

Banyu Foundation Research Grant 2015－生活習慣病領域－

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	昭和大学
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

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

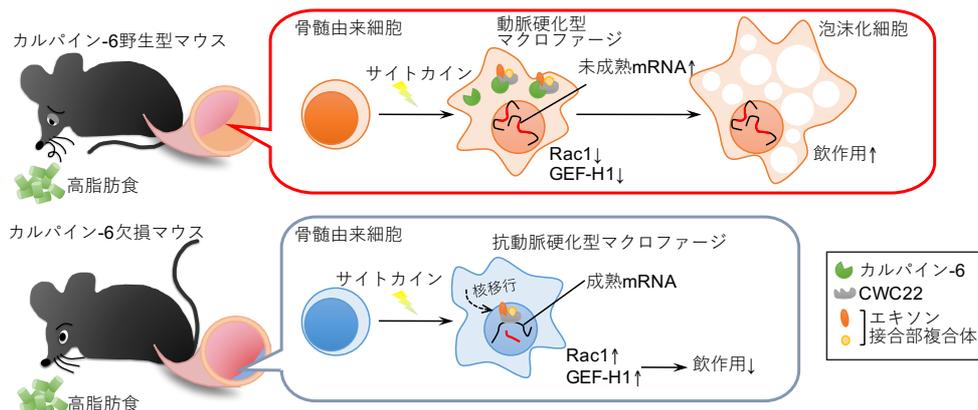
**研究目的** 脂質異常症・動脈硬化症に起因する虚血性心疾患の一次予防はスタチンの登場により著しい進歩を遂げたが、それでもなお脳卒中・心血管疾患は本邦の死因の25%以上を占め(平成27年厚生労働省人口動態統計)、スタチンと併用可能な革新的な治療戦略の開発が喫緊の課題とされる。近年、オートファジーやプロテアソーム系に代表されるタンパク質分解系の制御不全が、異常タンパク質の蓄積を介して動脈硬化症を増悪化するとの新規概念が提唱されている。異常タンパク質の増加は死細胞の蓄積・線維化等の組織変性を引き起こし、器質的・機能的な血管障害を誘発する。我々は、タンパク質分解系の中でも極めて極めてユニークな機構として、細胞内制御性プロテアーゼ「カルパイン」ファミリーを検証してきた。カルパインファミリーは哺乳類で15のホモログを有するストレス応答性のタンパク質プロセシング機構で、タンパク質の機能的修飾を介して細胞形質を制御する。我々は、これまで従来型カルパイン(カルパイン-1、-2)が動脈硬化症(Miyazaki T *et al.*, *Circulation*, 2011)および網膜症(Miyazaki T *et al.*, *Circ Res*, 2015)等の血管変性に寄与することを解明した。本研究では残る13種類のカルパインアイソザイムについて、動脈硬化症への関与を検討した。

**研究成果** 動脈硬化モデルマウス大動脈において、カルパインファミリーの網羅的発現解析を行ったところ、カルパイン-6 および-9 の発現増加が認められた。モデルマウスの動脈硬化病変は、カルパイン-6 の欠損により抑制されたが、カルパイン-9 の欠損では影響を受けなかった。カルパイン-6 は病変の泡沫化マクロファージに局在し、動脈硬化抑制は骨髄由来細胞のカルパイン-6 発現のみに依存した。カルパイン-6 は骨髄系列細胞には通常発現しないが、骨髄由来マクロファージ分化の過程で TNF- $\alpha$ 等のサイトカイン刺激により発現誘導され、同分子を欠損させたところ、Rac1 依存的に飲作用(ピノサイトーシス)を介する native LDL 取込みが抑制された。カルパイン-6 は非プロテアーゼ型アイソザイムであるため、結合タンパク質を網羅解析したところ、スプライシング関連因子 CWC22 が浮上した。マクロファージにおいてカルパイン-6 が発現誘導されると、同分子は細胞質で CWC22 と物理的に結合する。その結果、CWC22 の核局在が制限され、ターゲット遺伝子の mRNA 成熟・タンパク質発現が抑制される(図1)。したがって、カルパイン-6 は CWC22/pre-mRNA 成熟機構に干渉し、マクロファージに動脈硬化原性を付与すると考えられる。

**主要な研究業績**

1. **Miyazaki T**, Miyazaki A. Emerging roles of calpain proteolytic systems in macrophage cholesterol handling. *Cell Mol Life Sci.* 74: 3011-3021, 2017. (Invited review article)
2. **Miyazaki T et al.** Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J Clin Invest.* 126:3417-3432, 2016.

