

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08115

研究課題名(和文) 動脈硬化の進展抑制を指向した活性酸素の産生/消去スイッチング機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a switching mechanism between production and extinction of reactive oxygen species on vascular remodeling after injury

研究代表者

芦野 隆 (Ashino, Takashi)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：00338534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは、動脈硬化を引き起こすため、血管における活性酸素の産生と消去メカニズムを解明することは、虚血性心疾患の予防および治療への足がかりとなる。本研究では、血管において活性酸素産生に重要な働きをするIQGAP1が、血管平滑筋の遊走と血管傷害後の内膜肥厚を促進すること、一方、活性酸素消去に働くNrf2は、逆に抑制することを明らかにした。これらの知見は、新たな動脈硬化進展メカニズムの解明とともに、新規治療ターゲットとしてのIQGAP1とNrf2の可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化は、心筋梗塞や脳梗塞など、生命予後に直結する重大な病気の引き金となる。したがって、生体における酸化ストレスを制御メカニズムを解明することは、新たな動脈硬化の治療法につながる。本研究では、活性酸素産生を促進するIQGAP1および抗酸化酵素の発現に関わるNrf2の血管における機能解析を行ったところ、血管において、IQGAP1が動脈硬化の促進およびNrf2が抑制に関与することを明らかにした。これらの結果は、動脈硬化の治療標的となる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress induces arteriosclerosis. Therefore, to elucidate regulatory mechanisms of reactive oxygen species production and elimination leads to prevention and treatment of ischemic diseases. In this study, IQGAP1, a receptor tyrosine kinase binding scaffolding protein, enhanced PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration and neointimal thickening after vascular injury. Conversely, Nrf2, a key regulator of antioxidative enzymes, inhibited their events. These findings provide insight into IQGAP1 and Nrf2 as novel therapeutic targets for vascular remodeling and atherosclerosis.

研究分野：分子毒性学

キーワード：動脈硬化 血管内膜肥厚 酸化ストレス 血管平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

活性酸素 (ROS) は、創傷治癒や免疫応答などの生命活動において常に産生され、シグナル伝達因子として細胞機能を制御している。一方で、過剰かつ持続的な ROS の曝露は、酸化ストレスによる細胞の形質転換を引き起こし、組織機能を障害することで疾病形成に関与する。特に循環系システムは、高血圧、高脂血症など血管の細胞において ROS の産生を増加させるイベントが発生しやすく、ROS 制御不全による酸化ストレスが生じやすい。以上のことから生体には、血管機能の恒常性を維持し、動脈硬化の原因となる血管内膜肥厚を抑制するために、ROS 産生系と消去系を適切に切り替えるスイッチ機能が存在すると考えられる。

傷害血管の修復過程における過剰な ROS による酸化ストレスは、血管平滑筋細胞を収縮型から合成型へと形質転換させ、遊走・増殖を過剰に亢進させることで内膜肥厚を引き起こす。生体内には、酸化ストレス防御において中心的な役割を果たす Nrf2 システムが存在し、転写因子として抗酸化タンパク質群の発現を誘導することで ROS 消去系を活性化する。これまで申請者は、Nrf2 の血管恒常性維持機能に注目し、血管平滑筋細胞の Nrf2 システムによる酸化ストレス応答が、血管内膜肥厚を抑制することを明らかにしてきた。しかし、血管における ROS 産生系と消去系の相互連携およびスイッチ機能の存在と、その分子機構は現在まで明らかにされていない。

2. 研究の目的

IQ motif-containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1) は、細胞骨格である F-actin に結合し、細胞の配向を制御することで細胞遊走に関与する。また、増殖因子の受容体と共役することで、細胞内シグナル伝達の足場タンパク質として機能する分子である。近年、血管壁における主要な ROS 産生システムである NADPH オキシダーゼの構成因子 Rac1 に加え、抗酸化系である Nrf2 が IQGAP1 と相互作用することが報告された。以上のことから IQGAP1 は、ROS の産生系と消去系のスイッチとして機能することが示唆される。また、Nrf2 は、抗酸化酵素群の発現を統合的に制御する転写因子であり、酸化ストレス条件下で核に移行し、各種抗酸化酵素の遺伝子発現を誘導することで抗酸化能を高め恒常性維持に貢献する。本研究では、血管組織における酸化ストレス制御系の重要性と動脈硬化進展メカニズムを明らかにする目的で、ROS 産生系 IQGAP1 と消去系 Nrf2 に焦点を当て検討を行う。

動脈硬化の原因となる血管内膜肥厚の進展は、血管内皮傷害後の合成型血管平滑筋細胞の過剰な遊走が主体であり、ROS もその亢進に関与している。さらに近年、末梢血中の単核球系細胞画分が、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おり、ROS がこれを促進する可能性も示唆されている。本課題は、傷害血管修復に関与する血管平滑筋細胞と血管内皮傷害モデルを用いて、IQGAP1 と Nrf2 の動脈硬化形成における役割について明らかにする。

