

20020904

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化機転に基づく脳血管性痴呆病因解明と治療法
(発症および進行阻止法)の開発に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 祖父江 憲治

平成15(2003)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化機転 に基づく脳血管性痴呆病因解明と治療法（発症 および進行阻止法）の開発に関する研究 祖父江憲治	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 4
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 6

血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化機転に基づく脳血管性痴呆の病因解明と治療法の開発に関する研究
主任研究者 祖父江 憲治 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 脳血管性痴呆の発症原因を血管閉塞および梗塞性要因から解明し、予防・発症および進行阻止に向けた治療法の開発を目的とした。血管内膜肥厚誘導因子のレセプター検索、脳血管性痴呆モデル動物の作製と阻害薬の開発を主目的として研究を行った。不飽和 LPA による血管内膜肥厚モデルラットの作製および脳血管硬化モデルラットの作製に成功した。また本研究により、不飽和 LPA が脳血管性痴呆の有力な発症因子であることが明らかになったことより、不飽和 LPA 特異的レセプターを検索し、新規 G 蛋白質共役型受容体の 1 つである同受容体のクローニングを行った。ドラッグデザインから阻害薬の開発に向けた研究を行うため、PSD 足場蛋白質(PSD-Zip45)により生細胞の細胞膜上で膜 7 回貫通型レセプターのクラスターを形成させた膜標品の立体構造解析を開始しており、不飽和 LPA レセプター立体構造解析とドラッグデザインに向けた準備が完了した。シグナル伝達系異常による脳血管性痴呆モデルマウスも作製中である。本研究遂行中に見い出した血管内膜肥厚増悪因子としてエビリゲクリンを同定した。血管内膜肥厚および脳血管性痴呆と不飽和 LPA 予備蓄積能の相関については、LPA 微量定量化を目指して測定法を確立中であり、完成次第臨床検体の測定に入る予定である。

A. 研究目的

我が国における全痴呆患者数は、現在 80 万人を超えている。このままの状態が続けば、2020 年には 200 万人に達すると予想される。中でも全痴呆患者中、脳血管性痴呆は半数以上を占めており、超高齢化時代への突入に伴い本疾患への対策は厚生労働行政にとり深刻かつ重大な課題である。本研究は、脳血管性痴呆の主因である大梗塞および多発性中・小梗塞、さらにはピンスワンガー型痴呆などの発症原因を血管病変（大・中・小細動脈硬化および毛細血管閉塞と随伴する血小板活性化による血栓形成）の立場から究明し、発症前診断・予防法の確立、さらに発症・進行阻止に向けた治療法の開発を目的とし、この事態に対応するものである。

B. 研究方法

- 1) 不飽和 LPA 予備蓄積能定量化システムの開発——ヒト LDL 分画の酸化により形成される不飽和 LPA 分子種を、多数の血液試料から簡便微量定量法の確立。
- 2) 血管内膜肥厚・脳血管内膜肥厚モデルラットの作成——不飽和 LPA 処理による血管内膜肥厚と脳血管内膜肥厚モデルラットの作成。
- 3) 不飽和 LPA 特異的レセプターの検索——ligand-binding assay による不飽和 LPA 特異的レセプターのクローニング。
- 4) 血管内膜肥厚増悪因子の検索——分化型血管平滑筋細胞に活性型 MEK1 と MKK6 を感染後、培養液中の増悪因子の分離、精製・同定。
- 5) シグナル伝達異常による脳血管内膜肥厚モデルマウスの作成——脳血管平滑筋細胞特異的トランスジェニックマウスの作成。
- 6) 不飽和 LPA 特異的レセプターに対する阻害薬開

発——不飽和 LPA 特異的レセプターの立体構造解析を行ない、立体構造情報に基づく阻害薬開発。

（倫理面への配慮）

モデルラットとトランスジェニックマウスの作成・解析については、大阪大学医学部医学科動物実験委員会の許可を得ており、同委員会ガイドラインに準じて研究を施行した。ヒト血中 LDL の不飽和 LPA 予備蓄積能に関する研究およびヒト正常と動脈硬化血管の免疫組織化学的研究は、大阪大学倫理委員会の承認を得た。患者血液の採取および手術時の残余組織より血管標品の調整にあたっては、本人のインフォームドコンセントを十分に得た上で倫理面に配慮して施行した。

