

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11675

研究課題名(和文) 糖尿病による動脈硬化における平滑筋細胞オートファジー機能の解析

研究課題名(英文) the role of vascular smooth muscle cell autophagy against diabetes related atherosclerosis

研究代表者

三田 智也 (Mita, Tomoya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90532557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心血管イベント発症のハイリスクである糖尿病において、オートファジーの機能低下が動脈硬化の発症進展に関与する可能性がある。今回、糖尿病を誘発した平滑筋特異的オートファジー機能低下マウスにリン、ビタミンDを投与すると、コントロールに比較して、大動脈弁周囲の石灰化面積率が有意に増加していた。従って、糖尿病を基盤とする動脈硬化における石灰化病変の進展抑制に関して、オートファジーが新たなターゲットになる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりオートファジーの機能低下が血管の石灰化を促進することが示された。この研究の成果により、2型糖尿病患者の石灰化病変の進展抑制に関して、オートファジーをターゲットとした新しい動脈硬化抑制薬の開発につながる可能性があり、臨床上也極めて意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diabetes is an independent risk factor for cardiovascular disease. Autophagy dysfunction may contribute to the onset and progression of atherosclerosis in diabetic condition. In this study, we demonstrated that streptozotocin induced diabetic smooth muscle cells specific autophagy dysfunction mice fed with high phosphorus diet and administered with vitamin D had more aortic calcified lesion than control diabetic mice. Based on the possible implication of smooth muscle autophagy, the induction of autophagy may be a potential therapeutic strategy against the progression of aortic calcification.

研究分野：糖尿病学

キーワード：オートファジー 動脈硬化 糖尿病 平滑筋細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化病変の形成は内皮細胞の炎症、単球の接着と遊走やマクロファージによる炎症以外にも、平滑筋細胞の増殖と遊走、アポトーシスといった複雑に絡み合ったメカニズムで構成されている。このような動脈硬化に多岐に関与する平滑筋細胞にもタンパク質や細胞内小器官を分解するオートファジーが存在し、重要な役割を果たしている。私たちは、最近、血管平滑筋細胞のオートファジー機能不全モデルマウスでは、平滑筋細胞の細胞死や老化が増加し、動脈硬化が進展することやプラークの不安定性が増加することを明らかにした (*Osonoi Y, Autophagy 2018, Masuyama A. BBRC 2018*)。

さらに、心血管イベントのハイリスク群である2型糖尿病患者から抽出した血管内皮細胞ではオートファジー機能が低下し、血管内皮機能が障害されていることが報告されている (*Fetterman JL. Atherosclerosis 2016*)。また、高血糖により形成される終末糖化産物 (AGEs) が、血管平滑筋細胞のオートファジー機能を低下させることが示されており (*Ma M. Mol cell Biochem 2015*)、実際に、糖尿病誘発マウスでは、平滑筋細胞のオートファジー機能が低下し、動脈硬化が進展することが報告されている (*Lazaro I. Front Pharmacol 2018*)。以上より、糖尿病においても、オートファジーの機能低下が動脈硬化の発症進展に関与する可能性がある。

一方で、糖尿病で認められるメンケベルグ型血管中膜石灰化は、血管平滑筋細胞を中心に形成され、大動脈～細動脈まで広い範囲で観察される。この病態には、血管平滑筋細胞のアポトーシスや骨・軟骨細胞への分化転換が関与していることが報告されている。糖尿病状態では、AGEsにより、平滑筋細胞の骨芽細胞への分化転換が石灰化を引き起こす要因になりうることを示されている (*Suga T, J Atheroscler Thromb 2011*)。さらに、腎不全状態で増加する無機リンは、血管平滑筋細胞の骨芽細胞への分化転換を促進させ、石灰化を誘導する (*Giachelli CM, Circ Res 2005*)とともに、平滑筋細胞のアポトーシスの増加を介して石灰化を誘導することも報告されている (*Son BK, Circ Res 2006*)。これらの事実から、ある stage 以上の糖尿病腎臓病 (DKD) では高血糖と高リン血症により平滑筋細胞の石灰化が促進され、動脈の複雑性病変形成・進展に寄与すると考えられる。しかし、血管平滑筋細胞のオートファジー機能低下が糖尿病に特徴的とされる石灰化病変に与える影響は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、その病態形成に血管平滑筋細胞オートファジー不全が関与する可能性を検討する。具体的には、平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスに高血糖、高リン食負荷を行い、大血管の中膜における石灰化病変形成を評価するとともに、その分子機序の解明のため、平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスから単離培養した培養血管平滑筋細胞にリンおよび高血糖状態で増加する AGEs を負荷し、平滑筋細胞のアポトーシスや骨芽細胞への分化転換を評価する。これらの研究により糖尿病を基盤とする動脈硬化における石灰化病変の進展抑制に関して、オートファジーをターゲットとした新規の動脈硬化抑制薬の開発の礎としたい。

