

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2020～2022
 課題番号：20K07073
 研究課題名(和文) 伸展負荷による血管平滑筋細胞死での転写因子Nr4aの役割解明と動脈解離予防薬開発

研究課題名(英文) Investigation of the role of Nr4a in cyclic mechanical stretch-induced vascular smooth muscle cell death and the development of preventive drugs for aortic dissection

研究代表者

吉栖 正典 (Yoshizumi, Masanori)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60294667

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)：大動脈解離の発症に血圧急上昇が関与している可能性がある。我々は「大動脈壁の中膜を構成する血管平滑筋細胞に対する急激な伸展負荷が、細胞死を招いて動脈解離を引き起こすのではないか？」という仮説をたてて研究した。培養ラット血管平滑筋細胞に急激な伸展負荷をかけ、細胞内の遺伝子発現をcDNAマイクロアレイで解析した。その結果、免疫に関わる転写因子Nr4aの発現上昇がみられた。動脈解離モデルマウスの大動脈でNr4aの発現が増加し、Nr4aを阻害すると血管平滑筋細胞死が増加したことから、Nr4aは動脈解離発症に防御的に働いている可能性がある。Nr4aは動脈解離発症予防薬開発の標的になりうる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会の今日、動脈硬化性疾患の増加は著しく、その対策は急務である。なかでも急性大動脈解離の致死率は高く、多くは緊急手術以外に救命する手段はない。それ故、大動脈解離の発症予防薬の開発は社会的意義が大きい。我々は、「大動脈壁の中膜を構成する血管平滑筋細胞に対する急激な伸展負荷が細胞死を招いて大動脈解離が発症するのではないか？」という仮説を立てて実験し、それを実証した。さらにcDNAマイクロアレイ解析により、伸展負荷で免疫応答に関わる転写因子Nr4aの遺伝子発現が上昇することを初めて発見した。Nr4aを標的にすれば、降圧に依存しない全く新しい大動脈解離の発症予防薬の開発に道を開く。

研究成果の概要(英文)：The pulsatile nature of blood flow exposes vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the aortic wall to cyclic mechanical stretch (CMS), which evokes vascular remodeling. We have revealed that CMS of rat aortic smooth muscle cells (RASMCs) caused JNK- and p38-dependent cell death. We found that the expression of Nr4a, an immunity-related transcription factor was induced by CMS in a JNK- and p38-dependent manner. Expression of Nr4a was also induced in VSMCs by hypertension produced by abdominal aortic constriction model of mouse. In Addition, DTM-C-pPhOH, an antagonist for Nr4a increased cell death, indicating that Nr4a protects RASMCs from CMS-induced cell death. These results suggest that CMS of VSMCs induces inflammation-related gene expression, including that of Nr4a, which may play important roles in the stress response against CMS caused by hypertension. Nr4a may be a possible candidate of the pharmacological treatment for prevention of aortic dissection in humans.

研究分野：循環薬理学

キーワード：動脈解離 血管平滑筋細胞 細胞死 伸展負荷 分子機構 Nr4a MAPキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性大動脈解離は、突然の激痛で発症する致死率の高い疾患でありその対策は急務である。大動脈解離の発症には、血圧の急上昇が誘因になっている可能性があるが、その詳細な分子機構は未だ明らかではなく、降圧薬以外に有効な治療薬はない。しかし、血圧が低下しても動脈解離が発症する例や、正常血圧でも発症する場合があります、降圧療法以外の有効な治療法が求められている。動脈解離の発症機構として、我々は「大動脈壁の中膜を構成する血管平滑筋細胞に対する急激な伸展負荷を契機として、アポトーシスを含む細胞死を招いて大動脈解離が発症するのではないか?」という新規仮説を着想した。予備的実験として、シリコンチャンバー上で培養した血管平滑筋細胞に、急激な血圧上昇に相当する伸展負荷をかけたところ、時間依存的な細胞死が観察され、我々の仮説が正しいことが裏付けられた。この血管平滑筋細胞死の分子メカニズムに関わる鍵分子を探索するため cDNA マイクロアレイ解析を行い、血管平滑筋細胞への伸展負荷によりがんや免疫応答などに関与する転写因子 Nr4a の遺伝子発現が上昇することを初めて発見した (図1)。動脈解離の発症に Nr4a が関与するという報告は今まで全くなく、我々は世界で初めて、「Nr4a を標的にすれば、降圧に依存しない全く新しい大動脈解離の予防薬・治療薬が開発できるのではないか?」という学術的問いを立てた。

