

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590422

研究課題名(和文)動脈老化と動脈中膜変性疾患(大動脈解離、脳動脈瘤、脳動脈解離)のプロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteomic analysis of arterial aging and medial degenerative diseases (aortic dissection, cerebral aneurysm and cerebral arterial dissection)

研究代表者

沢辺 元司 (SAWABE, Motoji)

東京医科歯科大学・保健衛生学研究科・教授

研究者番号：30196331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：動脈老化は高齢者の心不全、腎不全の原因であり、大動脈中膜の加齢性変化により生じるが、その発生機構は不明である。大動脈解離症も大動脈中膜の何らかの異常による。本研究の目的は動脈老化および大動脈解離症における中膜構成タンパク質の変化をプロテオーム解析により網羅的に解析することである。大動脈解離症では筋収縮関連タンパク質の変動、ストレス応答タンパク質の増加と細胞外基質タンパク質の減少が認められた。一方、加齢により平滑筋細胞アクチンが減少し、様々なストレス関連タンパク、プロテオグリカン関連タンパク質が増加していた。本研究により動脈老化、大動脈解離症に特徴的な大動脈中膜構成タンパク質の変化が同定された。

研究成果の概要(英文)：The aging-related arterial medial change (arterial aging) causes heart failure and chronic kidney disease in the elderly. Aortic dissection may arise from some unidentified anomaly of the aortic media. The purpose of this study is to analyze the changes of arterial medial constitutive proteins in arterial aging and aortic dissection using the comprehensive proteome analysis. In the cases of aortic dissection, there were increase and decrease of smooth muscle contraction proteins, increase of stress response proteins, and decrease of extracellular matrix proteins. Arterial aging was associated with decrease of smooth muscle actin, increase of stress response proteins, and increase of proteins of extracellular glycosaminoglycans. We successfully identified the specific changes of arterial medial constitutive proteins seen in arterial aging and aortic dissection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：循環器 プロテオーム 老化 動脈老化 大動脈解離症

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 動脈老化の研究動向

「人は血管と共に老いる」と言われ、加齢と共に動脈は老化し、硬くなる。広く動脈硬化と呼ばれるこの現象は病理学的には内膜を中心とした粥状硬化症と、中膜を中心とした「加齢性中膜変性硬化症」に分かれる。加齢性中膜変性硬化症では弾性動脈(大動脈、頸動脈)が拡張し、動脈壁が硬化する。その結果として、大動脈瘤、収縮期高血圧、うっ血性心不全、冠不全、大動脈弁逆流症などの高齢者に特有の病態を引き起こす。加齢性中膜変性硬化症の原因としては(1)エラスチンの機械的疲弊(量の減少、断裂、架橋の減少)、(2)エラスチン、コラーゲンの糖化・糖酸化、(3)酸化脂質による細胞障害、(4)D 体アミノ酸の増加、(5)中膜アミロイド中間物質である medin oligomer による細胞障害、などが想定されている。最近、海外では動脈老化について関心が高まっており、主に培養細胞、実験動物を対象として優れた業績が出つつある。

### (2) 動脈中膜変性症の研究動向

大動脈解離は心タンポナーデ・縦隔出血、脳動脈瘤・脳動脈解離ではくも膜下出血を起こす致死性疾患である。何れも、動脈壁の脆弱性、先天性異常が指摘されているが、その本態に関してはよく分かっていない。遺伝性動脈中膜変性症としては Marfan 症候群、Ehler-Danlos 症候群(2型)などが知られており、原因となる遺伝子異常が同定されている。中膜平滑筋細胞の機能維持には、fibrillin 1, elastin, fibulin 5, emilin などの間質を構成する構造分子と共に TGF シグナルが重要とされている。非症候群性動脈中膜変性症では遺伝子異常や高血圧の関与が疑われているが、その原因はいまだ不明である。