図1 カルパイン-6はRac1 mRNAの成熟を制限してマクロファージを動脈硬化型の形質に導く



## Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

## 研究成果報告書(追加助成) &lt;詳細&gt;

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

## 目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【目的】「カルパイン」は生体内に偏在する  $Ca^{2+}$  感受性細胞内プロテアーゼで、哺乳動物においては 15 のホモログが報告されている。特にカルパイン-1 および-2 から成る従来型サブタイプは、循環器領域を含む多くの疾患への関与が指摘されている。同酵素は、細胞内で内因性阻害因子カルパスタチンと共に「カルパインシステム」を形成しており、シグナル伝達分子などの基質を部位特異的に認識してプロセッシングし、細胞接着や炎症応答を制御する。我々はカルパインファミリーを血管機能制御の中核分子と位置づけ、その生理的・病態生理的役割を検証してきた。これまでの検討からカルパイン-2 は、動脈硬化病変の血管内皮細胞において発現誘導され、内皮バリア機能の破綻を引き起こし、動脈硬化症を増悪化させることを明らかとした (Miyazaki T *et al.* Circulation. 2011)。また、網膜症ならびに腫瘍形成時に認められる病的新生血管において内皮細胞内のカルパスタチンが下方制御を受け、これが JAK/STAT/VEGF-C 分子軸を介して病的血管新生を促進することを報告してきた (Miyazaki T *et al.* Circ Res. 2015)。しかし、これまでの報告の多くは従来型カルパインに関するもので、非従来型アイソザイムについては、その生理的意義すら明らかになっていないものが多い。本研究では、特に非従来型カルパインが動脈硬化症の病態生理学において如何なる役割を担うか精査した。

【研究方法】通常食または高脂肪食を負荷した LDL 受容体欠損マウスの大動脈において、定量的 PCR によりカルパインアイソザイムの網羅的発現解析を行った。解析結果を受け、カルパイン-6 野生型ならびに欠損マウス (東京大学医学部代謝生理化学教室提供)、またはカルパイン-9 野生型ならびに欠損マウス (東京都医学総合研究所カルパインプロジェクト提供) を LDL 受容体欠損マウスと交配して、二重欠損マウスを作出し、これに高脂肪食を負荷することで動脈硬化症を誘発した。骨髄由来細胞から分化誘導させた骨髄由来マクロファージの表現型を検討した。

