が明らかにされた。このことから細胞内 TGF- β 1 誘導性分子である Hic-5 の MFS 動脈瘤発症への積極的な関

与を想定し、新規 MFS 治療標的分子としての可能性も同時に探る。

3. 研究の方法

(1). Hic-5 欠損 MFS モデルマウスの作製と表現型解析: マウス個体レベルでの解析: MFS モデルマウスである B6.129-Fbn1^{tm1Hcd/J} を用い、Fbn1^{tm1Hcd} 背景化した hic-5^{+/+} (Fbn1^{C1039G/+}/hic-5^{+/+}) および hic-5^{-/-} (Fbn1^{C1039G/+}/hic-5^{-/-}) マウスラインを確立する。8 週目から、定期的に MRI でマウス大動脈基部、上行弓部の直径を定量、評価する。同時に心臓の大きさやマウス全身骨格比較を MRI および CT を用いて評価する。

(2). 臓器・組織レベルでの解析: Hic-5 欠損 MFS モデルマウスで観察される表現型の変化に関して、次にマクロ像および組織学的解析を行う。具体的には、大動脈、心臓の大きさ及び重量を観察する。組織学的に EVG 染色で弾性線維損傷度により大動脈瘤形成度を評価する。同時に免疫組織染色法により血管壁構成細胞のアポトーシス頻度、集約している炎症性細胞量 (CD45+ 細胞)、マクロファージ量、血管中膜平滑筋細胞分化マーカー及び血管壁 MMP2, MT1MMP の発現量などを検討する。

(3). 細胞レベルでの細胞生物学的、分子生物学的解析: これまでの Hic-5 と動脈瘤の解析から、病因細胞は平滑筋細胞である可能性が非常に高い。そこでマウスより分離した初代培養細胞血管平滑筋細胞を用いて、個体、組織レベルで見られた変化に関して、細胞レベルでの検証を行う (MMP 活性、TGF- β 発現量等)。さらにその分子機構について、これまでの知見に基づき核での機能および細胞内シグナル経路を介したメカニズムの両方を想定に入れ実験を行う

4. 研究成果

(1). Hic-5 欠損 MFS モデルマウスにおいて、Hic-5 欠損により胸部大動脈瘤の形成が促進された。また、大動脈上行部の直径定量評価では Hic-5 欠損により顕著な拡張が見られた。

(2). 組織を解析したところ、Hic-5 欠損により病変に集約した炎症細胞やサイトカイン、TGF- β 発現量等には明らかな変化がないが、コラーゲン、弾性線維、MMP2 の発現量が顕著に減少した。

(3). 単離培養した血管平滑筋細胞を用いた検討からも、組織解析と同様な結果が得られた。

(4). 細胞内シグナルでは Hic-5 が細胞内 TGF- β 1 シグナルである Smad2/3 シグナルに関与していることを見出した。

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 9 件)

1. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Functional heterogeneity of NADPH oxidases in atherosclerotic and aneurysmal diseases. *J Atheroscler Thromb.* 24(1):1-13. 2017. 査読有り
2. Miyazaki T, Tonami K, Hata S, Aiuchi T, Ohnishi K, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Takeya M, Itabe H, Sorimachi H, Kurihara H, Miyazaki A. Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J Clin Invest.* 126(9):3417-32; 2016. 査読有り
3. Shimabukuro M, Okawa C, Yamada H, Yanagi S, Uematsu E, Sugasawa N, Kurobe H, Hirata Y, Kim-kaneyama JR, Lei XF, Takao S, Tanaka Y, Fukuda D, Yagi S, Soeki T, Kitagawa T, Masuzaki H, Sato M, Sata M. Thpathophysiological role of oxidized cholesterols in epicardial fat accumulation and cardiac dysfunction: A study in swine fed a high caloric diet with an inhibitor of intestinal cholesterol absorption, ezetimibe. *J Nutr Biochem.* 35:66-73; 2016. 査読有り
4. Lei XF, Fu W, Kim-Kaneyama JR, Omoto T, Miyazaki T, Li B, Miyazaki A. Hic-5 deficiency attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through upregulation of Smad7 in mice. *J Hepatol.* 64(1):110-7; 2016
5. Miyazaki T, Taketomi Y, Saito Y, Hosono T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Takahashi H, Murakami M, Miyazaki A. Calpastatin Counteracts Pathological Angiogenesis by Inhibiting Suppressor of Cytokine Signaling 3 Degradation in Vascular Endothelial Cells. *Circ Res.* 116(7):1170-81; 2015. 査読有り
6. Arita-Okubo S, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Fu WG, Ohnishi K, Takeya M, Miyauchi A, Honda H, Itabe H, Miyazaki T, Miyazaki A. Role of Hic-5 in the formation of microvilli-like structures and the monocyte-endothelial interaction that accelerates atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 105(3):361-71; 2015. 査読有り
7. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Nakamachi T, Oguchi T, Kim-Kaneyama JR, Taniyama M, Tsunawaki S, Shioda S, Miyazaki A. NADPH oxidase deficiency exacerbates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(11):2413-20; 2014. 査読有り
8. Sakashita N, Lei XF, Kamikawa M, Nishitsuji K. Role of ACAT1-positive late endosomes in macrophages: cholesterol metabolism and therapeutic applications for Niemann-Pick disease type C. *J Med Invest.* 61(3-4):270-7; 2014. 査読有り
9. Kamikawa M, Lei XF, Fujiwara Y, Nishitsuji K, Mizuta H, Takeya M, Sakashita N. ACAT1-associated Late Endosomes/Lysosomes Significantly Improve Impaired Intracellular Cholesterol Metabolism and the Survival of Niemann-Pick Type C Mice. *Acta Histochem Cytochem.* 47(2):35-43; 2014. 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Roles of hydrogen peroxide-inducible clone 5 in pathogenesis of thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. 19th International Vascular Biology Meeting 2016年10月30日~11月3日 (Boston, USA.)
2. Shigeko Okubo-Arita, Joo-ri Kim-Kaneyama, Xiao-Feng Lei, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Role of Hic-5 in the formation of microvilli-like structures and the monocyte-endothelial interaction that accelerates atherosclerosis 第48回日本動脈硬化学会学術集会 2016年7月14日~15日 (東京)

3. 宮崎拓郎、雷小峰、金山朱里 宮崎章。カルパイン-6 は mRNA の成熟不全を介してマクロファージ LDL 取り込みを促進する。第 58 回 日本脂質生化学会 2016 年 6 月 9 日～10 日 (秋田)
4. 雷小峰、金山朱里、宮崎章。肝線維化における TGF-beta 関連遺伝子 Hic-5 の機能解析 第 52 回日本肝臓学会総会 平成 28 年 5 月 19 日～20 日 (千葉)
5. 宮崎拓郎、武富芳隆、雷小峰、金山朱里、村上 誠、宮崎 章。カルパインシステムによる JAK/STAT 経路依存的な病的血管新生の制御第 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 年 12 月 1 日～4 日 (神戸)
6. Xiao-Feng Lei, Wenguang Fu, JR Kim-Kaneyama, Akira Miyazaki. Hic-5 deficiency attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through upregulation of Smad7 in mice. 18th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CELLS OF THE HEPATIC SINUSOID 2015 年 11 月 11 日～13 日 (Asilomar, USA.)
7. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, Nakamachi T, Oguchi T, Kim-Kaneyama JR, Taniyama M, Tsunawaki S, Shioda S, Miyazaki A. NADPH Oxidase Deficiency Exacerbates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic aneurysms in Mice 第 47 回日本動脈硬化学会学術集会 平成 27 年 7 月 9 日～10 日 (仙台)
8. 宮崎拓郎 雷小峰 金山朱里 宮崎章。カルパインシステムによる JAK/STAT 経路依存的な病的血管新生の制御 第 47 回日本動脈硬化学会学術集会 平成 27 年 7 月 9 日～10 日 (仙台)
9. 雷小峰、付文広、金山朱里、大久保茂子、宮崎拓郎、宮崎章。肝線維化における TGF-beta 誘導分子 Hic-5 の機能解析 第 47 回日本結合組織学会学術大会 平成 27 年 5 月 15 日～16 日 (東京)
10. Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Shigeiko Arita, Stefan Offermanns,

Hiroyuki Itabe, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Identification of Hic-5 as a novel scaffold for the MKK4/p54 JNK pathway in the development of abdominal aortic aneurysms. The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 年 4 月 16 日～17 日. (京都)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

http://www10.showa-u.ac.jp/~biochem/Biochem/Biochem_top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雷 小峰 (Xiao-Feng Lei)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：00595069

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