C. 研究結果

- 1) 血管平滑筋細胞の分化・脱分化型形質を決定するシグナル伝達系の解析
 - i) 血管平滑筋細胞の分化・脱分化型形質決定のシグナル伝達系である PI3K/PKB 系と ERK および p38MAPK 系のスイッチングは、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 が決定的役割を果たすことを見い出した。
 - ii) 分化シグナルである PI3K/PKB 系下流はカルシニューリン(Cn)と NFAT 系が SRF 転写を制御していること、脱分化誘導シグナルは Ras が ERK と p38MAPK 系を活性化することを明らかにした。
- 2) 血管内膜肥厚・脳血管内膜肥厚モデルラットの作成
 - i) 頸動脈に不飽和 LPA 処理を行ない、血管内膜肥厚モデルラットの作成に成功した。
 - ii) 不飽和 LPA 処理による脳血管肥厚モデルラットの作成に成功した。
- 3) 不飽和 LPA 特異的レセプターの検索

不飽和 LPA のターゲットとして、膜 7 回貫通型の新規不飽和 LPA 特異的レセプターをクローニングした。

4) 不飽和 LPA 予備蓄積能から血管内膜肥厚による脳血管性痴呆及び動脈硬化発症前診断法の確立
不飽和 LPA 予備蓄積能と動脈硬化並びに脳血管性痴呆症の相関を検討する目的で、LDL 酸化による不飽和 LPA の多数かつ迅速微量定量法を開発中である。

5) 細胞内シグナル伝達異常による脳血管内膜肥厚モデルマウスの作成

i) 血管平滑筋細胞シグナル伝達系解析の結果、Ras が ERK と p38MAPK を活性化し、脱分化誘導を起すことを見出した。

ii) Ras 過剰発現による脳血管内膜肥厚モデルマウスの作成を目的として、活性型 Ras にコンディショニング装置を組み込んだトランスジェニックマウスの作成中である。

6) 血管内膜肥厚増悪因子の検索

i) ERK と p38MAPK 活性化により脱分化した血管平滑筋細胞よりパラクラインされる増悪因子として、エピレギュリンを同定した。

ii) エピレギュリンがヒト動脈硬化発症の初期病巣に限局して発現することを見出した。

7) 膜貫通型レセプターの立体構造解析 (不飽和 LPA 特異的レセプター阻害薬開発)

不飽和 LPA 特異的レセプターを、強力な自己集積能を示す PSD-Zip45 による細胞膜上でのクラスター化で立体構造を解析し、この構造情報を基にドラッグデザインより阻害薬開発を目指す新戦略を施行中である。

D. 考察

「血管平滑筋細胞の分化・脱分化型形質を決定するシグナル伝達系の解析」及び「血管平滑筋細胞特異的転写装置の解析」については、当初の目標通り血管平滑筋細胞のシグナル伝達系と転写装置の全貌がほぼ解明出来た。中でも、PI3K/PKB 系から Cn/NFAT 系による SRF 転写制御の解明により、これまで不明であった血管平滑筋細胞シグナル伝達と転写制御の関連を明らかにすることが出来た。

不飽和 LPA による脳血管および血管内膜肥厚モデルラット作成の成功は、脂質の中でコレステロールが血管内膜肥厚の危険因子として注目されてきた流れを変革するものである。また、本研究により、新規不飽和 LPA 特異的レセプターのクローニングに成功した。不飽和 LPA 予備蓄積能から発症前診断法の開発は、本研究成果により追加した研究である。LDL 簡便分離法、不飽和 LPA の定量化もほぼ目途がつき、さらに微量化を試行中である。不飽和 LPA は糸球体腎炎・肝線維症・肺線維症・前立腺肥大な

ど慢性線維芽細胞症に共通の引き金である可能性が期待され、単に脳血管内膜肥厚・動脈硬化症のみならず、上記疾患群の病因としての可能性が強く、これら疾患の病因解明・発症前診断・予防・治療に向けた本研究の意義は大きい。

シグナル伝達系異常による脳血管肥厚モデルマウスの作成を目指し、SM22 α プロモーターを用い MEK1 と MKK6 を脳血管平滑筋細胞に発現するマウスの作成を開始した。しかし、SM22 α プロモーターは胎生期一過性に心筋に発現し、心肥大を起して胎児期で致死となった。また、SM22 α プロモーターは通常の大・中・小血管平滑筋細胞には発現するが、脳血管平滑筋細胞では発現しないことが判明した。そこで、脳血管平滑筋細胞に発現可能な SM-MHC プロモーターを使用し、本研究で判明した Ras が ERK と p38MAPK 上流因子であることから、SM-MHC プロモーター・活性型 Ras にコンディショニング装置を組み込んだトランスジェニックマウスの作成に研究計画を変更した。