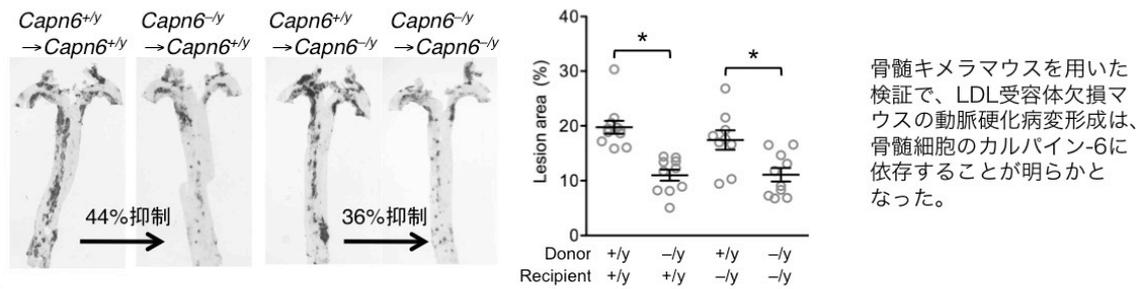
## 【結果】

## 動脈硬化病変の解析

LDL 受容体欠損マウスにおいてカルパインアイソザイムの網羅的発現解析を行ったところ、高脂肪食の負荷に伴いカルパイン-2、-6 および-9 の発現誘導が認められた。この結果を受け、LDL 受容体とカルパイン-6 または-9 の二重欠損マウスを作出し、高脂肪食を負荷したところ、カルパイン-6 欠損で動脈硬化病変の顕著な縮小が認められたが、カルパイン-9 欠損では部分的な抑制にとどまった。カルパイン-6 欠損マウスにおいて、LacZ レポーターアッセイを行ったところ、大動脈の動脈硬化病変で比較的強いカルパイン-6 の転写活性が認められたが、肺、肝臓、心臓、小腸、腎臓等のその他の臓器では認められなかった。動脈硬化病変内におけるカルパイン-6 の発現分布を免疫組織化学的に検討したところ、同分子は病変内の泡沫化マクロファージに局限していた。カルパイン-6 の欠損は、野生型の動脈硬化病変で認められるマクロファージ動員を低下させ、個々のマクロファージ内のコレステロール貯留を低下させたが、LDL 受容体欠損マウスにおいて認められる脂質異常症 (血中総コレステロール、LDL、HDL 値) には影響を及ぼさなかった。しかし、病変内のスカベンジャー受容体 (SR-A、CD36) およびコレステロール代謝関連分子 (ACAT-1、ABCA1、ABCG1) の発現変化は認められず、カルパイン-6 が従来の酸化 LDL 代謝経路に影響を及ぼしている可能性は低いと判断した。そこで、蛍光性ナノパーティクルをマウス静脈内に投与し、動脈硬化病変内のマクロファージへの取込みを指標として飲作用活性を測定したところ、同活性はカルパイン-6 の欠損により抑制されることが明らか

## 目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

図1 マクロファージカルパイン-6の欠損は動脈硬化病変を抑制する



となった。

X線を照射して骨髄をブロックしたレシピエントマウスにドナーマウス由来の骨髄を移植する骨髄移植実験において、動脈硬化病変の形成は骨髄由来細胞のカルパイン-6発現に依存するが、レシピエントマウスの遺伝子型には依存しないことが確認された(図1)。したがって、カルパイン-6は動脈硬化病変のマクロファージ動員ならびにマクロファージにおける飲作用を介したコレステロール貯留を促進し、動脈硬化症を増悪化すると考えられる。

ヒト動脈硬化病変マクロファージにおけるカルパイン-6の発現分布を、組織アレイを用いて免疫組織化学的に検討したところ、比較的グレードの低い頸動脈の動脈硬化病変(グレード3-4)においては発現が認められなかったが、比較的グレードの高い大動脈および冠状動脈の動脈硬化病変(グレード5-6)においては発現が検出された。一方、カルパイン-6は正常な大動脈外膜の常在性マクロファージにおいては発現が認められなかった。したがって、カルパイン-6はヒト動脈硬化病変においても、病変の形成に伴い顕在化する可能性が高い。

