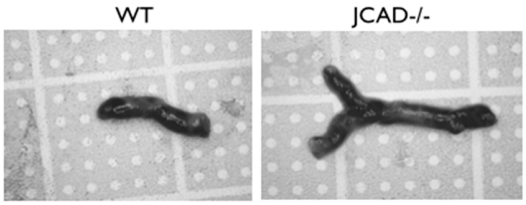
180　新規の接着因子、JCADによる血栓形成制御機構の解明	原　哲也

【目的】血管内皮接着因子（JCAD：Junctional protein associated with coronary artery disease）は、近年のヒトゲノムワイド関連研究（GWAS）によって、心筋梗塞に関連する新規の分子として同定された（Eur Heart J. 2011, Nat Genet. 2011）。それと同時期に、我々と共同研究グループは新規接着因子の同定、という全く異なる生化学的アプローチから、独自にJCADを同定し（BBRC, 2011）、JCADの生理的機能として、血管新生を制御していることを明らかにした（Hara et al, ATVB, 2018）。JCADは血管内皮細胞に発現し、VE-Cadherin依存的に細胞接着部位に局在することを報告したが、JCADが心筋梗塞を制御する機序は不明である。そのような中で、JCADはトロンビン刺激でリン酸化修飾をうけることが網羅的解析によって偶然明らかになった（Blood,　2014）。すなわち、JCADは血管内皮における、トロンビン刺激による血栓形成カスケードを制御することで、心筋梗塞を含む、血栓症の発症に関与しているのではないかと着想した。

【方法】1. JCAD$^{-/-}$マウスを用いた血栓症の発生におけるJCADの影響の解明：独自に作製したJCAD$^{-/-}$マウスにおいて、我々が近年、独自に開発した頚静脈結紮モデル（Hara T et al, *Circulation*. 2014）や、wire injuryによる大腿動脈血栓モデルにより、マウスに血栓を作製した。形成された血栓のサイズを野生型マウスとJCAD$^{-/-}$マウスで比較することによって、JCADが静脈および動脈血栓形成を制御することを直接的に明らかにした。2. 培養細胞を用いたJCADの血栓形成にかかわる分子メカニズムの解明：培養ヒト血管内皮細胞（HUVECなど）にsiRNA等を用いてJCAD特異的なノックダウンや過剰発現を誘導し、トロンビン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる影響を分子細胞学的に検討した。具体的にはトロンビン刺激後の組織因子などの血栓性分子の発現変化や、Erkなどのシグナル伝達経路を比較した。

【結果】1. JCAD$^{-/-}$マウスを用いた血栓症の発生におけるJCADの影響の解明：我々と共同研究グループは独自にJCADを同定し、血管内皮の接着部位に発現することを報告した。さらに、JCAD$^{-/-}$マウスの作製にも既に成功している。そのJCAD$^{-/-}$マウスにおいて、下大静脈にDVTを作製したところ、JCAD$^{-/-}$マウスでは大型のDVTが作製された。すなわち、JCADは抗血栓的に働く分子であることが生体で明らかとなった。2. 培養細胞を用いたJCADの血栓形成にかかわる分子メカニズムの解明：培養ヒト血管内皮細胞（HUVECなど）にsiRNA等を用いてJCAD特異的なノックダウンや過剰発現を誘導し、トロンビン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる影響を分子細胞学的に検討した。VEGF刺激によるERKのリン酸化はJCADの特異的ノックダウンにより抑制されたが一方、AKTのリン酸化経路は抑制されなかった。またJCAD特異的ノックダウンによりVEGFRのリン酸化とその発現レベル自体も抑制された。

