

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10653

研究課題名(和文)大動脈疾患における老化シグナルを介した血管リモデリング機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Vascular Remodeling through the Senescence Signal in Aortic Diseases

研究代表者

長澤 綾子(nagasawa, ayako)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：20768999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今研究は大動脈疾患における細胞老化の果たす役割に解明が目的であり、12週齢野生型マウスに高容量AngIIを14日間投与した大動脈疾患モデルを作成し、老化マーカーを検証したところ、大動脈壁において蛋白レベルのp53上昇を認め、免疫染色で大動脈中膜へのp53の集積を確認した。次に平滑筋特異的細胞老化抑制・促進モデルマウスを作成し、高容量AngIIを投与して大動脈疾患の発症頻度を検証したところ、細胞老化モデルで有意に大動脈疾患発症率が低く、細胞老化抑制モデルの大動脈疾患発症率は有意に増加が見られた。以上より平滑筋の細胞老化は大動脈疾患発症に対して保護的であることが示唆され、さらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈瘤は血圧管理を主体とするリスク管理以外、瘤の拡大抑制に向けた直接的な医療介入ができず、大動脈解離の発症は事前に察知することが不可能である点が医療上問題である。大動脈瘤や急性大動脈解離といった大血管疾患が細胞老化を介して発症、進展するという仮説を検証するのが本研究の特色、かつ独創的な点である。本研究を遂行することで、これらの大動脈疾患に対し、細胞老化制御を介した全く新しい疾患概念や治療法を創出できると確信する。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate role of senescence cell in aortic diseases, dissection and aneurysm. In C57BL6/NCr mice, AngII infusion led to marked increase in p53 signal both in smooth muscle cells. To further test the role of p53-induced cellular senescence in aortic dissection, we generated transgenic models by genetically manipulating p53 with cre-lox system. We generated smooth muscle specific p53 gain (SMC-p53 O/E) or knockout models (SMC-p53 KO). Both models were subjected to high dose AngII (AngII; 2500ng/kg/min), and we found incidence of aortic dissection was more predominant in SMC-p53 KO mice compared to SMC-p53 O/E model. Aortic dissection develops when blood leaks through a tear in the inner layer of aorta. It is widely known that senescent cells become resistant for apoptosis. Our data indicates that cellular senescence in vascular cells has protective roles for the suppression of aortic dissection possibly by mediating an anti-apoptotic effect.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈疾患 細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化疾患の病態に DNA 損傷応答が中心的役割を果たすことがわかっており、DNA 損傷は酸化ストレス、テロメア不全等で誘導され、DNA 損傷-p53 シグナルを介して細胞老化が生じる。細胞老化に陥った細胞は、不可逆的な分裂停止と遺伝子発現プロファイルの変容が生じるが、老化細胞の蓄積により組織の機能的・構造的リモデリングが進行し、糖尿病や心不全、動脈硬化性疾患の病態基盤が形成されることが明らかとなってきた。これまで我々は、肥満や心不全時に p53 を介した白色内臓脂肪細胞老化によりこれらの病態が負に制御されることを明らかにした(Fig. 1A) (*Cell Metab* 2013, *Cell Metab* 2012, *Nat Med* 2009, 昨年 *Cell Metab* 2014 に総説を掲載)。また、全身のインスリン抵抗性や p53 レベルの上昇を介して進む心臓老化が心不全の基盤病態であることを報告した(*J Clin Invest* 2010, *Nature* 2007)。心不全時に心筋組織で p53 が上昇する細胞種の詳細は不明であったが、血管内皮細胞と骨髄由来炎症細胞の p53 レベルの上昇に伴い、これらの細胞に発現する細胞接着因子のレベルが上昇し、心臓炎症が惹起されることで心不全が増悪することを明らかにした(*J Mol Cell Cardiol* 2015)。我々はまた、肥満ストレス下で p53 レベルの上昇を介した血管内皮細胞老化が生じ全身の代謝不全が増悪することや、心筋梗塞患者の冠動脈内皮細胞で細胞老化が生じることも明らかにした(Fig. 1B) (*Cell reports* 2014, *Circulation* 2002)。血管の制御は組織の恒常性維持に不可欠な要素であり、血管不全により褐色脂肪不全が生じ、肥満に伴う全身の代謝異常が増悪することも最近明らかにした(*J Clin Invest* 2014)。大動脈瘤や大動脈解離は血管壁の脆弱性から発症、進展し、血管破裂を合併すると突然死する予後不良疾患である。大動脈瘤は破裂前にエコーや CT により検出することが可能であるが、瘤の拡大抑制に向けた医療は血圧管理を主体とする対症療法に限られ、大動脈解離は発症前に感知できない点が医療上問題である。血管壁の脆弱性からこれらの大動脈疾患が発症、進展すると考えられているが、分子メカニズムに関して不明な点が多く、両者にはいまだ満たされない医療ニーズが存在する。遺伝的背景から若年で発症するタイプの大動脈瘤も一部あるが、大動脈瘤の多くは糖尿病や高血圧、動脈硬化性疾患といった老化疾患に関連して増加する加齢疾患に分類される(*Nature* 2011)。大動脈瘤を基点に大動脈解離が発症、進展することも多く、これらの大動脈疾患の病態を解明することは疾患特異的医療を開発する上で急務である。上記のように我々はこれまで、肥満や糖尿病、心不全、心筋梗塞といった加齢疾患の病態が、細胞老化により促進することを報告してきたが、大動脈疾患における細胞老化の意義は殆どわかっていない。大動脈の血管壁は内膜(血管内皮細胞)、中膜(血管平滑筋細胞や弾性線維より構成)、外膜(線維芽細胞やコラーゲンより構成)から構成される。血管内膜、中膜の機能的・構造的リモデリングにより血管壁が脆弱となり、大動脈疾患が発症、進展すると考えられているが、本研究において血管壁構成細胞の細胞老化や代謝的リモデリングが持つ病的意義を明らかにすることが目的であった。

