

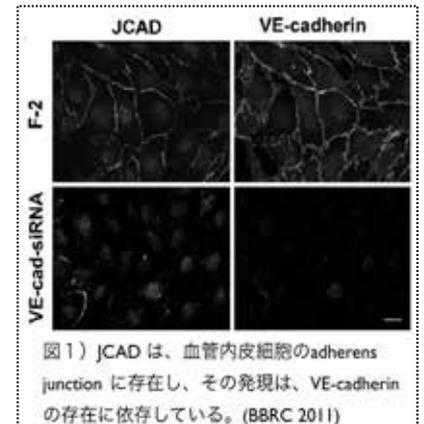
## 新規の血管内皮接着因子、JCAD の冠動脈疾患発症に及ぼす影響の解明

原 哲也

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

## 【研究の背景】

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分子の同定という培養細胞からのアプローチから 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, BBRC.2011)。しかしながら、JCAD の血管内皮における生理的機能や、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。



## 【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。近年のヒトゲノムワイド関連研究で冠動脈疾患や心筋梗塞と相関がある分子として、JCAD (Junctional protein associated with Coronary Artery Disease) が同定された。それゆえ、この JCAD の機能を制御することは、新たな冠動脈疾患の治療法として非常に期待できる。しかし、JCAD は血管内皮の細胞間接着部に存在していることのみ明らかであるが、実際の生理的、病態学的機能は全く明らかにされていない。それゆえ、本研究では JCAD の心血管病における役割を、特に血管新生に焦点を絞り、明らかにすることを目標とする。

## 【方 法】

(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 等を用いた JCAD のノックダウンや過剰発現を誘導し、WST-1 による細胞増殖能、wound healing model による細胞遊走能、tube formation による血管新生能を比較検討し、JCAD が血管新生を制御していることを明らかにする。

(B) in vivo における JCAD の血管新生の影響の解明

## (B-1) JCAD (-/-) マウスの生理的血管新生への影響

古瀬研究室が作製した JCAD (-/-) マウスであるが、少なくとも胎生致死はおこらず、肉眼上は野生型とかわらないことまでは明らかになっている。より詳細に検討するために、各臓器を組織学的に比較検討する。マウス網膜血管の発生の差異を 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。

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

JCAD (-/-) 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。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血管新生能を比較検討する。

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

JCAD (-/-) マウスと野生型マウスに対してメラノーマ癌細胞(B16F10)を皮下注射し、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 の染色によって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( $\alpha$  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。

## 【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

培養血管内皮細胞において JCAD 特異的に siRNA を用いてノックダウンしたところ、migration assay, proliferation assay, tube formation assay において JCAD ノックダウンによりこれらの機能が有意に抑制された。すなわち、血管新生にかかわる遊走能、増殖能や tube formation を JCAD が制御していることが明らかになった。

### (B) in vivo における JCAD の血管新生の影響の解明

#### (B-1) JCAD(-/-) マウスの生理的血管新生への影響

マウス網膜血管の発生の差異を FITC の静脈投与後の摘出眼球において比較検討したが、JCAD ノックアウトマウスと野生型マウスに差を認めなかった。すなわち生理的血管新生には影響がないことが明らかになった。

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

JCAD(-/-) 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したところ、JCAD ノックアウトマウスの大動脈からの新生血管が有意に抑制された。

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

JCAD(-/-) マウスと野生型マウスに対してメラノーマ癌細胞 (B16F10) を皮下注射し、その増殖速度を比較したところ、JCAD ノックアウトマウスでは腫瘍の増殖抑制が認められた。さらに新生血管の成熟度を比較するために、SMA( $\alpha$  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したところ、JCAD ノックアウトマウスでは SMA を伴わない未熟な新生血管の割合が高いことが明らかとなった。さらに LLC(肺癌細胞) や E0771(乳癌細胞) においても同様の検討をおこなったが、いずれの細胞株でも同様に JCAD ノックアウトマウスでは増殖と血管新生が抑制されていた。

## 【考 察】

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。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

ヒトゲノムワイド研究によって臨床的に心筋梗塞や動脈硬化と関連することが明らかとなった JCAD 分子であるが、これまでその機能は全く明らかとなっていなかった。その中で、今回の研究によって初めて JCAD 分子の機能の一部として血管新生の制御があることが明らかとなった。今後、より詳細に動脈硬化や心筋梗塞発症にこの JCAD 分子がどういったメカニズムで影響しているかを解明することにより、新規の動脈硬化、心筋梗塞に対するアプローチが開発される可能性がある。

本研究は以下の引用文献の論文に採択、発表された<sup>1)</sup>。

【参考・引用文献】

- (1) 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.  
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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Sep; 37(9):1667-1673.