

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2018～2019

課題番号：18KK0437

研究課題名（和文）急性心筋梗塞におけるNASHと血管内皮ADAM17の役割の解明

研究課題名（英文）The role of endothelial ADAM17 in NASH and cardiovascular disease

研究代表者

宮尾 昌（Miyao, Masashi）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90711466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,900,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：私たちは急性心筋梗塞におけるNASHと血管内皮ADAM17の役割の解明を目指した。私たちはラット胸部大動脈内皮由来の初代培養細胞を用いて、ADAM17と関連の深いアンジオテンシン投与をすることで、内皮細胞老化と心血管疾患発症メカニズムにミトコンドリアの分裂と小胞体ストレスが原因となり、炎症反応を誘導することが関連していることを明らかにした。さらに、ミトコンドリア分裂抑制、小胞体ストレス抑制、Senolytic drug が血管内皮細胞老化の治療戦略に繋がる可能性を示した。この研究成果は加齢関連の心血管疾患の治療法開発に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、全世界で人口の高齢化が進んでおり、高齢化に伴うヒトの健康障害、予防可能な死を抑制することが持続可能な社会の発展にとって重要である。私たちはヒトの予防可能な「加齢」にアンジオテンシンというホルモンが関連し、そのメカニズムにミトコンドリアの分裂、小胞体ストレス、炎症反応が重要であることを明らかにした。このように、ヒトの予防可能な「加齢」と心臓血管疾患の関係性を明らかにすることで、急速に進む人口の高齢化に伴う予防可能な死や健康障害を抑えるための実行可能性の高い予防、治療法の開発に繋げていきたい。

研究成果の概要（英文）：Angiotensin II (AngII) has a crucial role in cardiovascular pathologies. However, the precise molecular mechanism underlying aging-related endothelial inflammation induced by AngII remains elusive. We have tested a hypothesis in cultured rat aortic endothelial cells (ECs) that the removal of AngII-induced senescent cells, preservation of proteostasis, or inhibition of mitochondrial fission attenuates the pro-inflammatory EC phenotype. AngII stimulation in ECs resulted in cellular senescence. The AngII-induced senescence was attenuated by treatment with a senolytic drug, an ER stress inhibitor, or a mitochondrial fission inhibitor. Pro-inflammatory phenotype in EC induced by AngII was alleviated by these treatments. These findings suggest that mitochondrial fission and endoplasmic reticulum stress have causative roles in endothelial senescence-associated inflammatory phenotype induced by AngII exposure, thus providing potential therapeutic targets in age-related cardiovascular diseases.

研究分野：法医学

キーワード：法医病理学

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

本国際共同研究では、急性心筋梗塞における NASH と血管内皮 ADAM17 の役割の解明を目指す。急性心筋梗塞と非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、内皮障害が病態に関連することが分かっている。内皮を含む全身の細胞には、A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 17 (ADAM17) が発現しており、この ADAM17 が炎症性サイトカインの TNF を活性化させることが知られている。しかし、これまでに血管内皮の ADAM17 が NASH や急性心筋梗塞発症に関連するかは分かっていない。

2. 研究の目的

本国際共同研究では、急性心筋梗塞における NASH と血管内皮 ADAM17 の役割の解明を目指す。基課題である NASH を背景とした急性心筋梗塞への臓器間クロストークの影響は、主に肝臓特異的な血管の類洞内皮に注目した研究であるが、本国際共同研究で標的とする ADAM17 は全ての血管内皮に発現され、代表的な炎症性サイトカインの TNF を活性化させる。また、基課題研究の標的である類洞内皮の病理学的変化を進展させ、全身の血管内皮障害と NASH や急性心筋梗塞の病態が関連するかどうかを解明するため、血管内皮特異的 ADAM17 欠損モデルマウスの形態・機能変化を解析する。具体的な研究目的は以下である。

A. NASHモデルマウスにおける内皮障害とADAM17の発現解析

B. 急性心筋梗塞発症におけるNASHと血管内皮ADAM17の関連

C. 血管内皮特異的ADAM17欠損モデルにおける急性心筋梗塞とNASHの関連

3. 研究の方法

血管内皮特異的 ADAM17 欠損モデルマウスの形態・機能変化を解析する。研究期間内には以下のことを明らかにする。

A. NASHモデルマウスにおける内皮障害とADAM17の発現解析

8週齢の C57BL/6 マウスに高脂肪食を 4 週間投与し NASH モデルを作製する。マウスの心臓、大動脈、肝臓を摘出し組織標本を作製し 12 週齢の対照群と比較し、それぞれの臓器の血管内皮障害を病理学的に評価するとともに ADAM17 の発現と分布変化を免疫組織学的に分析する。また、それぞれの臓器の凍結標本も作製し、ウェスタンブロットや RT-PCR で ADAM17 や TNF などの炎症性サイトカインのタンパク質と mRNA の定量解析を行うことで、NASH における内皮障害と ADAM17 の発現変化の関連を明らかにする。