### (3) 動脈中膜組織を用いたプロテオーム解析の研究動向

サンプル内のタンパク質やタンパク質修飾の増減を網羅的に検討するプロテオーム解析は病態の解析に極めて有用である。動脈中膜のプロテオーム解析は始まったばかりであり、Marfan 症候群について 2009 年に初めて報告され(Aregger, Circulation)、動脈老化については 2010 年になって報告が出た(Farina, Clin Biochem)。脳動脈瘤に関しては髄液のプロテオーム解析結果が報告されているが(King, Neurosurg Focus)、大動脈解離、脳動脈瘤、脳動脈解離の動脈壁のプロテオーム解析結果に関しては研究開始当初には報告がない。

## 2. 研究の目的

動脈老化は高齢者の高血圧、うっ血性心不全、大動脈瘤の原因であり、大動脈解離、脳動脈瘤、脳動脈解離などの非症候群性動脈中膜変性症は循環器系致死性疾患である。いずれも、中膜平滑筋細胞の変性、細胞外基質の変化を

特徴としている。動脈老化ではエラスチンの機械的疲弊、糖化・糖酸化、酸化脂質による細胞障害性などが原因とされている。Marfan 症候群などの症候群性動脈中膜変性症では原因となる遺伝子変異が同定されているが、非症候群性動脈中膜変性症の原因は不明である。本研究の目的は動脈中膜組織のプロテオーム解析により動脈老化、非症候群性動脈中膜変性症のタンパク質、タンパク質修飾の病態を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

東京都健康長寿医療センターおよび東京都監察医務院で解剖時に採取され凍結保存された上行大動脈を用いた。マルファン症候群などの明らかな症候群性動脈中膜変性症は含まれていない。大動脈解離症では 6 例の対象例 [男性 4 例、女性 2 例; 平均年齢 58 歳 (42-74 歳)] と 6 例の対照例 [男性 5 例、女性 1 例; 平均年齢 60 歳 (52-70 歳)] を用いた。動脈老化では 3 例の若齢者 [男性 1 例、女性 2 例]、5 例の中齢者 [男性 3 例、女性 2 例]、4 例の高齢者 [男性 1 例 + 女性 3 例] を用いた。平均年齢は若齢者は 27 歳、中齢者は 58 歳、高齢者は 92 歳であった。本研究に関しては東京都健康長寿医療センター、東京都監察医務院の倫理委員会の承認を得ている。

### (2) プロテオーム解析

#### サンプル調製

大動脈中膜は、9 倍量のタンパク質抽出バッファー (7M urea, 2% CHAPS, 50 mM HEPES pH 8.5) を添加した後、マッシャーやジルコニアビーズを用いて破碎し、タンパク質を抽出した。リファレンスとしてすべてのサンプルをプールしたものを作製し、リファレンス及びそれぞれのサンプルについて、蛍光色素 (IC3-0Su/リファレンス, IC5-0Su/サンプル) を用いてタンパク質の標識を行った (8nmol IC-0Su/mg protein)。脱塩のためにタンパク質沈殿を行い (ProteoExtract™ Protein Precipitation Kit, Calbiochem)、等電点電気泳動用バッファー (5M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 3% SB-10, 1% DTT, 2% Pharmalyte) に再溶解した。

#### 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析 (2D-DIGE)

リファレンスとサンプルを、同量ずつ混合し、pH 固定化ストリップゲルを用いて等電点電気泳動 (pH4-7) を行った。ストリップゲルの還元化、アルキル化後、SDS-PAGE を行い (7.5% acrylamide, Tris-Tricine buffer)、蛍光スキャナーにより画像を取り込んだ (Typhoon 9500, GE Healthcare)。それぞれのスポットについて、リファレンスの発現量に対するサンプルの相対発現量を求め、正常コントロールと大動脈解離症について、また若齢、中齢、老齢について比較解析を行った (Progenesis

SameSpots, TotalLab)。大動脈解離症については、内部標準スポットに対する相対発現量による比較解析も行い(PG240, TotalLab)、発現の変動するスポットを探索した。代表的画像を図1に示す。

