

平成30年6月6日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19398

研究課題名(和文)酸化ストレス制御因子による血管前駆細胞機能調節を介した血管内膜肥厚抑制機構

研究課題名(英文) Mechanism of inhibition of vascular neointimal hyperplasia by oxidative stress responsive factor through functional reparation of vascular progenitor cells

研究代表者

芦野 隆 (Ashino, Takashi)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：00338534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは、血管傷害後の内膜肥厚に関与し、動脈硬化の原因となる。本課題は、生体内において酸化ストレス防御の中心を担っているNrf2/Keap1システムによる血管内膜肥厚の抑制機構について検討を行った。その結果、血管傷害部位でNrf2の活性化と血管平滑筋細胞(VSMC)のアポトーシスが見られ、このVSMCアポトーシスは、Nrf2遺伝子欠損マウスで抑制された。以上の結果から、Nrf2/Keap1システムは、血管傷害後の内膜形成期で活性化され、新生内膜を形成するVSMCのアポトーシスを誘導することで、過剰な肥厚を抑制し、動脈硬化への進展を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Abnormal increases in vascular smooth muscle cells (VSMCs) after vascular injury are a key event in the neointimal hyperplasia followed by vascular occlusive diseases. Nrf2/Keap1 system plays a critical role in the oxidative stress response. I have previously found that Nrf2 plays an important role in neointimal hyperplasia after vascular injury. I further demonstrated that TUNEL-positive cells are detected in both the layers of neointima and media, which decreased Keap1 expression, 14 days after vascular injury in mice. Nrf2 deficient mice showed decreased TUNEL-positive cells and enhanced neointimal formation 14 days after vascular injury. In VSMCs, Keap1 depletion increased apoptotic morphological features such as annexin V binding and positive TUNEL staining. Pretransfection of VSMCs with Nrf2 siRNA inhibited apoptosis mediated by Keap1 siRNA. In summary, Keap1-Nrf2 system regulates VSMC apoptosis in the process of neointimal formation, thereby inhibiting VSMC hyperproliferation.

研究分野：毒性学

キーワード：動脈硬化 酸化ストレス 血管内膜肥厚 血管平滑筋細胞 アポトーシス Nrf2/Keap1

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患につながる動脈硬化の発症は、血管の細胞において活性酸素種 (ROS) の産生が増加する高血圧、高脂血症、喫煙などがリスクファクターとなっている。近年、ROS が血管内膜肥厚の原因となる血管平滑筋細胞 (VSMC) の遊走や増殖を促進させることが明らかとなり、酸化ストレスと動脈硬化進展の関連性がますます注目されている。一方で ROS は、生命活動 (エネルギー産生・免疫応答・創傷治癒 等) において常に産生され、情報伝達因子としての機能も担っていることから、その産生と消去を厳密に調節して恒常性を維持する必要がある。

転写因子 Nrf2 とその抑制性因子 Keap1 は、ROS センサーとして機能し、200 種類を超える抗酸化酵素や異物代謝酵素の遺伝子発現を統合的に制御する防御応答システムであり、生体内の恒常性維持において中心的な役割を果たしている。申請者は、血管内膜肥厚における酸化ストレス防御システムの役割に焦点をあて研究をおこない、Nrf2 システムが VSMC の遊走を制御することで、血管内皮傷害後の内膜肥厚を抑制することを見い出してきた。

近年、末梢血中の単核球系細胞が、血管傷害部位へ接着し、血管前駆細胞として VSMC へ分化後、増殖・遊走することにより、内膜肥厚が形成されることが示唆されている。これらの事象にも ROS の関与が推測できるが、ROS 産生を介した酸化ストレスによる血管内膜肥厚亢進のさらなる詳細なメカニズムおよび Nrf2/Keap1 システムによる抑制機構は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

我々は以前、Nrf2 が PDGF 刺激による ROS 依存性の VSMC 遊走を抑制することを報告した。本研究では、まだ明らかとなっていない血管修復段階初期から中期の VSMC 増殖制御における Keap1/Nrf2 システムの役割を解明することを目的に以下のことを到達目標として研究を行った。

- (1) 血管傷害後における Nrf2/Keap1 の発現変動と発現部位の特定
- (2) 血管傷害後の内膜肥厚段階における VSMC 増殖と Nrf2/Keap1 の役割
- (3) Nrf2/Keap1 による VSMC 増殖制御メカニズム