不飽和 LPA 特異レセプター阻害薬開発を目的として、ドラッグデザイン上必要な立体構造解析を開始し、PSD-Zip45 を用いた膜レセプター立体構造解析という新戦略の発端が開かれた。殊に細胞膜貫通型レセプターの立体構造解析については、本研究はその端緒を作ったもので、一つの膜レセプター立体構造の解明にとどまらず膜貫通型レセプター立体構造の研究に大きな影響を与えるばかりか、得られた成果をドラッグデザインに応用出来る等社会的波及効果も大きい。

本研究で見出した不飽和 LPA による脳血管内膜肥厚と動脈硬化発症の分子機作は、糸球体腎炎・肝線維芽細胞症に共通の機作である可能性が判明しつつあり、これら疾患の病因解明と発症前診断・予防・治療法開発に向けた本研究の厚生労働行政への意義は大きい。殊に、不飽和 LPA 予備蓄積能の簡易定量法開発により、発症前診断の道が拓かれるもので、上記疾患群の予防と治療法に向けた厚生労働行政への波及効果大なるものと期待される。

本研究により、脳血管内膜肥厚・動脈硬化症の発症・進展の鍵となる不飽和 LPA とその特異受容体を見出した。また、この不飽和 LPA 特異的受容体の阻害薬開発を、膜貫通型受容体の立体構造解析という新戦略をもって進行中であり、本戦略は創薬・医療に向けた新領域を開発するインパクトを与えるものと期待される。

E. 結論

本研究は、分化型血管平滑筋細胞培養系の確立という基礎的研究から、これを用いたシグナル伝達と遺伝子発現機構の解明、血管内膜肥厚因子として不飽和 LPA の同定と不飽和 LPA による血管内膜肥厚モ

デルの作成へと発展した。さらに、不飽和 LPA レセプターのクローニングとその立体構造解析及び阻害剤開発・不飽和 LPA とシグナル伝達異常による脳血管肥厚モデル動物の作成の研究に至っている。従って、本研究は血管平滑筋細胞と血小板活性化機転を中心に、脳血管性痴呆症の発症前診断・予防法の確立と発症・進行阻止を目指した総合的アプローチであり、本研究目的の達成は QOL 向上に貢献するものであり、社会的意義も極めて大きいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi K. et al. Protein tyrosine phosphatase, SHP-2, is a critical element of IGF-I signaling in different phenotypes of vascular smooth muscle cells. *J.Cell.Biol.* (in press) 2003

Yoshida K. et al. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acids *in vivo*. *Circulation* (in press) 2003

Takahashi M. et al. Epregrin as a major autocrine/paracrine factor released from the ERK- and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells. *Circulation* (in press) 2003

Ebihara T. et al. Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with green fluorescent protein. *J. Neurosci.* 23: 2170-2181, 2003

Usui S. et al. Synaptic targeting of PSD-Zip45 (Homer 1c) and its involvement in the synaptic accumulation of F-actin. *J. Biol. Chem.* 278, 10619-10628, 2003

Ohkawa Y. et al. Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 78-83, 2003

Konno D. et al. The postsynaptic density and dendritic raft localization of PSD-Zip70, which contains an N-myristoylation sequence and leucine-zipper motifs. *J. Cell Sci.* 115, 4695-4706, 2002

Nishida W. et al. The triad of serum response factor and GATA and NK families governs transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J. Biol. Chem.* 277, 7308-7317, 2002

Irie K. et al. Crystal structure of the Homer 1 family conserved region reveals the interaction between the EVH1 domain and own proline-rich motif. *J. Mol. Biol.* 318, 1117-1126, 2002

Hiroaki Y. et al. A new technique to co-localise membrane proteins with Homer/vesl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 756-765, 2002

Yamada Y. et al. PSD-95 eliminates Src-induced potentiation of NR1/NR2A-subtype NMDA receptor

channels and reduces high-affinity zinc inhibition. *J. Neurochem.* 81, 758-764, 2002