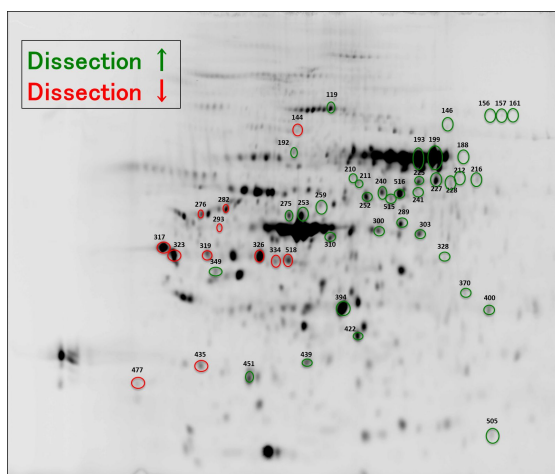


図1．大動脈解離症における2次元電気泳動を転写しスポットの定量解析を行ったもの（緑が発現増加しているスポットで赤が発現減少しているスポット）

#### タンパク質の同定

発現の変動したスポットについて、スポットを切り取り、トリプシンによるゲル内消化後、質量分析を行った(MALDI-TOF 5800, ABCIEX)。得られたペプチドのデータからProteinPilot™ (ver 4.0, ABCIEX)を用いてタンパク質を同定した。

#### 4．研究成果

##### (1) 大動脈解離症に認められたタンパク質の変動

筋収縮関連タンパク質として actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2), actin, gamma 1 (ACTG1), lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin) (LCP1)の増加、actin, alpha 1, skeletal muscle (ACTA1), tropomyosin 1 (alpha) (TPM1), tropomyosin 2 (beta) (TPM2), myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle(MYL6), myosin, light chain 9, regulatory(MYL9)の減少を認めた(表1参照)。ストレス関連タンパク質として heat shock 27kDa protein 1(HSPB1), protein disulfide isomerase family A, member (PDIA3), peroxiredoxin 2 (PRDX2)の増加を認めた。また細胞外基質の変化として Microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4), osteoglycin (mimecan; OGN)の減少を認めた。その他 vimentin(VIM)の低等電点、低分子量スポットの減少を認めた。

以上、大動脈解離症では筋収縮関連タンパク質の変動が認められた。高分子量 Actin が減

少し、低分子量 Actin が増加していた。また Vimentin では低分子量・低等電点のものが減少していた。更にストレス応答タンパク質の増加と細胞外基質タンパク質の減少が認められた。

表1．大動脈解離症で増減するタンパク質

	増加	減少
筋収縮関連	ACTA2, ACTG1, LCP1	ACTA1, TPM1, TPM2, MYL6, MYL9
ストレス関連	HSPB1, PDIA3, PRDX2	
細胞外基質		MFAP4, OGN
その他		VIM

##### (2) 加齢で変動したタンパク質

筋収縮関連タンパク質として tropomyosin 4 (TPM4), myosin, light chain 9, regulatory (MYL9), MYL12A myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric (MYL12A), actinin, alpha 4 (ACTN4), transgelin (TAGLN), transgelin 2 (TAGLN2), Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha (ARHGDI1)の増加、actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2)の減少を認めた(表2参照)。ストレス関連タンパク質として Cadherin-13 (CDH13), Calreticulin (CALR), Heat shock protein 90kDa beta (Grp94) member 1 (Endoplasmic; HSP90B1), heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1), superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3), glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1), thioredoxin (TXN)の増加、peroxiredoxin 2 (PRDX2)の減少を認めた。また細胞外基質の変化として dermatopontin (DPT), lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (LGALS1) hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1)の増加、microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4), Lumican (LUM)の減少を認めた。その他のタンパク質変動として、Vimentin (VIM), Annexin A5 (ANXA5), 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (HAAO), Chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1)の増加を認めた。以上、加齢に伴い、smooth muscle actin が減少し、それを補うかのように actinin, tropomyosin, myosin light chain, transgelin などの発現が亢進していた。様々なストレス関連タンパクの増加を認めたが、peroxiredoxin 2 は逆に減少していた。また加齢に伴い、プロテオグリカンが増加する。本研究でも様々なプロテオグリカン関連タンパク質が増加していたが、エラスチン結合タンパクである microfibrillar-associated protein 4 は減少していた。