### 3. 研究の方法

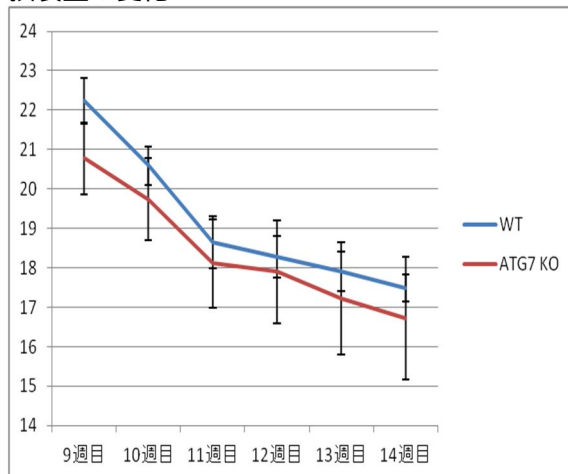
平滑筋特異的オートファジー欠損モデルマウスを作製し、動脈硬化誘発モデルでその機能解析を行うこととした。Atg7<sup>f/f</sup> マウス (Atg7, 隔離膜からのオートファゴソーム形成に関わっている

オートファジーに必須の分子である)に SM22-Cre<sup>tg</sup> マウスを交配し血管平滑筋特異的 Atg7 欠損マウス(SM22-Cre;Atg7<sup>f/f</sup>)を作製した。平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスおよびコントロールマウスに、ストレプトゾシン 4mg/kg を腹腔内に単回投与し、糖尿病を誘発した群(糖尿病平滑筋特異的 Atg7 欠損マウス、糖尿病コントロールマウス)の計 2 群のモデルマウスを作製した。これらのマウスに 4 週間高リン食を負荷し、さらに、4 週目にビタミン D であるカルシトールを 3 日間連続皮下投与し、石灰化を誘導する。摘出した大動脈から大動脈弁領域や大動脈の切片を作成し、コッサ染色で石灰化性病変や TUNEL 染色でアポトーシス陽性細胞などを定量評価する。

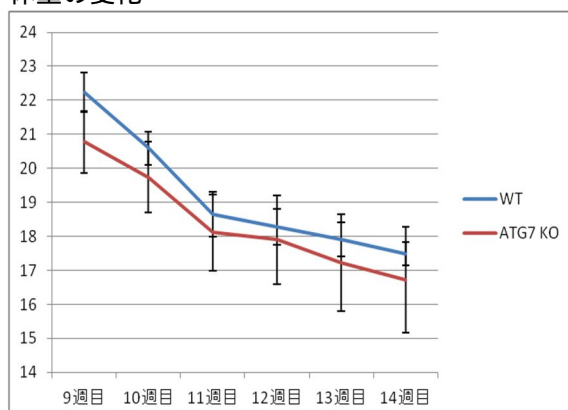
#### 4. 研究成果

(1) 平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスおよびコントロールマウスに、ストレプトゾシン 4mg/kg を腹腔内に単回投与し、これらのマウスに 4 週間高リン食を負荷し、さらに、4 週目にビタミン D であるカルシトールを 3 日間連続皮下投与した。試験中、糖尿病平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスおよび糖尿病コントロールマウスの群間で摂取量や体重に有意な差は認めなかった。

摂食量の変化

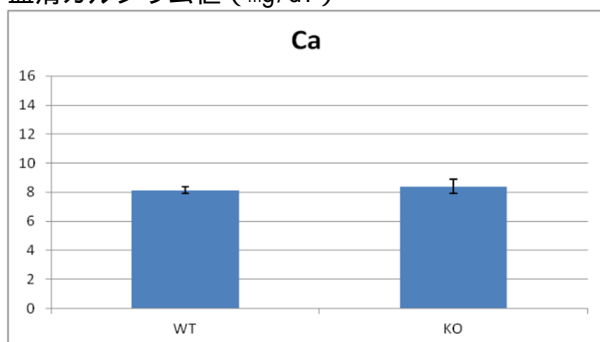


体重の変化

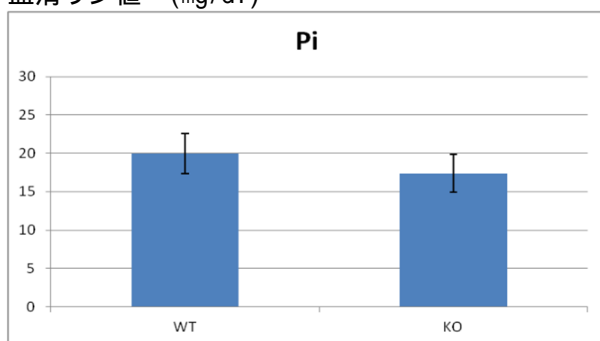


(2) マウスに 4 週間高リン食を負荷し、さらに、4 週目にビタミン D であるカルシトールを 3 日間連続皮下投与した後の血清カルシウムと血清リンの値に群間で有意な差はなかった。