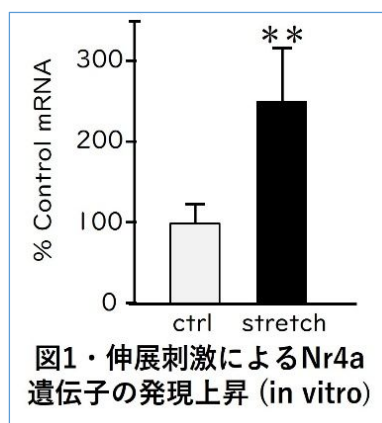


図1・伸展刺激によるNr4a 遺伝子の発現上昇 (in vitro)

2. 研究の目的

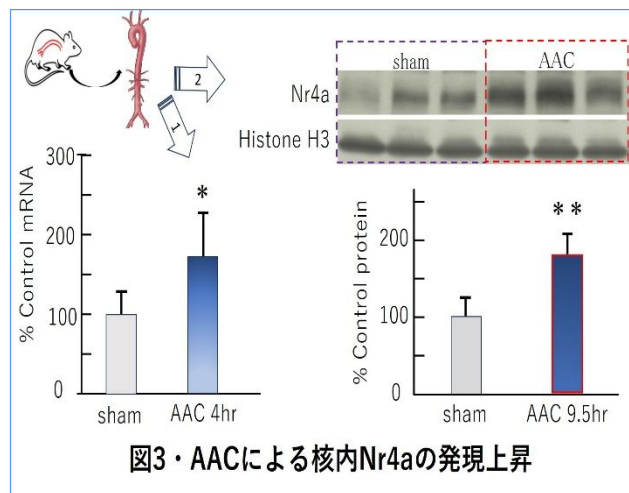
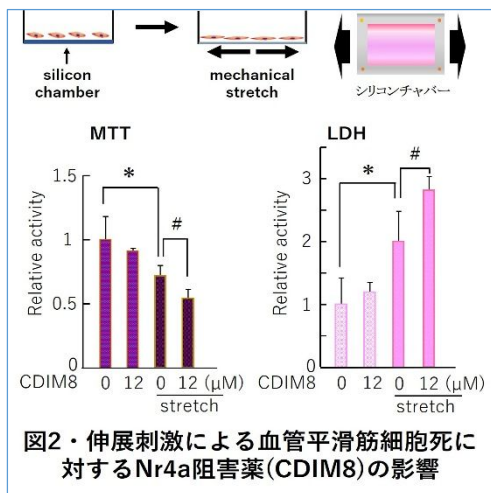
本研究は、1)急激な伸展負荷による血管平滑筋細胞死の細胞内分子メカニズムに関わる Nr4a の役割解明と、2)Nr4a をターゲットとした、降圧に依存しない全く新しい大動脈解離の発症予防薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

