

研究助成 2016—生活習慣病領域—

研究成果報告書 〈概要〉

所属	神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 循環器内科学分野
氏名	原 哲也
研究テーマ	新規の血管内皮接着因子、JCAD の血管新生と冠動脈疾患発症の制御機構の解明
研究テーマ (変更後)	研究テーマを大幅に変更した場合は最新のものを記載してください。

概要の構成は自由ですが、研究目的、研究手法、研究成果などを1ページでまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)なお、応募時の研究テーマ(研究計画・内容)を大幅に変更した場合には、研究成果報告書〈概要〉に①研究計画・内容を大幅に変更した理由、②変更後の計画を推進する意義を記載してください。

(背景)

近年のヒトゲノムワイド関連研究(GWAS)により、冠動脈疾患と心筋梗塞に臨床的に関連する新規の因子として、JCAD(旧名 KIAA1462) が同定された(Nat Genet. 2011, Eur Heart J. 2011)。それゆえ、この JCAD 分子の機能を制御することは新規の冠動脈疾患の予防、治療戦略として、非常に期待できるアプローチである。しかしながら、JCAD の生理的機能や、動脈硬化の発症を制御する分子メカニズムは、全く解明されていない。

これらヒトゲノムワイド関連研究と同時に神戸大学細胞生物学の古瀬研究室も新規の接着因子の同定という培養細胞を用いたアプローチから独自に JCAD を同定した(Biochem Biophys Res Commun. 2011)。その中で、JCAD は血管内皮細胞の細胞間接着部位に局在し、その発現は VE-Cadherin に依存することが報告されている(図1)。VE-Cadherin は 血管新生において非常に重要な役割を持つ(Development. 1999)ことから、JCAD も血管新生に関与している可能性が高い。

一方、血管新生は動脈硬化の進展や、動脈硬化プラークの不安定性に重要な役割を果たしている(Circulation. 2004, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005)。Vasa Vasorum という血管周囲の微小血管が、動脈硬化プラーク内へ血管新生により進展し(図2、次頁)、プラーク内への炎症細胞浸潤や、プラーク内出血の原因になることが報告されている。

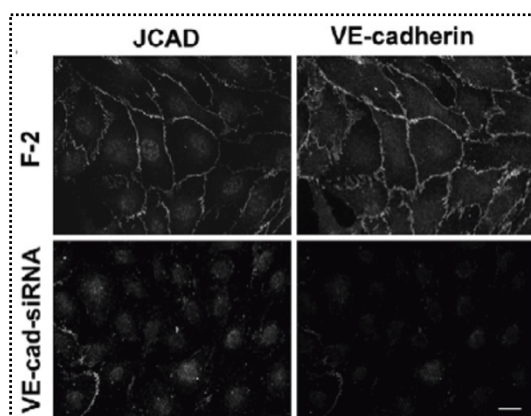


図1) JCAD は、血管内皮細胞の adherens junction に存在し、その発現は、VE-cadherin の存在に依存している。(BBRC 2011)

(目的、方法)

以上のことから、JCAD は血管新生を制御することにより、動脈硬化病変の進展や不安定性に影響することが考えられる。これを明らかにするために古瀬研究室との共同研究として、以下の研究を行う。

1. 培養血管内皮細胞に JCAD の発現を siRNA 等によりノックダウンないし過剰発現させ、tube formation 等の血管新生能を in vitro で明らかにする。
2. JCAD ノックアウトマウスの aorta を用いた ring assay や tumor growth model により、in vivo における JCAD の血管新生への影響を明らかにする。
3. JCAD/ApoE ダブルノックアウトマウスを作成し、vaso vasorum の変化や、動脈硬化プラークの量や不安定性を病理学的に解析し、JCAD の動脈硬化への影響を明らかにする。

研究助成 2016—生活習慣病領域—

研究成果報告書 <詳細>

所属	神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 循環器内科学分野
氏名	原 哲也
研究テーマ	新規の血管内皮接着因子、JCAD の血管新生と冠動脈疾患発症の制御機構の解明