本研究の成果は、Nrf2/Keap1 システムによる酸化ストレス制御を介した動脈硬化進展の抑制機序の解明と、Nrf2 システムをターゲットとした虚血性心疾患の予防と治療への足がかりになると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ラット大動脈平滑筋細胞 (RASM 細胞) は、雄性 Sprague-Dawley ラット胸部大動脈からコラゲナーゼ/エラスターゼ溶液を用いた酵素消化法により単離した。RASM 細胞は、10% ウシ血清含有 DMEM 培地で培養し、使用 24 時間前に、血清非含有 DMEM 培地に交換した。

(2) 実験動物

実験動物は、C57BL/6 系雄性 8 週齢の野生型 (WT) または Nrf2 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた。遺伝子型は、PCR により決定した。

(3) ウェスタンブロット法

4% SDS 溶液に可溶化した細胞サンプルを SDS-PAGE 後、PVDF メンブランに転写した。各タンパク質は、酵素抗体化学発光法に基づき検出した。

(4) TUNEL 染色法

アポトーシスによる DNA 断片化の検出は、in situ cell death detection kit を用いて行った。

(5) Annexin V-Propidium iodide 染色

アポトーシス初期に生じるリン脂質の細胞膜の外側への表出は、annexin V apoptosis detection kit-FITC を用いて標識し、フローサイトメトリーで解析を行った。

(6) Caspase-3/7 活性化

Caspase-3/7 活性測定用の CellEvent Caspase-3/7 Green reagent および Hoechst 33342 で細胞を処理し、一定時間後に共焦点レーザースキャン顕微鏡またはフローサイトメトリーを用いて解析を行った。

(7) リアルタイム PCR 法

細胞または組織から全 RNA を抽出し、RNA を逆転写後、TaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR を行った。なお、検出した各 mRNA は恒常的に発現している β -アクトチン mRNA で補正した。

(8) 血管傷害モデルの作製

マウス大腿動脈の血管を切開し、0.38mm のストレートワイヤーを 5mm 以上血管に挿入し、内膜を傷害した。ワイヤーを取り除いた後、傷口を糸でしばり、1, 2, 4 週間後に傷害された血管を摘出した。

(9) 血管組織の免疫組織化学染色

5 μ m の厚さにスライスした切片を脱パラフィン後、10% 正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体、ビオチン標識二次抗体、ペルオキシダーゼ基質溶液の順で反応させた。対比染色として核染色を行った。

(10) 血管組織の免疫蛍光染色

5 μm の厚さにスライスした切片を脱パラフィン後、10%正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体、蛍光標識二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 血管傷害による Nrf2 の活性化

マウス大腿動脈にワイヤー傷害を施し、2週間後の血管組織におけるアポトーシス細胞を TUNEL 染色により観察したところ、Nrf2 が強発現している血管内膜および中膜層の VSMC で多く認められた (図 1)。さらに傷害血管における Keap1 の遺伝子発現が有意に減少していた (図 2)。これらの結果から、傷害血管部の VSMC において、Keap1 の発現低下に伴う Nrf2 の活性化が示唆された。

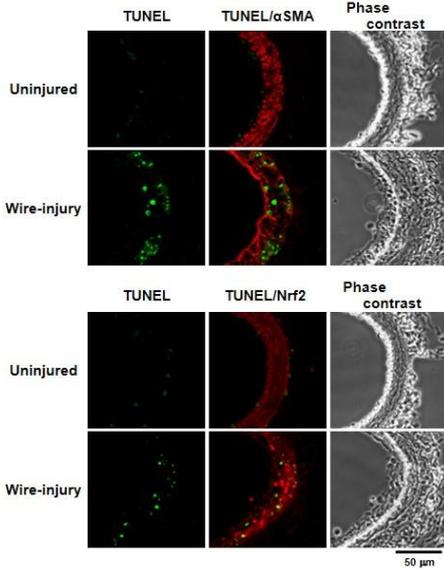


図 1 : 血管傷害による Nrf2 の蓄積とアポトーシス誘導 (文献①より転載)

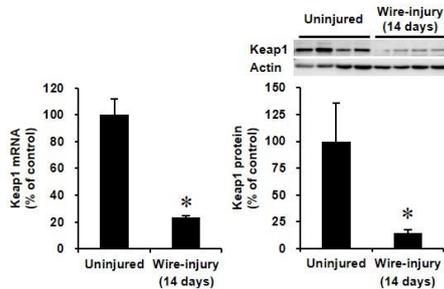


図 2 : 血管傷害による Keap1 発現低下 (文献①より転載)