急激な伸展負荷による血管平滑筋細胞死の細胞内分子メカニズムに関わる Nr4a の役割を解明するため、Nr4a の特異的阻害薬による伸展負荷による血管平滑筋細胞死の程度を MTT と LDH アッセイによって定量し、抑制されるか否かを検討した。次に、細胞死に関わるといわれる MAP キナーゼの JNK と p38 の活性化を先行研究で確認しており、Nr4a の上流に位置している可能性が高いため、平滑筋細胞に伸展刺激を加え、MAP キナーゼ (JNK, p38) の活性化の有無をウェスタンブロットングによって検討した。活性化が見られた場合、MAP キナーゼの機能を阻害することによって、Nr4a の発現変化を観察し、Nr4a の発現が MAP キナーゼの活性化に依存しているか否かを検討した。さらに、Nr4a をターゲットとした、降圧に依存しない全く新しい大動脈解離の発症予防薬開発のために大動脈解離発症モデルマウスを用いた実験を行った。腹部大動脈狭窄 (Abdominal Aortic Constriction, AAC) モデルマウスを用い、高血圧による血管平滑筋細胞死と Nr4a の発現変化を含む伸展刺激応答経路の活性化を調べた。活性化は、病変部位組織 (腹部大動脈) から抽出した試料を用い、qPCR あるいはウェスタンブロット法で行った。また、狭窄腹部大動脈の空間情報を得るために組織免疫染色も行った。

4. 研究成果

伸展刺激による RASMC 細胞死に NR4A1 が関与するか否かを MTT 法及び LDH 法により検討した結果、Nr4a 阻害剤 DTM-CPh-OH の前処理によって、伸展刺激による RASMC 細胞死が増悪することを明らかにした(図2)。さらに、伸展刺激により誘導された Nr4a の遺伝子発現が JNK および p38 に制御されるか否かを阻害剤を用いて qPCR 法により検討した。すると、p38 阻害剤の前処理によって誘導された Nr4a 発現がさらに増加することを確認した。



生体内情報伝達機構の観点から更なる研究を進めるために、腹部大動脈縮窄 (Abdominal Aortic Constriction、AAC)大動脈瘤モデルマウスを用いた in vivo での実験で、4時間の縮窄による高血圧により Nr4a 遺伝子の発現が上昇したが、9.5時間後タンパクの発現増加も検出した(図3)。伸展刺激による血管平滑筋細胞死とその伝達経路の空間情報を得るために、核内受容体である Nr4a が転写因子として、伸展刺激や AAC による高血圧による血管平滑筋細胞死に関わるか否かを現在 TUNEL 法や免疫蛍光染色実験で in vitro と in vivo 両面で確認中である。以上の結果より、三年間の実験計画は概ね順調に進展した。我々の研究成果から、伸展刺激による大動脈平滑筋細胞死に対して、Nr4a は保護的作用を有することが示唆された。

今後引き続き AAC モデルマウスにおける Nr4a の制御分子をスクリーニングし、制御機序を検討する。Nr4a を制御する因子を同定することは、血管中膜平滑筋の脆弱性を克服し、動脈瘤や動脈解離の新しい治療標的の発見につながる可能性が高い。Nr4a が動脈解離の発症に関与することが明らかになれば、血管平滑筋での発現量をコントロールすることで高血圧非依存的な動脈解離のモデル動物の作製も可能になり、動脈解離の研究の推進ばかりでなく、予防・治療薬の開発にも寄与できる。また、伸展刺激応答経路が生理学的にどのような機能を持つかは未だ完全には明らかにされていない。今後、この経路の解明を起点として心血管生理学の新たな研究領域の創成も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 趙晶、中平毅一、京谷陽司、吉栖正典
2. 発表標題 急激な伸展負荷によるラット血管平滑筋細胞死におけるNR4A1の保護作用について
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 趙晶、中平毅一、京谷陽司、吉栖正典
2. 発表標題 転写因子 NR4A1は伸展負荷による血管平滑筋細胞死を抑制する
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 趙晶、中平毅一、京谷陽司、吉栖正典
2. 発表標題 伸展負荷によるラット血管平滑筋細胞死に対してNR4A1は防御的に作用する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	京谷 陽司 (Kyotani Yoji) (10706534)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	趙 晶 (Zhao Jing) (60804466)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	
研究分担者	中平 毅一 (Nakahira Kiichi) (80844414)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

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