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

1. 背景・目的

虚血性心疾患の増加に伴い、その機序解明や新規治療法開発は重要な課題である。そのような中で、近年のヒトゲノムワイド関連研究により新たに冠動脈疾患や心筋梗塞と有意な相関がある分子として、JCAD(Junctional protein associated with Coronary Artery Disease, 旧名 KIAA1462)が同定された(Nat Genet. 2011, Eur Heart J. 2011)。これは JCAD 分子の機能的異常が虚血性心疾患、特に心筋梗塞の発症を引き起こす原因の一つであることを強く示唆している。それゆえ、この JCAD 分子の機能を制御する、という治療戦略は、新たな虚血性心疾患の予防、治療法として非常に期待できる新しいアプローチである。この JCAD 分子の機能を制御するためには、その生理的機能や動脈硬化発症への分子機構が既知でなければならないが、残念ながら、ほとんど明らかにされていない。

このヒトゲノムワイド関連研究と同時期に神戸大学の古瀬研究室から、新規接着因子の同定という、培養細胞を用いた異なるアプローチでも JCAD が同定された(Biochem Biophys Res Commun. 2011)。この報告では(i)JCAD の遺伝子配列や、(ii)JCAD が VE-Cadherin と共局在し、その発現も VE-Cadherin 依存性であることが報告されている(図 1、前頁)。VE-Cadherin は、血管新生において非常に重要な役割を持ち、VE-Cadherin ノックアウトマウスは胎生致死となる(Development. 1999)ことから、JCAD は生後の病的な血管新生の制御、調節をしている、という着想を得た。実際に、古瀬研究室ではすでに JCAD ノックアウトマウスの作成に成功しているが、野生型マウスと同様に繁殖し、肉眼的な奇形などはなかった(未発表データ)。これは、JCAD は血管発生(Vasculogenesis)ではなく、病的血管新生(Angiogenesis)を制御する、という我々の仮説を支持している。

一方、血管新生は動脈硬化の進展や、動脈硬化プラークの不安定性に重要な役割を果たしていることが知られている(Circulation. 2004, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005)。Vasa Vasorum という血管周囲の微小血管が、動脈硬化プラーク内へ血管新生により進展し(図2)、プラーク内への炎症細胞浸潤や、プラーク内出血の原因になることが報告されている。

VE-Cadherin は膜貫通蛋白であるが、一方、JCAD 蛋白は膜貫通ドメインを持たず、細胞膜上には発現しない。それゆえ、JCAD は VE-Cadherin の機能を制御している裏打ち蛋白ではないかと着想し、細胞外部からの血管新生刺激を感知した VE-Cadherin が細胞内にシグナルを伝達する際に、この JCAD が何らかの役割を果たし、生後の病的な血管新生の制御を介して、冠動脈疾患、特に心筋梗塞の発症の原因となる、という仮説をたて、これを証明するために以下の in vivo in vitro の実験系を駆使した次頁以下の研究計画を建てた。

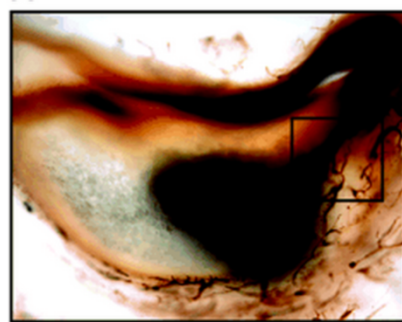


図2) プラーク内への血管新生
(ATVB.2005より引用)

2. 研究方法・結果

(A) in vitro の培養血管内皮細胞を用いた JCAD の血管新生の役割の解明

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対して siRNA や transfection 法を用いた JCAD のノックダウンや過剰発現を誘導し、(1)WST-1 アッセイによる細胞増殖能、(2)wound healing model による細胞遊走能、(3)tube formation による血管新生能を比較検討し、JCAD は血管新生を制御していることを明らかにする。

結果、ヒト JCAD の siRNA による特異的ノックダウンにより、これら細胞増殖能、遊走能、血管新生能が低下することが明らかとなった(図3)

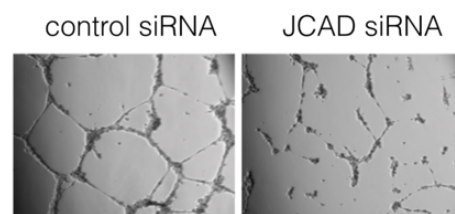


図3) JCAD特異的ノックダウンによるtube formationの低下

(B-1) JCAD ノックアウトマウスの生理的脈管形成への影響

我々と共同研究者が作成した JCAD ノックアウトマウスであるが、少なくとも胎生致死はおこらず、肉眼上は野生型と変化を認めなかった。より詳細に検討するために、主要臓器を組織学的に比較検討する。生理的な血管発生には異常がないことを確認するために、マウス網膜血管の解剖を FITC の静脈投与後の摘出眼球において組織学的に明らかにする。