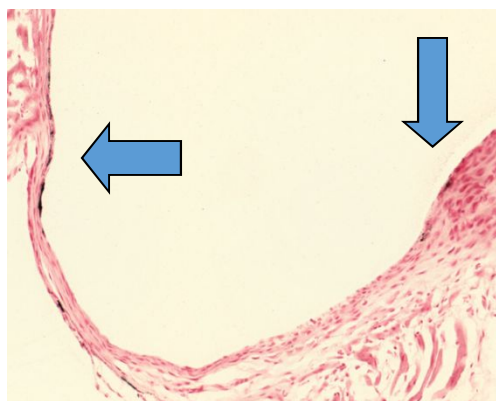
血清カルシウム値 (mg/dl)



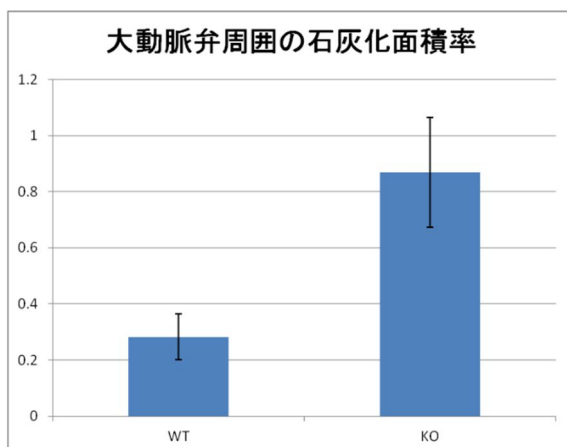
血清リン値 (mg/dl)



(3) 試験終了後、摘出した大動脈から大動脈弁領域や大動脈の切片を作成し、コッサ染色で石灰化性病変を評価した。糖尿病コントロールマウスに比較して糖尿病平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスでは大動脈弁周囲の石灰化面積率は有意に増加していた。



コッサ染色陽性部位



糖尿病コントロールマウス vs 糖尿病平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスの大動脈弁周囲の石灰化面

積率(P<0.05)

以上より、血管平滑筋細胞のオートファジー機能低下した状態では、高血糖と高リン血症により平滑筋細胞の石灰化が促進され、動脈硬化が進展する可能性がある。

#### 今後の展望

最近の研究では、AGEs を平滑筋細胞に負荷するとオートファジーが抑制され、骨芽細胞への分化転換や石灰化が引き起こされることが明らかになった(Liu Y et al Mol Cell Biochem. 2020 Aug;471(1-2):91-100)。ラット平滑筋細胞のセルラインである A7R5 に AGEs を負荷するとウシ血清アルブミンと負荷した場合に比較して骨誘導因子 BMP2 や RUNX2 などの骨芽細胞の分化に関連する蛋白質の発現が増加していた。AGEs による BMP2 や RUNX2 の発現増加はオートファジーを誘導するラパマイシンを投与により抑制された。長時間の AGEs 投与により、LC3-II や BECN などオートファジーに関連する因子の発現は低下し、電子顕微鏡で評価したオートファゴソームゴソームの数は、ウシ血清アルブミンを投与した場合と比較して、AGE を投与した場合には低下していた。オートファジーの抑制には、AGE 投与による AMPK/mTOR 経路の抑制が関わっている可能性が示されている。

また、ウシ血管平滑筋細胞にリンを負荷すると LC3-II に発現が増加し、リソソーム阻害薬であるクロロキン投与によりリン負荷による LC3-II の発現がさらに増加することや電子顕微鏡で評価したオートファゴソームゴソームの数が増加することから、リンは平滑筋細胞においてオートファジーを誘導すると考えられる(Di XY et al Kidney Int. 2013 Jun;83(6):1042-51)。スーパーオキシドディスムターゼ2の過剰発現やナトリウム依存性リン共輸送担体のノックアウトでオートファジーが抑制されたため、リンにより誘導された酸化ストレスやリンそのものがオートファジーを誘導していると思われる。また、リンにより引き起こされる血管平滑筋細胞のアポトーシスは、オートファジーを阻害することにより抑制された。しかしながら、オートファジーを誘導すると石灰化が抑制された。また、オートファジーを阻害することでリンにより誘導される膜様小胞の細胞外マトリックスへの放出は増加し、局所のミネラル沈着のプロセスに重要な働きを担うアルカリフォスファターゼの活性も増加させた。従って、オートファジーは、膜様小胞の放出を抑制することによってリンにより誘導される石灰化に対して保護的に働く可能性がある。これらを踏まえて、平滑筋特異的オートファジー機能低下平滑筋細胞において AGEs やリンの負荷により骨芽細胞への分化転換や石灰化が引き起こされるかを検討することが重要と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三田 智也
2. 発表標題 動脈硬化におけるオートファジーの役割
3. 学会等名 第53回 日本動脈硬化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------