

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

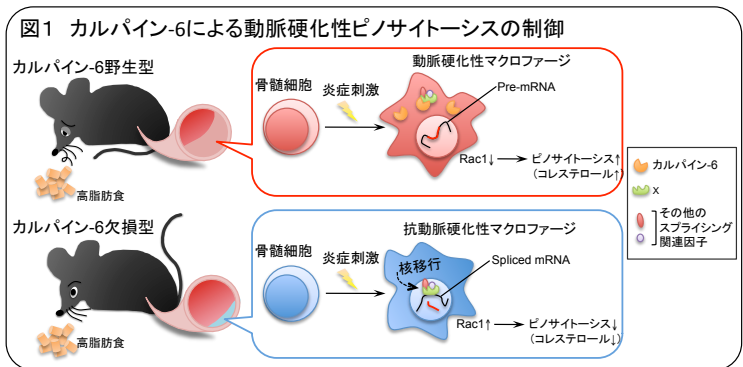
所 属	昭和大学医学部生化学講座
氏 名	宮崎 拓郎
研究テーマ	動脈硬化症における組織特異的カルパインの役割

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

【研究目的および手法】カルパインは細胞内に局在する Ca^{2+} 感受性プロテアーゼで、ターゲットとなる機能分子を切断することで炎症応答や細胞動態を調節する。同分子は15種のホモログならびに内因性阻害因子カルパスタチンからなるスーパーファミリーを形成するが、近年、申請者らは血管内皮細胞の m-カルパインアイソザイムが動脈硬化促進因子として働くことを明らかとした (Miyazaki T *et al.*, *Circulation*, 2011)。本研究では、動脈硬化症におけるカルパインネットワークの全容解明を目的とし、残るカルパインアイソザイム(組織特異的カルパイン)の役割【成果(1)】、ならびに、カルパインシステムが血管内皮細胞の機能制御に及ぼす影響【成果(2)】について、主として遺伝子改変動物の表現型解析を通して検討した。

【成果(1)】動脈硬化症における組織特異的カルパインアイソザイムの役割

動脈硬化モデルマウス (LDL 受容体欠損マウス) において網羅的発現解析を行ったところ、大動脈のカルパイン-6 および-9 の発現が動脈硬化発症に伴い増加した。同モデルマウスにおいてカルパイン-6 の欠損により動脈硬化症が抑制されたが、カルパイン-9 の欠損は病態に影響を及ぼさなかった。カルパイン-6 は動脈硬化病変の泡沫化マクロファージにて局在が確認され、骨髄移植実験においてはマクロファージの起源となる骨髄細胞のカルパイン-6 発現のみで病態が制御されることを見いだした。骨髄由来マクロファージを単離解析したところ、炎症性刺激で発現誘導されるカルパイン-6 はマクロファージ内でスプライシング関連因子 X (仮称) の核移行を妨げ、*Rac1* 遺伝子のスプライシングを抑制し、その結果ピノサイトーシスを介した native LDL 取り込みを促進することが明らかとなった。カルパイン-6 はプロテアーゼ活性を持たない亜種であるが、カルパイン-6 と X の物理的結合がこのような表現型を引き起こす (図1 参照)。また、グレードの高いヒト動脈硬化病変においても、カルパイン-6 が泡沫化マクロファージに局在し、X の核移行が低下することを明らかとした。したがって、カルパイン-6 の阻害ならびに X の機能の正常化によりピノサイトーシスを介したマクロファージ泡沫化は抑制可能で、これは動脈硬化症に対する極めてユニークな介入方法と期待される。



【成果(2)】血管内皮細胞におけるカルパインシステムの意義 (Miyazaki T *et al.*, *Circ Res*, 2015)

近年動脈硬化症に対する病的血管新生の関与が指摘されている。血管内皮細胞の機能制御にカルパインシステムが如何なる役割を担うか血管内皮細胞特異的カルパスタチン Tg マウスを用いて検証し、次のように同システムが病的血管新生に関与する可能性を見出した。

- ・ ヒト腫瘍、マウス担癌モデルおよび酸素誘発性網膜症モデルにおいて認められる病的新生血管において、内因性阻害因子カルパスタチンが下方制御され、カルパインが活性化される。
- ・ カルパインは JAK/STAT 回路を介して VEGF-C の分泌を促進する。
- ・ 血管内皮細胞における VEGF-C オートクラインループにより、上記モデルマウスの病的血管新生は促進されるが、これは血管内皮特異的カルパスタチン Tg により抑制された。

本結果は、カルパインシステムの抑制が動脈硬化症において多面的な治療効果をもたらす優れた戦略である可能性を示している。

様式 4-2②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2015. 8	第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (招待講演). <u>宮崎拓郎</u> . カルパインシステムによる血管系疾患の制御.
2	2015. 8	第 16 回 Atherosclerosis and Biolipid Conference (招待講演). <u>宮崎拓郎</u> : カルパインシステムによる血管系疾患の制御.
3	2015. 7	第 47 回日本動脈硬化学会学術集会. <u>宮崎拓郎</u> ・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. (本演題にて優秀ポスター賞を受賞)
4	2015. 7	第 47 回日本動脈硬化学会学術集会. 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. (本演題にて筆頭著者が若手研究者奨励賞優秀賞を受賞)
5	2015. 5	XVII International Symposium on Atherosclerosis. <u>Miyazaki T</u> , 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 signalling 3 degradation in vascular endothelial cells.
6	2014. 7	第 46 回日本動脈硬化学会学術集会. <u>宮崎拓郎</u> ・宮崎章. Down-regulation of calpastatin in vascular endothelial cells confers immature and inflammatory properties to pathological neovessels.
7	2014. 4	The 18th International Vascular Biology Meeting. <u>Miyazaki T</u> , Taketomi Y, Hosono T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Murakami M, Miyazaki A. VEGF-induced down-regulation of calpastatin in vascular endothelial cells confers destabilized and pro-inflammatory properties to pathological neovessels.
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	投稿中	Kigawa Y, <u>Miyazaki T</u> (責任著者), Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Functional heterogeneity of NADPH oxidases in atherosclerotic diseases (総説) を Journal of Atherosclerosis and Thrombosis に投稿中
2	本年内を予定	カルパイン-6 に関する原著論文「Calpain-6 disturbs post-transcriptional regulation of low-density lipoprotein handling in pro-atherogenic macrophages (仮題)」を投稿予定
3	2016. 2	第 45 回日本心脈管作動物質学会にて研究成果を発表予定 (招待講演)