結果、マウス網膜血管において明らかな差異は認めなかった(図4)。

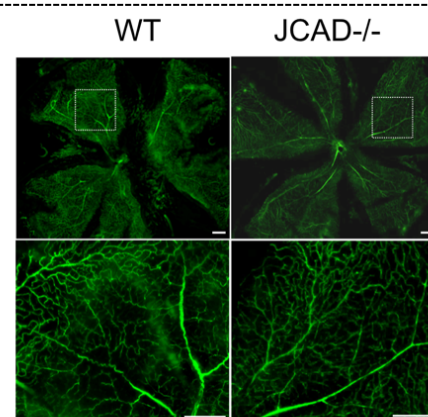


図4) 網膜血管には差を認めない

(B-2) ex vivo aortic ring assay による ex vivo での血管新生能

JCAD ノックアウトマウスと野生型マウスの大動脈を摘出し、マトリゲル上で培養する。それによって大動脈より発生する血管新生を組織学的、及びマトリゲル内のヘモグロビン量によって、ex vivo での血管新生能を比較検討する。

結果、JCAD ノックアウトマウスの組織では ex vivo において血管新生能が低下していることが明らかとなった(図5)。

(B-3) tumor growth model による生体内での腫瘍血管新生能

JCAD ノックアウトマウスと野生型マウスに対してメラノーマ細胞 (B16F10) 及び肺腺癌細胞株 (LL/2) を皮下注射し、その増殖を経時的に 2 日毎に観察し、その増殖速度を比較する。2 週間後に安楽死させ、腫瘍組織を取り出し、血管内皮細胞のマーカーである CD31 染色によって腫瘍内の血管新生の程度を評価する。新生血管の成熟度を比較するために、SMA (α 平滑筋アクチン) との二重染色も行い、SMA を伴わない未熟な血管新生の割合も比較検討する。

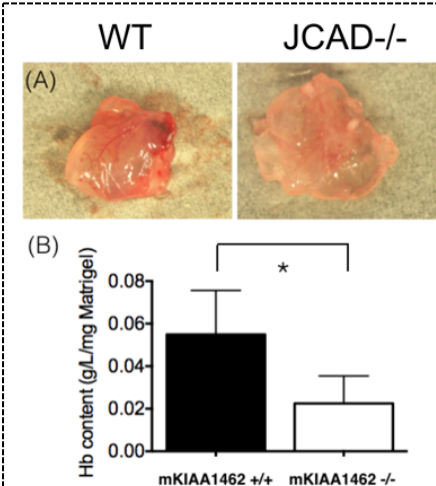


図5) ex vivo angiogenesis

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

結果、JCAD ノックアウトマウスに投与したメラノーマ癌細胞の増殖は野生型マウスと比較して有意に低下していた。組織学的により詳細に検討すると、CD31 陽性の新生血管が低下しており、さらにその成熟度のマーカーである SMA 陽性の新生血管も少なかった(図 6)。

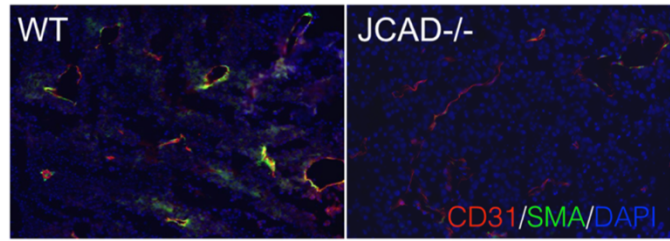


図 6 JCAD^{-/-}では成熟新生血管が乏しい

(B-4) ApoE/JCAD ダブルノックアウトマウスにおける vasa vasorum の評価

動脈硬化病変の成長や、種々の炎症細胞のプラーク内への浸潤の提供源として、血管外からプラーク内への栄養血管である vasa vasorum という新生血管が重要である。プラーク内の未熟な新生血管がプラーク内出血やプラークの不安定性に影響するため、臨床的に動脈硬化や心筋梗塞との関連が証明された JCAD はこの vasa vasorum を制御している可能性が高い。それゆえ、ApoE/JCAD ダブルノックアウトマウスを掛けあわせにより作成し、同週齢の ApoE ノックアウトマウスと比較して、血管周囲の vasa vasorum の数を CD31 の染色を用いて評価し、成熟度を平滑筋アクチン(SMA)染色において比較検討する。成熟した新生血管は血管周囲を SMA により覆われているが、逆に未成熟なものは SMA 陰性となることが知られている。これらにより、JCAD が vasa vasorum の進展と成熟を制御していることを証明する。