表2 . 加齢で増減するタンパク質

	増加	減少
筋収縮 関連	ACTN4, ARHGDI1A, MYL12A, MYL9, TAGLN, TAGLN2, TPM4	ACTA2
ストレ ス関連	CALR, CDH13, GSTP1, HSP90B1, HSPB1, SOD3, TXN	PRDX2
細胞外 基質	DPT, HAPLN1, LGALS1	LUM, MFAP4
その他	ANXA5, CLIC1, HAAO, VIM	

### (3) 大動脈解離症と加齢でのタンパク質増減の比較

大動脈解離症と加齢でのタンパク質増減の比較を行った。筋収縮関連タンパクとしては smooth muscle actin (ACTA2), tropomyosin, myosin light chain で増減の方向が異なっていた。また細胞外基質タンパクとしては microfibrillar-associated protein 4 の減少を共に認めた。ストレス関連タンパクとしては heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1) の増加を共に認めたが、peroxiredoxin 2 では増減の方向が異なっていた。またその他のタンパクとして vimentin (VIM) でも増減の方向が異なっていた。

我々は当初、大動脈中膜の加齢に伴う変化と、中膜疾患である大動脈解離症が、共通したタンパク質異常によることを想定していた。しかし以上の研究結果から、両者は基本的に異なる病態である事が強く示唆された。また、本研究により、microfibrillar-associated protein 4, osteoglycin の減少が動脈解離の、また酸化ストレスや ER ストレスが動脈老化の一因である可能性が強く示唆された。

今後は、更に症例数を増やすと共に、iTRAQ 法を用いた LC-MS/MS 法によるプロテオーム解析を行い更に詳細に検討する。また得られたプロテオーム解析結果に対してウェスタンブロット、免疫組織化学的検討を行う。更にタンパク質の翻訳後修飾に関して検討を行い、大動脈解離症、動脈老化の病理発生に関する研究を進める方針である。

### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Association of the RYR3 gene polymorphisms with atherosclerosis in elderly Japanese population. Zhao C, Ikeda S, Arai T, Naka-Mieno M, Sato N, Muramatsu M, Sawabe M: BMC Cardiovasc Disord 査読あり 14:No. 6, 2014, DOI: 10.1186/1471-2261-14-6  
Identification of hypo- and hypermethylated genes related to

atherosclerosis by a genome-wide analysis of DNA methylation. Yamada Y, Nishida T, Horibe H, Oguri M, Kato K, Sawabe M: Int J Mol Med 査読あり 33:1355-63, 2014, DOI:

10.3892/ijmm.2014.1692

Associations between the CDKN2A/B, ADTRP and PDGFD polymorphisms and the development of coronary

atherosclerosis in Japanese patients. Dechamethakun S, Ikeda S, Arai T, Sato N, Sawabe M, Muramatsu M: J

Atheroscler Thromb (in press) 査読あり, 2014, DOI:10.5551/jat.22640

A gene variant in the ATP10D gene associates with atherosclerotic

indices in Japanese elderly population. Kengia JT, Ko KC, Ikeda S, Hiraishi A, Mieno-Naka M, Arai T, Sato N, Muramatsu M, Sawabe M:

Atherosclerosis 査読あり 231:158-62, 2013, DOI:

10.1016/j.atherosclerosis.2013.08.034

動脈老化の病理および炎症との関係について . 沢辺 元司, 濱松 晶彦, 森 聖二郎, 小澤 利男 Angiology Frontier 査読なし 11: 147-152, 2012

Low lipoprotein(a) concentration is associated with cancer and all-cause deaths: A population-based cohort study (The JMS cohort study). Sawabe M, Tanaka N, Mieno MN, Ishikawa S,

Kayaba K, Nakahara K, Matsushita S: PLoS One 査読あり 7:e31954, 2012

Association of COMT gene polymorphisms with systemic atherosclerosis in elderly Japanese.