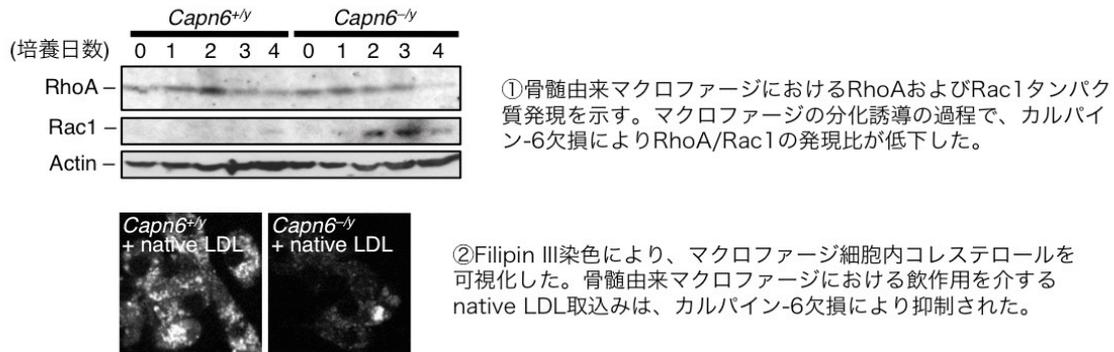
### 単離骨髄由来マクロファージにおける表現型解析

カルパイン-6野生型マウス大腿骨より骨髄由来細胞を単離・解析したところ、カルパイン-6の発現は認められなかったが、同細胞をマクロファージに分化誘導させたところカルパイン-6 mRNAおよびタンパク質の発現誘導が認められた。同様の発現誘導は、マウス単球ラインJ744細胞、ヒト単球ラインTHP-1細胞およびヒト単球由来マクロファージにおいても検出された。細胞内分布を検討したところ、カルパイン-6は細胞質にクラスター状に局在することが明らかとなった。表現型解析の結果、カルパイン-6欠損マクロファージはMCP-1誘発性ケモタキシスの速度が速く、Rac1の発現が増加していた(図2①)。一方、J744細胞に*Capn6*(マウスカルパイン-6遺伝子)を導入したところ、Rac1の発現低下と、MCP-1誘発性ケモタキシスの速度低下が認められた。また、カルパイン-6野生型および欠損型骨髄由来マクロファージにおいて遺伝子発現の解析を行ったところ、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6)、M1/M2マーカー(iNOS、Arginase-1)の発現に両群で違いは認められなかった。したがって、カルパイン-6はマクロファージ分化の過程で発現誘導され、Rac1の発現および細胞動態の調節を行うことが明らかとなった。

カルパイン-6野生型および欠損型骨髄由来マクロファージにおいてコレステロール代謝関連分子の発現解析を行ったところ、SR-A、CD36、ACAT-1、ABCA1、ABCG1に両群で違いは認められなかった。また、骨髄由来マクロファージの培養液に酸化LDLを添加し、スカベンジャー受容体依存的な取込みを検討したが、カルパイン-6野生型および欠損型で顕著な違いは認められなかった。一方、培養液に高濃度native LDLを添加し、受容体非依存的なnative LDL取込み(飲作用)を確認したところ、カルパイン-6の欠損により取込みの低下が認められた(図2②)。蛍光性デキストランの取込みを指標としてマクロファージ飲作用活性の測定を行ったところ、同活性はカルパイン-6の欠損により低下することが明らかとなった。カルパイン-6欠損型マクロファージにおける飲作用活性はRac1阻害剤NSC23766で救済されたことから、飲作用低下はRac1発現誘導に起因すると考えられる。蛍光性デキストランを一過的に骨髄由来マクロファージに負荷した際にラベルされる細胞内小胞(飲胞)、について解析を行ったところ、カルパイン-6の欠損により粒子径の増大、細胞内移送速度の低下が認められたが、飲胞の細胞内密度に変化は認められなかった。また、飲胞における早期エンドソームマーカーRab5局在性ならびにリソソームへの移行はカルパイン-6の欠損により低下した。また、飲胞の細胞内移送速度低

## 目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

図2 マクロファージカルパイン-6の欠損はRac1発現を亢進し、飲作用を抑制する



下は Rac1 阻害剤 NSC23766 により救援された。したがって、マクロファージ分化の過程で発現誘導されたカルパイン-6は、Rac1の発現誘導を妨げ、これが飲胞の細胞内移送を円滑にすることで、飲胞の成熟およびリソソームへの移行が促進され、飲作用を介したコレステロール蓄積を助長したと考えられる。すなわち、カルパイン-6の発現に伴いマクロファージは飲作用活性の高い動脈硬化性の形質にシフトすると考えられる。

### カルパイン-6 結合タンパク質の検討

免疫沈降-LC-MS/MS ショットガン解析によりカルパイン-6 結合タンパク質を検討したところ、スプライシング関連因子 CWC22 が見いだされた。カルパイン-6の結合により CWC22の核移行が妨げられ、Rac1 遺伝子のスプライシングが制限され、タンパク質発現の低下が引き起こされる。マウス動脈硬化病変の泡沫化マクロファージにおいても同様に、CWC22の核移行と Rac1 遺伝子のスプライシングの低下が認められた。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、その発現量は CWC22の核移行と逆相関することを見いだした。