助成中の二年間では残念ながらここまで進まず、現在、解析中である。

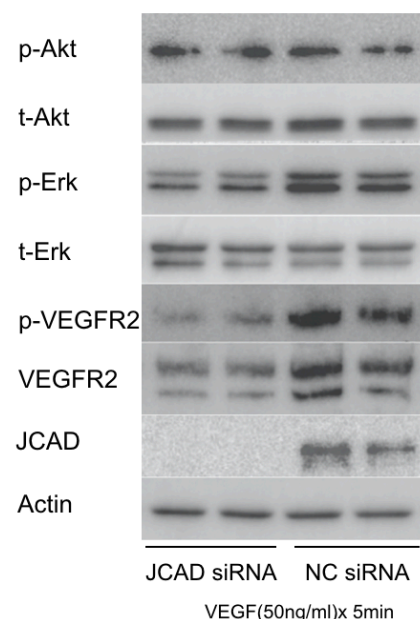
3. 考察、今後の課題

今回の我々の解析の結果 JCAD 分子は病的血管新生を制御することが明らかとなった。さらに腫瘍血管新生モデルにおいて、JCAD ノックアウトマウスでは血管新生の成熟も阻害することが明らかとなった。

一方、JCAD 分子はもともと GWAS により冠動脈疾患、特に心筋梗塞に臨床的に関連する遺伝子産物として同定された。今回の我々の血管新生における JCAD の役割は、この心筋梗塞発症を説明可能である。動脈硬化の進展に vasa vasorum という動脈硬化プラークへの新生血管があるが、未熟な新生血管からの出血がプラークの不安定性に関与することが報告されている (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005)。すなわち、JCAD 分子の遺伝子変異によって vasa vasorum が未熟となり、それによってプラークの不安定化がおこる、という説明である。

この仮説を実際に検証するために、現在、ApoE/JCAD のダブルノックアウトマウスを作製し、そのプラークにおける vasa vasorum の成熟度を組織学的に現在、解析する予定である。これにより、直接的に証明されることが期待される。

また、JCAD 分子が血管新生を制御する分子機構も現在、検討中である。前実験的には培養内皮細胞において VEGF 刺激による血管新生シグナル経路のうち、ERK のリン酸化を介することが明らかになりつつある(右図)。Akt のリン酸化には変化がなく、我々は JCAD 特異的阻害によってもトリパンプルーによる survival assay には変化がないことも確認しており、Akt リン酸化の survival signaling には JCAD が関与しないことに合致する。一方、ERK のリン酸化は細胞増殖に関与するため、これも我々の WST アッセイや Brdu 取り込み能の JCAD 阻害による抑制という結果に合致する。今後のより詳細な検討が期待される。



研究助成 2016－生活習慣病領域－
研究成果報告書 <発表実績/予定一覧>

所属	神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 循環器内科学分野
氏名	原 哲也

1. 論文発表実績	
・ 掲載年次順(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。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Hara T, Monguchi T, Iwamoto N, Akashi M, Mori K, Oshita T, Okano M, Toh R, Irino Y, Shinohara M, Yamashita Y, Shioi G, Furuse M, Ishida T, Hirata KI. Targeted Disruption of JCAD (Junctional Protein Associated With Coronary Artery Disease)/KIAA1462, a Coronary Artery Disease-Associated Gene Product, Inhibits Angiogenic Processes In Vitro and In Vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 Sep;37(9):1667-1673. 査読有
2	
3	
4	
② <論文 PDF 添付なし>	
1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
・ 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。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 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	2015.11	AHA 2015, 原 哲也、Targeted Disruption of JCAD/KIAA1462, a Coronary Artery Disease-associated Gene Product, Inhibits Angiogenic Processes in Vitro and in Vivo
2	2016.3	JCS 2016, 原 哲也、Targeted Disruption of JCAD/KIAA1462, a Coronary Artery Disease-associated Gene Product, Inhibits Angiogenic Processes in Vitro and in Vivo
3		
4		
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		