Ko MK, Ikeda S, Mieno-Naka M, Arai T, Zaidi SA, Sato N, Muramatsu M, Sawabe M: J Atheroscler Thromb 査読あり 19:552-8, 2012

Polymorphisms of LTA, LGALS2, and PSMA6 genes and coronary atherosclerosis: A pathological study of 1503 consecutive autopsy cases.

Ikeda S, Tanaka N, Arai T, Chida K, Muramatsu M, Sawabe M: Atherosclerosis 査読あり 221:458-60, 2012

Mitochondrial haplogroups A and M7a confer a genetic risk for coronary atherosclerosis in the Japanese

elderly: an autopsy study of 1,536 patients. Sawabe M, Tanaka M, Chida K, Arai T, Nishigaki Y, Fuku N, Mieno MN,

Kuchiba A, Tanaka N: J Atheroscler Thromb 査読あり 18:166-75, 2011, DOI: JST.JSTAGE/jat/6742 [pii]

Age is a major pathobiological determinant of aortic dilatation: a large autopsy study of community deaths. Sawabe M, Hamamatsu A, Chida K, Mieno MN, Ozawa T: J Atheroscler Thromb 査読あり 18:157-65, 2011, DOI: JST.JSTAGE/jat/6528 [pii]

[学会発表](計 5件)

三浦ゆり、岩本真知子、津元裕樹、副島友莉恵、戸田年総、森澤 拓、新井富生、濱松晶彦、遠藤玉夫、沢辺元司 : ヒト大動脈解離症のプロテオーム解析、日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014.7.17-18

Sawabe, M., Yoshida, S., Hamamatsu, A., Toda, T., Arai, T., Iwamoto, M., Endo, T., Miura, Y. : Proteomic analysis of the human aortic media, 8th Asia Pacific IAP Congress (APIAP), Busan, Korea, 2013.9.5-8

三浦ゆり、岩本真知子、吉田祥子、戸田年総、森澤 拓、新井富生、濱松晶彦、遠藤玉夫、沢辺元司 : プロテオミクスによるヒト大動脈解離症の解析、第 36 回日本基礎老化学会、大阪、2013.6.4-6

Sawabe, M., Yoshida, S., Hamamatsu, A., Toda, T., Arai, T., Iwamoto, M., Endo, T., Miura, Y. : Proteomic analysis of the elastic arterial media in aging, 81st European Atherosclerosis Society (EAS) Congress, Lyon, France, 2013.6.2-5

三浦ゆり、岩本真知子、吉田祥子、戸田年総、森澤 拓、新井富生、濱松晶彦、遠藤玉夫、沢辺元司 : ヒト大動脈解離症のプロテオーム解析、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013.3.27-30

[その他]

ホームページ

東京都健康長寿医療センター プロテオーム解析チーム

[http://www.tmg Hig.jp/J\\_TMIG/kenkyu/team/proteome.html](http://www.tmg Hig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/proteome.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沢辺 元司(SAWABE, Motoji)

東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号 : 30196331

(2) 研究分担者

呂 彩子(RHO, Ayako)

東京女子医科大学・講師

研究者番号 : 50296555

戸田 年総(TODA, Toshifusa)

東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号 : 80133635

(平成 23・24 年度に研究分担者)

三浦 ゆり(MIURA, Yuri)

東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号 : 00216574

(平成 24・25 年度に研究分担者)

田中 博(TANAKA, Hiroshi)

東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授

研究者番号 : 60155158