JCADノックアウトマウスにおける大型DVTの形成



180. 新規の接着因子、JCAD による血栓形成制御機構の解明

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

Key words：深部静脈血栓症，JCAD，血管内皮

緒　言

(i) 新規の血管内皮接着因子、JCAD とは

近年のヒトゲノムワイド関連研究（GWAS）によって、心筋梗塞に関連する新規の分子として JCAD（Junctional protein associated with coronary artery disease）が同定された［1，2］。それと同時期に、我々と共同研究グループは新規接着因子の同定、という全く異なる生化学的アプローチから、独自に JCAD を同定し［3］、JCAD の生理的機能として、血管新生を制御していることを明らかにした［4］。JCAD は血管内皮細胞に発現し、VE-Cadherin 依存的に細胞接着部位に局在することを報告したが（図 1）、JCAD が心筋梗塞を制御する機序は不明である。そのような中で、JCAD はトロンビン刺激でリン酸化修飾をうけることが網羅的解析によって偶然明らかになった［5］。すなわち、JCAD は血管内皮における、トロンビン刺激による血栓形成カスケードを制御することで、心筋梗塞を含む、血栓症の発症に関与しているのではないかと着想した。

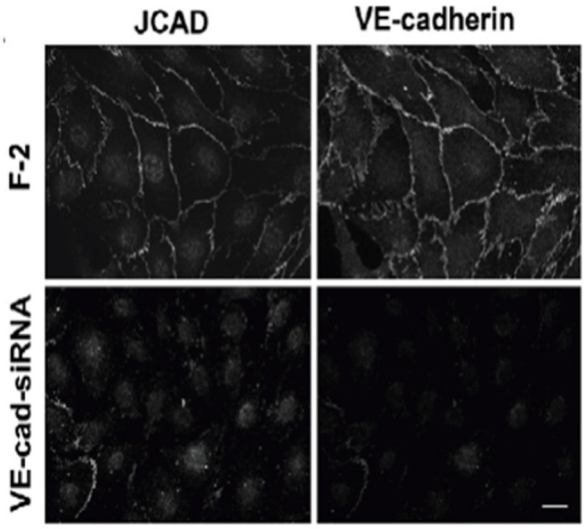


図 1　JCAD の局在

(ii) 本研究で新たに解決しようとするもの

1. JCAD が血栓形成を制御していることを JCAD$^{-/-}$マウスを用いて、直接的に明らかにする

- 各種血栓モデル（DVT モデル、動脈血栓モデル）を作製し、JCAD$^{-/-}$マウスでは血栓サイズが野生型マウスと比較して、大型化、ないしは縮小することを証明する。
- 分子イメージングを用いて、炎症細胞浸潤、炎症活性、血栓関連分子の発現を生体下で比較検討する。

2. 培養細胞を用いて、JCAD の血栓形成にかかわる分子メカニズムを明らかにする

- 培養ヒト血管内皮細胞に siRNA 等を用いて JCAD 特異的なノックダウンや過剰発現を誘導しトロンビン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる分子（組織因子、PAI-1 等）の変化を解明する。

（iii）本研究の特色

我々の研究室は生化学的なアプローチでJCADを同定し、JCADに対する抗体も独自に作製しており［6］、さらに、JCAD$^{-/-}$マウスも独自に作製しており［4］JCAD研究に関して世界をリードしている。一方、「血栓症」を対象とした研究は、全世界的に、凝固因子や血小板に注目した*in vitro*でのいわゆる「血液内科学」的な研究が主であるが、「血栓症」はVirchowの3徴（血流うっ滞、血管壁の傷害、血液凝固能の亢進）が示すように、生体内での統合的、複合的な抗血栓作用のバランスの破綻により発症することは古くから知られており、*in vivo*での個体レベルでの研究が重要である。そのような中で、我々はDVT作製の手術手技を確立し、さらに*in vivo*での各種分子の動態を生体下において分子レベルで明らかにする分子イメージング手法（図2）も習得し論文報告［7, 8］している。そこでJCADノックアウトマウスに我々の「血栓症の生体イメージング」技術を最大限活かした研究を計画した。