(2) Nrf2/Keap1 による VSMC アポトーシス制御

血管傷害において Keap1 の発現低下が認められたことから、ラット大動脈 VSMC に Keap1 siRNA を処置し、内在性 Keap1 をノックダウンしたところ、核内 Nrf2 の著明な増加と標的遺伝子 Nqo1 と Hmox1 の誘導が見られた。また Keap1 のノックダウンにより核の凝縮を示す細胞が増加し、アネキシン-V の結合および TUNEL 染色陽性、Caspase-3/7 活性化といったアポトーシス誘導の所見を示した。このアポトーシスの所見は、Nrf2 siRNA のコトランスフェクションにより抑制された (図 3、図 4)。これらの結果から、Keap1 の機能不全による Nrf2 の活性化により VSMC のアポトーシスが引き起こされたことが示唆された。

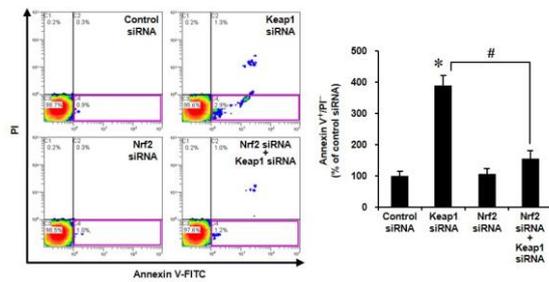


図 3 : Nrf2/Keap1 システムによる VSMC アポトーシス制御 (文献①より転載)

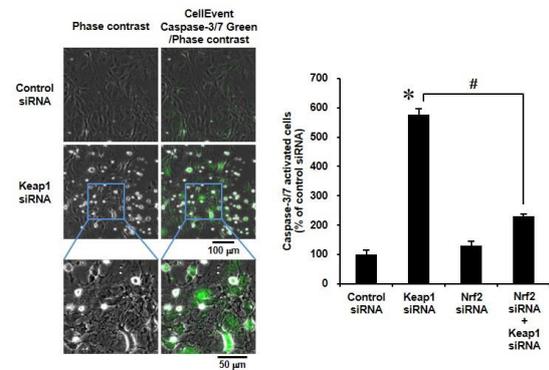


図 4 : VSMC の Caspase-3/7 活性化における Nrf2/Keap1 システムの役割 (文献①より転載)

(3) Nrf2-KO による血管傷害部位におけるアポトーシス細胞の減少

VSMC において、Keap1 ノックダウンによるアポトーシスの誘導は、Nrf2 の過剰な活性化によることが示唆されたことから、Nrf2-KO マウスに血管傷害を施し、傷害部位のアポトーシスを検出した。その結果、WT と比較して Nrf2-KO マウスにおいて有意なアポトーシス細胞数の減少がみられた (図 5)。

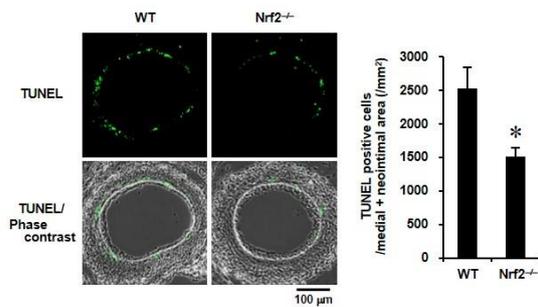


図5：Nrf2-KO マウスにおける血管傷害後アポトーシスの減少（文献①より転載）

以上の結果から、Keap1/Nrf2 システムは、血管傷害後の VSMC アポトーシス調節に関与することで血管リモデリングを調節していることが示唆された（図6）。これらの成果は、Nrf2 酸化ストレス防御システムが、血管組織において機能し、血管内膜肥厚に与する VSMC の機能制御を担うという新知見を報告できたと考える。さらに今後の Nrf2 やその標的遺伝子をターゲットにした虚血性心疾患の予防や治療法の探索に貢献できると考える。