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。

マウス腹腔マクロファージは、3%チオグリコレートメディウムをマウス腹腔内に投与することで滲出させ、回収後、血清非含有 RPMI1640 培地に播種し、実験に用いた。

(2) 実験動物

実験動物は、C57BL/6 系雄性 8 週齢の野生型 (WT)、Nrf2 遺伝子欠損 ($^{-/-}$)、IQGAP1 $^{-/-}$ マウスを用いた。遺伝子型は、PCR により決定した。

(3) Modified Boyden chamber アッセイ法

細胞のケモタキシスは、8 μ m ポアサイズのトランスウェルチャンバーを用いた。チャンバー上方に細胞を播種し、血小板由来増殖因子 (PDGF) または単球走化性因子 (MCP-1) をチャンバー下側に処置し、8 時間後の遊走細胞数を計測した。

(4) Wound scratch アッセイ法

細胞をコンフルエントまで培養し、ピペットチップの先端で擦過し細胞を線状に剥離した後、PDGF を添加した。その後、経時的に撮影し、遊走速度を浸潤した細胞の面積を測定することで

評価した。

(5) 培養細胞の蛍光免疫染色法

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.05%トライトン X-100 で処理した。3%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、1次抗体で一晩処置した。PBS で洗浄後、蛍光標識された 2次抗体で 1時間処理し、その後対比染色として DAPI 溶液による核染色を行った。細胞の観察は、共焦点レーザー顕微鏡で行った。

(6) 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、経時的に傷害した血管を摘出した。

(7) 血管組織の蛍光免疫染色法

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、蛍光標識二次抗体の順で反応させた。対比染色として核染色を行った。

(8) 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 プロー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 -アクチン mRNA で補正した。

4. 研究成果

(1) 血管傷害後の内膜肥厚における IQGAP1 の役割

マウス大腿動脈ワイヤー傷害モデルを用いた *in vivo* 解析により、傷害血管の新生内膜肥厚部位の管腔側で IQGAP1 の強発現が見られた。さらに IQGAP1^{-/-}マウスでは、ワイヤー傷害による内膜肥厚が抑制された。これらの結果から、IQGAP1 が血管傷害後の新生内膜肥厚と動脈硬化進展に寄与していることが示唆された。ROS 産生に関与する IQGAP1 の発現が、血管平滑筋細胞の遊走能を強めることで、血管内膜肥厚を引き起こしていると考えられる。

(2) 血管傷害後の内膜肥厚における Nrf2 の役割

Nrf2^{-/-}マウスでは、ワイヤー傷害による新生内膜肥厚が亢進することを以前に明らかにしている。内膜肥厚は、傷害初期における傷害部位への白血球系細胞の接着が起点となる。そこで、傷害初期における白血球系細胞の接着における Nrf2 の役割について検討したところ、Nrf2^{-/-}マウスにおいて、傷害 7 日後に血管傷害部へ白血球細胞の接着、浸潤が有意に増加した。さらに蛍光免疫染色により、血管傷害により血管内膜に接着した細胞は、F4/80 陽性細胞であったことから単球/マクロファージ系の細胞であり、Nrf2 と共局在していた。そこで次に WT および Nrf2^{-/-}マウス由来の骨髄を移植することにより骨髄細胞の Nrf2 の関与について検討した。骨髄移植を施行し、血管傷害部位への単球/マクロファージの接着を見た結果、Nrf2^{-/-}由来の骨髄細胞を移植された WT マウスは、単球/マクロファージの接着、浸潤が増悪し、逆に WT 由来の骨髄細胞を移植された Nrf2^{-/-}マウスは、抑制された。以上の結果から、骨髄細胞における Nrf2 による抗酸化能は、単球/マクロファージの傷害血管への接着、浸潤を制御し、血管内膜肥厚抑制に関与していることが示唆された。

(3) 血管平滑筋細胞遊走における IQGAP1 の役割

血管平滑筋細胞の遊走活性を持つ PDGF 刺激により、IQGAP1 はリーディングエッジ部位に移行し、アクチン繊維形態の制御および ROS 産生に関与する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 Rac1 と共局在することが明らかになった。そこで、siRNA を用いた IQGAP1 ノックダウンによる効果を検討したところ、PDGF による VSMC 遊走が抑制された。これら *in vitro* による検討により、IQGAP1 は Rac1 と共役することで、遊走を制御していることが示唆された。

(4) マクロファージ遊走における Nrf2 の役割

血管傷害により血管内膜に接着した白血球細胞が Nrf2 を強発現した単球/マクロファージ系の細胞であること、また Nrf2^{-/-}マウスでは、単球/マクロファージ系の細胞の接着が亢進することを明らかにした。単球/マクロファージ系の細胞の遊走には、MCP-1 が関与するが、傷害血管における MCP-1 の発現誘導には、WT および Nrf2^{-/-}マウスに差はなかった。そこで、WT および Nrf2^{-/-}マウスから単離したマクロファージに MCP-1 を処置したところ、WT 細胞においては、Nrf2 の核移行とともに、Nrf2 の標的遺伝子であるヘムオキシゲナーゼ-1 とチオレドキシシンが誘導した。さらに、MCP-1 による細胞遊走が Nrf2^{-/-}細胞で亢進した。