2. 研究の目的

大動脈瘤や大動脈解離は血管脆弱性を基礎に発症する病気である。そのため、病理学的に共通点を多く有し、中膜を構成する細胞である血管平滑筋細胞の減少や消失、弾性線維の破綻が共通した病理所見である。そこで、本研究において大動脈疾患における血管平滑筋細胞や血管内皮細胞の細胞老化や代謝不全の病的意義の解明を目指す。

3. 研究の方法

大動脈瘤や大動脈解離といった大動脈疾患において、血管壁の主要構成細胞である血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の細胞老化が果たす役割について解明することが本研究の目的である。そこで、細胞老化を制御する中心的な分子である p53 や p21 を Cre-lox システムを用いて細胞特異的に発現を上昇、および低下させた遺伝子改変マウスに大動脈疾患モデルを作成し、表現型の解析を行う。細胞老化による血管構成細胞の代謝的・構造的リモデリングに特に着目し、メタボローム解析、DNA マイクロアレイ解析等の網羅的解析で得られた結果をバイオインフォマティクス手法で検証し、その他必要なあらゆる分子生物学的手法を用いて大動脈疾患における細胞老化の病的意義を明らかにする。

1) 大動脈疾患モデルマウスの作成と表現型解析

高容量の AngII を 20 週齢前後の野生型マウスに短期間に大動脈疾患モデルを作成する方法 (2,500 ng/kg/min, 7 日間投与) (高容量 AngII 大動脈疾患モデル, *J Clin Invest* 2009) で大動脈疾患モデルを作成することを確認することができるため、本モデルを用いて大動脈疾患モデルを作成し、血管内皮細胞や平滑筋細胞の p53 や p21 といった老化マーカーを免疫染色や FACS 等で検証する。大動脈疾患モデルを作成したのちに、磁気細胞分離(MACS)や FACS を用いて病変部と非病変部やコントロールマウスの血管内皮細胞や血管平滑筋細胞を分離し、メタボローム解析や DNA マイクロアレイ解析を行い、これらの細胞の代謝的リモデリングを評価する。これまでの予備実験において、肺の血管内皮細胞を磁気細胞分離で分離し、メタボローム解析に