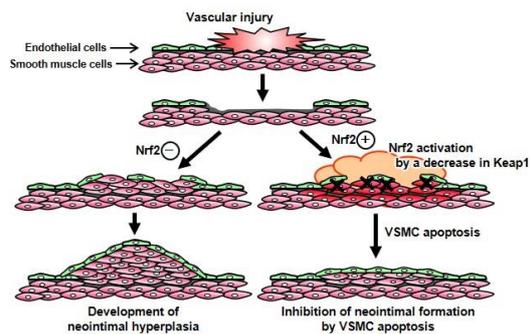


図6：Nrf2/Keap1 システムによる VSMC アポトーシス制御を介した血管傷害後内膜肥厚抑制機構（文献①より転載）

<引用文献>

① [Ashino T](#), Yamamoto M, Numazawa S
Nrf2/Keap1 system regulates vascular smooth muscle cell apoptosis for vascular homeostasis: role in neointimal formation after vascular injury
Sci Rep, 6:26291, 2016

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

① [Ashino T](#), Yamamoto M, Numazawa S
Nrf2/Keap1 system regulates vascular

smooth muscle cell apoptosis for vascular homeostasis: role in neointimal formation after vascular injury
Sci Rep, 6:26291, 2016（査読有）
doi: 10.1038/srep26291.

- ② [Yoshida T](#), [Ashino T](#), Kobayashi Y
（総説）Chemical-induced coordinated and reciprocal changes in heme metabolism, cytochrome P450 synthesis and others in the liver of humans and rodents
J Toxicol Sci, 41(Special):SP89-SP103, 2016（査読有）
doi: 10.2131/jts.41.SP89.
- ③ [芦野 隆](#), 沼澤 聡
（総説）Nrf2 酸化ストレス応答系による血管内膜肥厚制御
昭和学会雑誌, 75(2):120-5, 2015（査読有）
doi: 10.14930/jshowaunivsoc.75.120.

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① [芦野 隆](#), 寺島 実華子, 川添 祐美, 柴 肇一, 真鍋 厚史, 沼澤 聡
エンドトキシンショックによる多臓器障害における長鎖分割ポリリン酸の保護効果
日本薬学会第138年会（2018年3月、金沢）
- ② [芦野 隆](#), 山本 雅之, 沼澤 聡
Nrf2 欠損による薬物代謝能低下とシトクロム P450 誘導能の低下
フォーラム 2017：衛生薬学・環境トキシコロジー（2017年9月、仙台）
- ③ [芦野 隆](#), 山本 雅之, 沼澤 聡
Nrf2 欠損によるペントバルビタール代謝遅延とシトクロム P450 遺伝子発現抑制
第44回日本毒性学会学術年会（2017年7月、横浜）
- ④ 寺島 実華子, [芦野 隆](#), 田中 大貴, 瀧上 彩香, 川添 祐美, 柴 肇一, 真鍋 厚史, 沼澤 聡
エンドトキシンショックにおける長鎖分割ポリリン酸の致死率低下効果
第44回日本毒性学会学術年会（2017年7月、横浜）
- ⑤ [芦野 隆](#), 山本 雅之, 沼澤 聡
Nrf2 欠損マウスにおけるペントバルビタールの薬効延長と CYP2B 遺伝子発現低下
日本薬学会第137年会（2017年3月、仙台）

- ⑥ 綿山 真由、甘利 美佳、吉川 佳那、
芦野 隆、山本 雅之、沼澤 聡
Nrf2/Keap1 酸化ストレス応答システムによるマクロファージおよび血管平滑筋細胞遊走制御を介した血管内膜肥厚抑制機構
フォーラム 2016 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2016 年 9 月、東京)
- ⑦ 芦野 隆、山本 雅之、沼澤 聡
Monocyte chemotactic protein-1 による単球/マクロファージ浸潤、遊走におけるレドックス感受性転写因子 Nrf2 の役割
第 4 3 回日本毒性学会学術年会 (2016 年 6 月、名古屋)
- ⑧ 芦野 隆、山本 雅之、沼澤 聡
Nrf2 システムによる血管細胞アポトーシス調節を介した血管内膜肥厚抑制機能
日本薬学会第 1 3 6 年会 (2016 年 3 月、横浜)
- ⑨ 芦野 隆、山本 雅之、沼澤 聡
血管傷害後内膜肥厚形成段階の血管平滑筋細胞アポトーシスにおける Keap1/Nrf2 システムの役割
第 4 2 回日本毒性学会学術年会 (2015 年 7 月、金沢)

[その他]

ホームページ等

昭和大学薬学部毒物学部門ホームページ

(<http://www10.showa-u.ac.jp/~toxicol/index.htm>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦野 隆 (ASHINO, Takashi)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号 : 0 0 3 3 8 5 3 4