以上の結果から、骨髄細胞における Nrf2 による抗酸化能は、MCP-1 による単球/マクロファージの傷害血管への接着、浸潤を制御し、血管内膜肥厚抑制に関与していることが示唆された。これらの知見は、新たな動脈硬化進展メカニズムの解明とともに、新規治療ターゲットとしての Nrf2 の可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ashino Takashi, Kohno Takashi, Sudhakar Varadarajan, Ash Dipankar, Ushio-Fukai Masuko, Fukai Tohru	4. 巻 315
2. 論文標題 Copper transporter ATP7A interacts with IQGAP1, a Rac1 binding scaffolding protein: role in PDGF-induced VSMC migration and vascular remodeling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C850-C862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00230.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Terashima-Hasegawa Mikako, Ashino Takashi, Kawazoe Yumi, Shiba Toshikazu, Manabe Atsufumi, Numazawa Satoshi	4. 巻 159
2. 論文標題 Inorganic polyphosphate protects against lipopolysaccharide-induced lethality and tissue injury through regulation of macrophage recruitment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 96-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2018.11.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ashino Takashi, Yamamoto Masayuki, Numazawa Satoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Nrf2 antioxidative system is involved in cytochrome P450 gene expression and activity: a delay in pentobarbital metabolism in Nrf2-deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 673-680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/dmd.120.000010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 服部 夏実、光本（貝崎）明日香、芦野 隆、山本 雅之、沼澤 聡
2. 発表標題 MARTAオランザピン誘発酸化ストレスへの応答性には性差がある
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井 俊一、藤森 央基、渡部 真由、芦野 隆、沼澤 聡
2. 発表標題 血小板由来増殖因子による血管平滑筋遊走における活性イオウ分子の遊走抑制のメカニズム
3. 学会等名 フォーラム2020：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芦野 隆、中村 祐輝、大滝 博和、岩倉 洋一郎、沼澤 聡
2. 発表標題 盲腸結紮穿刺誘発敗血症による肝シトクロムP450発現変動における炎症性サイトカインの役割
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芦野 隆、石坂 優太、柳町 有人、中村 祐輝、大滝 博和、岩倉 洋一郎、沼澤 聡
2. 発表標題 盲腸結紮穿刺誘発敗血症による肝薬物排泄トランスポーター発現変動における炎症性サイトカインの役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井 俊一、渡部 真由、芦野 隆、沼澤 聡
2. 発表標題 血小板由来増殖因子による血管平滑筋細胞遊走における活性イオウの役割と抑制メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 祐輝、芦野 隆、大滝 博和、渡邊 潤、岩倉 洋一郎、沼澤 聡
2. 発表標題 炎症性サイトカイン遺伝子欠損マウスを用いた盲腸結紮穿刺誘発性敗血症におけるシトクロムP450変動の検討
3. 学会等名 フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ashino T, Yamamoto M, Numazawa S
2. 発表標題 Nrf2/Keap1 oxidative stress-responsive system inhibits neointimal hyperplasia response to vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell migration and apoptosis
3. 学会等名 IUTOX 15th International Congress of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦野 隆、山本 雅之、沼澤 聡
2. 発表標題 酸化ストレス防御因子Nrf2によるマクロファージおよび血管平滑筋細胞の接着、遊走制御を介した動脈硬化抑制機能
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦野 隆、河野 隆志、Sudhakar V、Ash D、深井 真寿子、深井 透
2. 発表標題 銅トランスポーターATP7Aによるスキャホールドタンパク質IQGAP1結合を介した血管平滑筋細胞遊走制御と新生内膜肥厚への役割
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦野 隆、寺島 実華子、川添 祐美、柴 肇一、真鍋 厚史、沼澤 聡
2. 発表標題 無機ポリリン酸によるマクロファージ遊走抑制を介したリポポリサッカライド誘発致死性ショック保護作用
3. 学会等名 フォーラム2018：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺島 実華子、芦野 隆、川添 祐美、柴 肇一、沼澤 聡、真鍋 厚史
2. 発表標題 長鎖ポリリン酸のマクロファージ活性化抑制作用とエンドトキシンショックモデルの致死率改善効果
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 喜貴、芦野 隆、川添 祐美、柴 肇一、沼澤 聡
2. 発表標題 腹膜炎モデルにおける長鎖分割ポリリン酸の致死率改善効果
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学薬学部基礎医療薬学講座毒物学部門ホームページ
<https://www.showa-u.ac.jp/education/pharm/major/toxicol.html>
 昭和大学薬理科学研究センターホームページ
<https://www.showa-u.ac.jp/research/prc/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------