て細胞代謝を測定する系は既に構築しており、大動脈を用いて同様の系を確立する。また、我々は肥満ストレス下で血管内皮細胞において p53 の発現レベルが上昇することを確認しており、肥満モデルマウスに高脂肪食負荷を加えたマウスに高容量 AngII 大動脈疾患モデルを作成し、大動脈疾患の表現型が増悪するか検証する。加齢自体が大動脈疾患の発症リスクを増加させる点に着目し、加齢マウス (1-1.5 歳程度) や老化促進マウス (Zmpste24 KO(早老マウス))における血管壁構成細胞の細胞老化や代謝的リモデリングを検証しつつ、大動脈疾患モデルの表現型が増悪するか検証する。

2) ノックアウトマウスの表現型解析

血管平滑筋細胞の p53 や p21 を抑制したマウス (細胞老化抑制モデル) や、p53 を過剰発現したマウス (細胞老化促進モデル) に高容量の AngII を投与し、大動脈疾患が増悪するか検証する。また、Cdh5-Cre マウスと上記 floxed マウスを交配することで、血管内皮細胞特異的細胞老化抑制モデルや老化促進モデルを作成し高容量 AngII 投与下の表現型を検証する。さらに上記マウスに高脂肪食負荷を行い、大動脈疾患が増悪するか検証する。

4. 研究成果

1) 大動脈疾患モデルマウスの作成と表現型解析

高齢 C57BL6 系統マウスに高容量アンジオテンシン II(AngII)(2500ng/kg/min、7days)投与する大動脈疾患モデルマウス(J Clin Invest 2009) を改変し、12 週齢野生型マウスに高容量 AngII を 14 日間投与した大動脈疾患を作成し、p53 や p21 などの老化マーカーを検証した。大動脈壁において蛋白レベルの p53 上昇および mRNA レベルの p21 上昇を認め、免疫染色で大動脈中膜への p53 の集積を確認した。さらに、同野生型マウスに 4 週間の高脂肪食負荷を行い高容量 AngII 投与したところ、半数以上で大動脈疾患発症を認め既存の大動脈疾患モデル作成よりも発症頻度が高かった(同マウスは新規大動脈疾患モデルマウスとして特許申請予定)。高脂肪食負荷および AngII 投与マウスでは、蛋白レベルでの p53 の相加的な増加が確認された。細胞外マトリックス分解因子である metalloproteinase-2 についても Zymogram を用いて検証を行い、AngII 投与での上昇を認めたが、高脂肪食負荷および AngII 投与による相加的増加は認められなかった。

2) ノックアウトマウスの表現型解析

大動脈中膜における p53 の増加を認めたことから、p53 を平滑筋で過剰発現した平滑筋特異的細胞老化抑制モデルマウスと p53 を平滑筋で抑制した平滑筋特異的細胞老化促進モデルマウスを作成し、高容量の AngII を投与して大動脈疾患の発症頻度を検証したところ、平滑筋特異的細胞老化モデルマウスで有意に大動脈疾患発症率が低く、平滑筋特異的細胞老化抑制モデルマウスの大動脈疾患発症率は有意に増加が見られた。

以上より平滑筋における p53 の増加は大動脈疾患発症に対して保護的である可能性が示唆され、今後さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：清水 逸平
ローマ字氏名：Shimizu Ippei
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学総合研究科
職名：特任准教授
研究者番号（8桁）：60444056

研究分担者氏名：土田 正則
ローマ字氏名：Tsuchida Masanori
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学系
職名：教授
研究者番号（8桁）：60293221

研究分担者氏名：南野 徹
ローマ字氏名：Minamino Tohru
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学系
職名：教授
研究者番号（8桁）：90328063

(2)研究協力者

研究協力者氏名：奥田 修二郎
ローマ字氏名：Okuda Shujiroh

研究協力者氏名：曾我 朋義
ローマ字氏名：Soga Tomoyoshi

研究協力者氏名：青木 淳賢
ローマ字氏名：Aoki Junken

研究協力者氏名：早野 俊哉
ローマ字氏名：Hayano Toshiya

研究協力者氏名：崎村 健司
ローマ字氏名：Sakimura Kenji

研究協力者氏名：笹岡 俊邦
ローマ字氏名：Sasaoka Toshikuni

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。