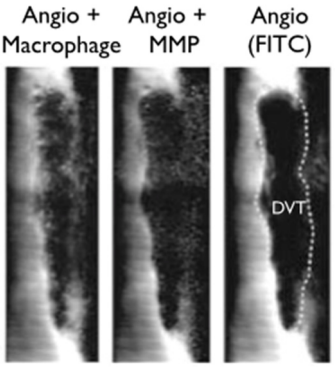


図2. 蛍光顕微鏡による分子イメージングの例

方　法

1. JCAD$^{-/-}$マウスを用いた血栓症の発生におけるJCADの影響の解明

独自に作製したJCAD$^{-/-}$マウスにおいて、申請者が近年、独自に開発した頚静脈結紮モデル［7］や、wire injuryによる大腿動脈血栓モデルにより、マウスに血栓を作製した。形成された血栓のサイズを野生型マウスとJCAD$^{-/-}$マウスで比較することによって、JCADが静脈および動脈血栓形成を制御することを直接的に明らかにする。

2. 培養細胞を用いたJCADの血栓形成にかかわる分子メカニズムの解明

培養ヒト血管内皮細胞（HUVECなど）にsiRNA等を用いてJCAD特異的なノックダウンや過剰発現を誘導し、トロンビン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる影響を分子細胞学的に検討する。具体的にはトロンビン刺激後の組織因子などの血栓性分子の発現変化や、Erkなどのシグナル伝達経路を比較する。

3. 生体血栓イメージングモデルの開発とそれを用いた静脈血栓の病態の解明

蛍光顕微鏡を用いた、生体血栓イメージングモデルを開発し、それを用いて、生体下に各種分子、細胞の挙動を可視化することによって、これまで不明であった深部静脈血栓症の形成機序を解明する。

結　果

1. JCAD$^{-/-}$マウスを用いた血栓症の発生におけるJCADの影響の解明

我々と共同研究グループは独自にJCADを同定し、血管内皮の接着部位に発現することを報告した。さらに、JCAD$^{-/-}$マウスの作製にも既に成功している。そのJCAD$^{-/-}$マウスにおいて、下大静脈にDVTを作製したところ、JCAD$^{-/-}$マウスでは大型のDVTが作製された（図3）。すなわち、JCADは抗血栓的に働く分子であることが生体で明らかとなった。

2. 培養細胞を用いたJCADの血栓形成にかかわる分子メカニズムの解明

培養ヒト血管内皮細胞（HUVECなど）にsiRNA等を用いてJCAD特異的なノックダウンや過剰発現を誘導し、トロンビン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる影響を分子細胞学的に検討した。VEGF刺激によるERKのリン酸化はJCADの特異的ノックダウンにより抑制されたが一方、AKTのリン酸化経路は抑制されなかった。またJCAD特異的ノックダウンによりVEGFRのリン酸化とその発現レベル自体も抑制された。

3. 生体血栓イメージングモデルの開発

蛍光顕微鏡による血栓形成過程を観察する中で、我々は偶然、血流低下状態においては、光感作物質の投与なしでも、蛍光顕微鏡観察に伴う光照射によって血栓形成が秒単位で形成されることを発見した。具体的にはマウスの大腿静脈を皮膚切開により露出し、中枢部を外科的に結紮する。結紮後も大腿静脈には複数の分枝が存在するため、それらを介して血流自体は遮断されず、血流低下のみが起こる。その状態で蛍光顕微鏡において大腿静脈を観察すると、秒単位で血栓が形成されていく過程が観察される。これは、蛍光顕微鏡による励起光照射という観察行為そのものが、血栓形成のトリガーとなるため、誘発と観察が同時に可能となる、画期的な生体イメージング法である。今後は、このモデルを用いて深部静脈血栓症の病態解明をすすめていく。