2. 学会発表

1. The XIIth International Vascular Biology Meeting (2002/5/12, Karuizawa)

K. Sobue: Molecular Mechanism of Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells

2. International Symposium of Lipid Res. (2002/7/15/15, Boston)

K. Sobue: Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells by Unsaturated LPA

○ロイシンジッパーモチーフを有する PSD 足場蛋白質 (PSD-Zip45 と PSD-Zip70) のシナプスターゲティング (祖父江憲治、今野大治郎、臼井審一、堀啓、丸岡久人) 第 45 回日本神経化学学会大会 (札幌)

○PSD-95 及び MALS-2 の NR1/NR2B サブタイプ受容体チャンネル活性に及ぼす効果の比較 (岩本敬、山田康枝、小田隆将、渡辺義文、祖父江憲治、乾誠) 第 45 回日本神経化学学会大会 (札幌)

○シナプス後肥厚部の分子構築と機能制御 (今野大治郎、祖父江憲治) 日本電子顕微鏡学会第 58 回学術講演会 (大阪)

○LPA と血管平滑筋細胞の形質転換 (祖父江憲治) 群馬大学公開講座生体調節研究所シンポジウム (群馬大学)

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

○筋線維芽細胞症動物モデル作成方法 (特許 2001-154519)

○ポリペプチド (カルデスモン) (アメリカ特許 EP 0506377B1) / (ヨーロッパ 5379008)

○平滑筋細胞分化維持に関与する遺伝子 (特願 2000-34479)

○血管平滑筋細胞の培養方法 (特願 2001-154519)

○筋繊維芽細胞症診断方法 (特願 2001-154521)

○薬剤評価方法 (特願 2001-154522)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi K, Takahashi M, Ohkawa Y, Namakura M, Yoshida K, Ogawa A, Nishida W. & Kenji Sobue	Protein tyrosine phosphatase, SHP-2, is a critical element of IGF-I signaling in different phenotypes of vascular smooth muscle cells.	J. Cell Biol.	(in press)		2003
Yoshida K, Nishida W, Hayashi K, Ohkawa Y, Ogawa A, Aoki J, Arai H, & Sobue K.	Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo	Circulation	(in press)		2003
Takahashi M, Hayashi K, Yoshida K, Ohkawa Y, Komurasaki T, Kitabatake A, Ogawa A, Nishida W, Yano M. Monden M. & Sobue K.	Epiregulin as a major autocrine/paracrine factor released from the ERK- and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells	Circulation	(in press)		2003
Ebihara T, Kawabata I, Usui S, Sobue K. and Okabe S.	Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins with green fluorescent protein	J. Neurosci.	23	2170-2181	2003
Usui S, Konno D, Hori K, Maruoka H, Okabe S, Fujikado T, Tano Y, & Sobue K.	Synaptic targeting of PSD-Zip45 (homer 1c) and its involvement in the synaptic accumulation of F-actin	J. Biol. Chem.	278	10619-10628	2003
Ohkawa Y, Hayashi K, & Sobue K.	Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells	Biochem. Biophys. Res. Commun.	301	78-83	2002
Konno D, Ko J, Usui S, Hori K, Maruoka H, Inui M, Fujikado T, Tano Y, Suzuki T. Tohyama K, & Sobue K.	The postsynaptic density and dendritic raft localization of PSD-Zip70 containing an N-myristoylation sequence and leucine zipper motifs.	J. Cell. Sci.	115	4695-4706	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishida W, Nakamura M, Mori S, Takahashi M, Ohkawa Y, Tadokoro S, Yoshida K, Hiwada K, Hayashi K, & Sobue K	The triad of serum response factor and GATA and NK families governs transcription of smooth and cardiac muscle genes.	J. Biol. Chem.	277	7308-7317	2002
Irie K, Nakatsu T, Mitsuoka K, Miyazawa A, Sobue K, Hiroaki Y, Doi T, Fujiyoshi Y, & Kato H.	Crystal structure of the Homer 1 family conserved region reveals the interaction between the EVH1 domain and own proline-rich motif	J. Mol. Biol.	(in press)		2002
Hiroaki Y, Nishikawa K, Mitsuoka K, Tachibana T, Sobue K, Doi T, & Fujiyoshi Y.	A new technique to co-localise membrane proteins with Homer/ves1	Biochem. Biophys. Res. Commun.	295	756-765	2002
Yamada Y, Iwamoto T, Watanabe Y, Sobue K, & Inu M,	PSD-95 eliminates src-induced potentiation of NR1/NR2A-subtype NMDA receptor channels and reduces high-affinity zinc inhibition	J. Neurochem.	81	758-764	2002

20020904

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.4- P.5の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。