#### 【考察】

カルパイン-6はマクロファージ分化の過程で炎症性刺激により発現誘導され、Rac1 遺伝子のスプライシングを妨げることにより、同細胞を動脈硬化性の形質へと転化させることが明らかとなった。カルパイン-6の欠損は、酸化 LDLの代謝経路に影響を及ぼさず、飲作用を介する泡沫化を抑制することから、カルパイン-6の阻害ならびに CWC22の機能の正常化により飲作用を介したマクロファージ泡沫化は抑制可能と考えられる。

#### 【今後の課題】

カルパイン-6による mRNA スプライシングの制御は生活習慣病全般に波及する可能性が示唆される。今後はカルパイン-6/CWC22分子軸の下流に存在する標的遺伝子およびスプライスバリエントを同定するとともに、CWC22欠損マウスおよびカルパイン-6欠損マウスを用いて肥満症・糖尿病の表現系を検討したい。スプライスバリエントの解析を軸に、カルパイン-6/CWC22分子軸の生活習慣病全般における役割を包括的に検討していきたい。

**Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—**  
**研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所 属	昭和大学医学部生化学講座
氏 名	宮崎 拓郎

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。</li> <li>・ 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。</li> <li>・ 国内外雑誌を問わない。</li> <li>・ 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。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	<u>Miyazaki T</u> , Miyazaki A. Defective protein catabolism in atherosclerotic vascular inflammation. Front Cardiovasc Med. 4: 79; 2017. 査読あり
2	<u>Miyazaki T</u> , Miyazaki A. Emerging roles of calpain proteolytic systems in macrophage cholesterol handling. Cell Mol Life Sci. 74: 3011-3021; 2017. 査読あり
3	<u>Miyazaki T</u> , 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: 3417-3432; 2016. 査読あり
4	Kigawa Y, <u>Miyazaki T</u> , Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Functional heterogeneity of nadph oxidases in atherosclerotic and aneurysmal diseases. J Atheroscler Thromb. 24: 1-13; 2017. 査読あり
② <論文 PDF 添付なし>	
1	<u>Miyazaki T</u> , Miyazaki A. Dysregulation of calpain proteolytic systems underlies degenerative vascular disorders. J Atheroscler Thromb. In press. 査読あり
2	<u>Miyazaki T</u> , Miyazaki A. Impact of dysfunctional protein catabolism on macrophage cholesterol handling. Curr Med Chem. In press. 査読あり
3	Omoto T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Orimo A, Ohnishi K, Yoshihara K, Miyauchi A, Li S, Gao L, Umemoto T, Tanaka J, Nakahara K, Takeya M, Ishida F, Kudo SE, Haraguchi S, <u>Miyazaki T</u> , Miyazaki A. The impact of stromal Hic-5 on the tumorigenesis of colorectal cancer through lysyl oxidase induction and stromal remodeling. In press. 査読あり
4	Saito M, Suzuki Y, Yano S, <u>Miyazaki T</u> , Sato Y. Proteolytic inactivation of anti-angiogenic vasohibin-1 by cancer cells. J Biochem. 160: 227-232; 2016. 査読あり
5	Lei XF, Fu W, Kim-Kaneyama JR, Omoto T, <u>Miyazaki T</u> , 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: 110-117; 2016. 査読あり

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2016. 12	第24回日本血管生物医学会学術集会 発表者:宮崎拓郎 Disturbance of pre-mRNA splicing by calpain-6 aggravates macrophage cholesterol deposition in atherosclerotic lesions (Best oral presentation award 受賞)
2	2016. 11	19th International Vascular Biology Meeting. 発表者:宮崎拓郎 Calpain-6 potentiates pro-atherogenic pinocytosis in macrophages. (Young Investigator Travel Award 受賞)
3	2016. 7	第48回動脈硬化学会学術集会 シンポジウム13「動脈硬化の基礎研究の最前線」発表者:宮崎拓郎 Calpain proteolytic systems in atherosclerotic and aneurysmal diseases. (招待講演)
4	2016. 2	第45回心脈管作動物質学会 発表者:宮崎拓郎 カルパインによるタンパク質プロセッシングと動脈硬化症. (招待講演)
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		