B. 急性心筋梗塞発症におけるNASHと血管内皮ADAM17の関連

12 週齢の対照マウスと 8 週齢から 4 週間高脂肪食を投与した NASH モデルマウスの両群に、麻酔下で左冠動脈前下行枝の結紮を施し急性心筋梗塞モデルを作製する。術後 3 日後までの生存率を Kaplan-Meier 法とログランク検定で比較し、両群の生存したマウスの心臓、大動脈、肝臓を摘出し、病理学的評価を行うとともに ADAM17 の発現変化を免疫組織学的、ウェスタンブロット、RT-PCR で解析することで、NASH と血管内皮 ADAM17 が急性心筋梗塞病態に関連するかを解明する。

C. 血管内皮特異的ADAM17欠損モデルにおける急性心筋梗塞とNASHの関連

血管内皮特異的 ADAM17 欠損モデルを用いて、上記 B と同様のプロトコールで実験を行い、野生型と内皮特異的 ADAM17 欠損モデルを比較し、生存率と心臓、大動脈、肝臓の病理学的、機能学的変化を評価することで、血管内皮 ADAM17 が NASH とともに急性心筋梗塞病態に因果関係のレベルまで掘り下げて関連を解明する

4. 研究成果

当初の計画では ADAM17 欠損モデルマウスを用いて ADAM17 が内皮障害に直接関連するかどうかを解析する予定であったが、動物実験を行う前の倫理講習や当該施設での動物飼育や管理の effort、他研究者の負担が大きく、1 年間と短い期間であったため、動物実験よりも effort を少なく、すぐに実験を開始できる初代培養細胞を用いた細胞老化との関連を調べることとした。具体的には、ラット胸部大動脈内皮由来の初代培養細胞を用いて、ADAM17 がその病態に主に働くことが知られている Angiotensin II 投与をすることで細胞老化や白血球との接着に変化が現れるかどうかを調べるため、B-gal 染色と THP1 アッセイを行った。また、細胞老化を誘導することが知られている p16 をアデノウイルスを用いてサイレンシングした場合に細胞老化や白血球の接着に変化が現れるかを同様の実験で確認した。その結果、アンジオテンシン誘導性の血管内皮細胞の老化には、ミトコンドリアの分裂と小胞体ストレスに伴う異常タンパク質の蓄積が原因となり、内皮細胞と白血球の接着などの炎症反応を誘導することが関連していることを明らかにした。さらに、ミトコンドリア分裂抑制、小胞体ストレス抑制、Senolytic drug がアンジオテンシン誘導性の血管内皮細胞老化の治療戦略に繋がる可能性を示した。この

研究成果は加齢関連の心血管疾患の治療法開発に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Forrester SJ, Preston KJ, Cooper HA, Boyer MJ, Escoto KM, Poltronetti AJ, Elliott KJ, Kuroda R, Miyao M, Sesaki H, Akiyama T, Kimura Y, Rizzo V, Scalia R, Eguchi S.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Mitochondrial Fission Mediates Endothelial Inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14686.	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 Miyao M, Cicalese S, Kawai T, Cooper HA, Boyer MJ, Elliott KJ, Forrester SJ, Kuroda R, Rizzo V, Hashimoto T, Scalia R, Eguchi S.	4. 巻 21(9)
2. 論文標題 Involvement of Senescence and Mitochondrial Fission in Endothelial Cell Pro-Inflammatory Phenotype Induced by Angiotensin II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 E3112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21093112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Jemal L, Miyao M, Hamayasu H, Minami H, Abiru H, Baba S, Osamura T, Tamaki K, Kotani H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Fatal Mumps Myocarditis Associated With Left Ventricular Non-Compaction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Case Reports	6. 最初と最後の頁 e921177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12659/AJCR.921177.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyao M, Cicalese S, Cooper HA, Eguchi S.	4. 巻 133(19)
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial biogenesis are potential therapeutic targets for abdominal aortic aneurysm.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Science	6. 最初と最後の頁 2023-2028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/CS20190648.	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hannah Cooper, Masashi Miyao, Tatsuo Kawai, Kyle Preston, Kathy Elliott, Rosario Scalia, Victor Rizzo, Satoru Eguchi
2. 発表標題 Mitochondrial Fission in Vascular Cells Mediates Hypertensive Vascular Remodeling and Inflammation.
3. 学会等名 American Heart Association's Hypertension 2019 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Stephanie M Cicalese, Hannah Cooper, Tatsuo Kawai, Masashi Miyao, Kyle Preston, Victor Rizzo, Rosario Scalia, Satoru Eguchi
2. 発表標題 Inhibition of Ang II-Induced Mitochondrial Fission and Endoplasmic Reticulum Stress Attenuates Protein Aggregate Accumulation, Inflammation, and Senescence in Vascular Smooth Muscle Cells.
3. 学会等名 American Heart Association's Hypertension 2019 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://www.fp.med.kyoto-u.ac.jp/
--

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
その他の研究協力者	Eguchi Satoru (Eguchi Satoru)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
その他の 研究協 力者	Scalia Rosario (Scalia Rosario)		