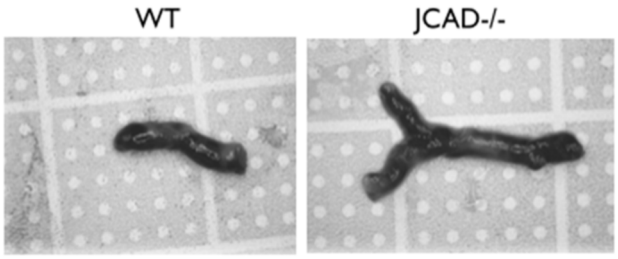


図3. JCADノックアウトマウスにおける大型DVTの形成

考　察

今回、我々はトロンビン刺激後のシグナル伝達におけるJCADの役割において、特にERKのリン酸化経路に影響していることを明らかにした。そしてJCAD発現の減少は、ノックダウンによる*in vitro*の実験結果によればトロンビン刺激によるERKのリン酸化を抑制し、組織因子の発現が亢進された。

これはおそらく、JCADはトロンビン刺激による血管内皮細胞の向血栓性変化のnegative feedback機構に何らかの機序を介して関わっており、トロンビン刺激のブレーキ的な役割を果たしていることが予想される。このブレーキであるJCADが生活習慣病による炎症性刺激で発現が低下することが、動脈硬化による動脈血栓、すなわち心筋梗塞の発症に影響するという、GWAS結果を説明しうる機序であると推測された。今後はより詳細な分子機序の解明により、このJCAD機能を制御することによる動脈硬化、血栓症の新規治療法の開発が望まれる。

今後は、本モデルで形成された血栓を経時的に生体下に観察を行い、その後の肺組織を解析することによって、肺塞栓の存在を明らかにし、世界初の実臨床に類似した肺塞栓症のモデルを確立することを目標にする。

さらに、本モデルの特徴であるリアルタイム生体イメージングという利点を最大限活用し、血栓が遊離する前後のMMP活性の局所性、塞栓症発症前後での変化など、血栓の各種分子の挙動の時空間的制御機構を明らかにすることによって、深部静脈血栓症の病態生理を解明することにつなげたい。

文 献

1) Peden JF, Hopewell JC, et.al. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. Nat Genet. 2011 ;43:339-44. DOI: 10.1038/ng.782

2) Erdmann J, Willenborg C, Nahrstaedt J, et al. Genome-wide association study identifies a new locus for coronary artery disease on chromosome 10p11.23. Eur Heart J. 2011;32:158-68. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq405

3) Akashi M, Higashi T, Masuda S, Komori T, Furuse M. A coronary artery disease-associated gene product, JCAD/KIAA1462, is a novel component of endothelial cell-cell junctions. Biochem Biophys Res Commun. 2011;413:224-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.073

4) van den Biggelaar M, Hernández-Fernaud JR, van den Eshof BL, Neilson LJ, Meijer AB, Mertens K, Zanivan S. Quantitative phosphoproteomics unveils temporal dynamics of thrombin signaling in human endothelial cells. Blood. 2014;123(12):e22-36. DOI: 10.1182/blood-2013-12-546036

5) Akashi M, Higashi T, Masuda S, Komori T, Furuse M. A coronary artery disease-associated gene product, JCAD/KIAA1462, is a novel component of endothelial cell-cell junctions. Biochem Biophys Res Commun. 2011;413:224-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.073

6) 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/KIAA1462, a Coronary Artery Disease-associated Gene Product, Inhibits Angiogenic Processes in Vitro and in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1667-1673. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309721

7) Hara T, Truelove J, Tawakol A, Wojtkiewicz GR, Hucker WJ, MacNabb MH, Brownell AL, Jokivarsi K, Kessinger CW, Jaff MR, Henke PK, Weissleder R, Jaffer FA. ^{18}F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography enables the detection of recurrent same-site deep vein thrombosis by illuminating recently formed, neutrophil-rich thrombus. Circulation. 2014 23;130:1044-52. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008902

8) Hara T, Ughi GJ, McCarthy JR, Erdem SS, Mauskapf A, Lyon SC, Fard AM, Edelman ER, Tearney GJ, Jaffer FA. Intravascular fibrin molecular imaging improves the detection of unhealed stents assessed by optical coherence tomography in vivo. Eur Heart J. 2017;38:447-455. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv677