

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591107

研究課題名(和文)動脈硬化形成における生体内ストレス応答調節機構の解明

研究課題名(英文)The Effects of Biological Stress Responses on the Development of Atherosclerosis.

## 研究代表者

石垣 泰 (Ishigaki, Yasushi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：50375002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化の形成には小胞体(ER)ストレス応答や炎症反応、酸化ストレス反応といった生体内反応が相互に影響を及ぼしあうことが重要である。ERストレスを抑制的に調節しているWFS1は血管壁構成細胞やM<sub>1</sub>に発現していることから、WFS1欠損マウス(KO)を用いて動脈硬化における生体内ストレス応答の役割を検討した。WFS1 KOではカフ傷害による血管リモデリングと粥状動脈硬化進展が増悪しており、血管の生体内ストレス応答の亢進が認められた。WFS1はERストレスを調節しているのみならず、*in vitro*の検討から生体内ストレス応答を直接抑制しており、動脈硬化形成に対して抑制的に働いていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The interactions among biological pathways, such as responses to inflammation, oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress are thought to be important for the development of atherosclerosis. Wolfram Syndrome (WFS) 1, which regulates ER stress response genes, is expressed in vascular endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages. Cuff injury-induced vascular remodeling and hypercholesterolemia-induced aortic plaque formation were markedly advanced in WFS1<sup>-/-</sup> mice with exacerbated aortic expressions of inflammatory factors and oxidative stress markers. The results of studies *in vitro* revealed that WFS1 directly modulate inflammatory and oxidative stress response in vascular cells as well as macrophage. Thus, WFS1 may play important roles in suppressing potentially pathological biological stress responses, resulting in prevention of atherosclerosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：動脈硬化 小胞体ストレス 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

全身の様々な病態に關与している生体反応として、小胞体(ER)ストレス応答が注目を集めている。これまで研究代表者は、動脈硬化進展における酸化ストレスの重要性や小胞体ストレスの役割について研究を進めてきた。特に数年前から、ER ストレス応答蛋白である CHOP がカフ傷害による炎症性内膜肥厚と高コレステロール血症による粥状動脈硬化に重要であることを研究し、報告してきた。その中で、CHOP は小胞体ストレス応答の下流にあり、アポトーシスを導くのみならず、酸化ストレス反応や炎症反応の調節にもかかわっていることを見出した。こうした経験から、動脈硬化の形成において小胞体ストレス応答や炎症反応、酸化ストレス反応といった生体内反応が相互に影響を及ぼしあうことの重要性を、その調節メカニズムも含めて詳細に検討するという研究を着想した。

当時研究代表者らは、小胞体ストレスやその結果もたらされるアポトーシスに対して防御的に働く小胞体ストレス応答蛋白 Wolfram syndrome (WFS)1 に着目していた。WFS1 はマクロファージ (M $\phi$ ) や血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に発現し、動脈硬化病変にも染色される (図 1) ことから、動脈硬化の形成に関わっていると確信していた。そこで、我々の研究室で作成した WFS1 欠損マウスを用いて、動脈硬化に関して試験的に検討を行ったところ、WFS1 欠損はカフ傷害による反応性内膜肥厚や高コレステロール負荷による粥状動脈硬化を増悪させる傾向にあった。WFS1 の機能についてはまだ不明な点が多いが、血管における役割を解析することで小胞体ストレス応答と動脈硬化の新たな知見が得られる可能性があると期待し、研究をスタートした。

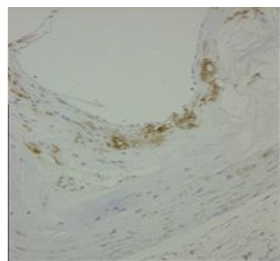


図1. プラークにおける WFS1蛋白の発現

### 2. 研究の目的

WFS1 欠損マウスを中心とした解析から、動脈硬化形成における生体内ストレス応答の調節機構を、小胞体ストレス応答を中心とした炎症反応、酸化ストレス反応との相互作用の視点から解明することである。

### 3. 研究の方法

(1)8 週齢の WFS1 欠損マウスを用いて、片側の大腿動脈にカフ傷害を施し、3 週間後に内膜の肥厚度の検討や免疫組織学的検討を行

った。またカフ留置部位の血管から mRNA を抽出し、炎症反応や小胞体ストレス、酸化ストレス応答に関連した分子の発現を検討した。

(2) 高コレステロール食を負荷した WFS1・アポ E 二重欠損マウスを用いて、動脈硬化病変を定量化し、また大動脈の免疫組織学的検討を行った。

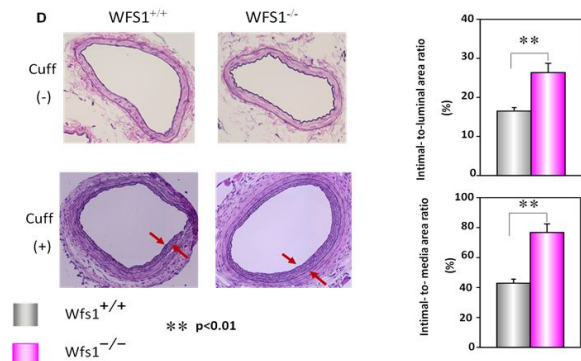
(3)野生型マウスと WFS1 欠損マウスを用いて骨髄移植を行った。ドナーとレシピエントの組み合わせによって、全身に WFS1 を有する、骨髄のみ WFS1 を有する、骨髄のみ WFS1 を欠損する、全身に WFS1 を欠損する、の 4 群のマウスを作成し、カフ傷害や粥状動脈硬化に関する検討を行い、血球細胞あるいは血管壁構成細胞のいずれの WFS1 が血管障害に重要であるか検討した。

(4)血管内皮と血管平滑筋の培養細胞を用いて、WFS1 ノックダウンの影響を、遺伝子発現レベルで詳細に検討した。

### 4. 研究成果

(1)カフ傷害による反応性内膜肥厚の検討 WFS1 欠損マウスでは野生型マウスに比べカフ傷害後の内膜肥厚が約 60%増悪していた (図 2)。

図2 Wfs1欠損マウスはカフ障害による反応性内膜肥厚が増大している



カフ傷害部位の血管の遺伝子発現を検討したところ、カフ傷害によって WFS1 欠損マウスでは MCP-1 や IL-6 といった炎症性ケモカインやサイトカインの発現が著明に上昇していた。また SDF1 や PDGFB といった平滑筋増殖因子の発現が亢進していた。

### (2)粥状動脈硬化の検討

高コレステロールにともなう動脈硬化モデルである apoE 欠損マウスと交配することで、粥状動脈硬化における WFS1 の役割を検討した。WFS1 欠損によって動脈硬化面積は 22 週齢の時点から進行が顕著となり、28 週齢では野生型と比較して 21%進展していた (図 3)。

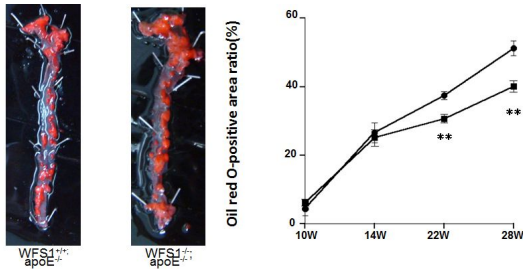


図3 WFS1欠損により粥状動脈硬化は進展する

動脈硬化部位での免疫染色では WFS1 欠損群でマクロファージや血管平滑筋細胞の沈着亢進を認めた。また大動脈全体の遺伝子発現を検討したところ、WFS1 欠損群で ER ストレス反応のみならず、炎症反応や酸化ストレス応答の亢進が認められた。以上の結果から、WFS1 欠損は高コレステロールによって導かれる、血管における ER ストレス応答や炎症反応、酸化ストレス反応を増大することで、粥状動脈硬化進展を増悪させていると考えられた。

#### (4) 骨髄移植を用いた検討

各表現型の間で骨髄移植を行った後にカフ傷害を施し内膜肥厚を検討した。その結果、レシピエントの WFS1 の有無にかかわらず、骨髄中に WFS1 が存在することが内膜肥厚の抑制につながっていることが明らかとなった (図4)。

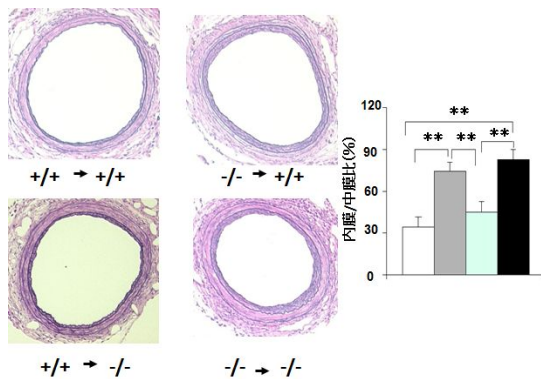


図4. 骨髄中のWFS1はカフ傷害による内膜肥厚を抑制する

また apoE 欠損を背景にした高コレステロールモデルにおける動脈硬化に関しても、同様に骨髄移植を行ったところ、骨髄由来細胞と血管壁構成細胞の双方の WFS1 が粥状動脈硬化に関わっていることが示唆された (図5)。

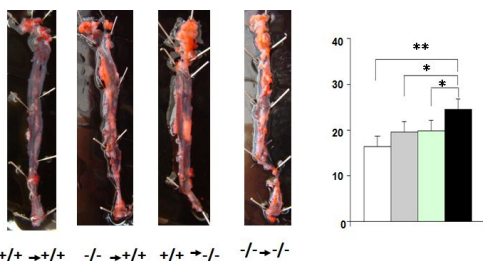


図5. 骨髄由来細胞と血管壁細胞双方のWFS1は粥状動脈硬化を抑制する

#### (5) 培養細胞を用いた検討

血管内皮細胞や血管平滑筋細胞といった培養細胞において、siRNA を用いて WFS1 をノックダウンしたところ、内皮細胞では接着因子の発現亢進が、平滑筋細胞では増殖因子の発現亢進が認められ、invitro の検討からも WFS1 が動脈硬化に関連する様々な因子の調節に関わっていることが明らかになった。

以上の研究結果から、炎症性血管リモデリングには骨髄細胞中の WFS1 が抑制的な役割を果たしており、粥状動脈硬化においては骨髄と血管壁双方における WFS1 が関わっていることが明らかとなった。動脈硬化の形成には、酸化ストレス、小胞体ストレス、炎症反応といった生体ストレス応答が絡み合っており、WFS1 がその一部を調節していることが明らかになった。WFS1 は ER ストレスを調節しているのみならず、invitro の検討から酸化ストレスや炎症反応を直接抑制していることが明らかとなり、すでに糖尿病で報告されている他に動脈硬化形成に対しても抑制的に働いていると考えられた。

#### 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17件)

Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, Ishigaki Y, Yamada T, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Shimosawa T, Asano T, Fujita T, Oka Y, Katagiri H. Blockade of the Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway in the Endothelium Prevents Insulin Resistance and Prolongs Life Spans. *Circulation*. 査読有、2012; 125(9): 1122-33.

Usui M, Yamaguchi S, Tanji Y, Tominaga R, Ishigaki Y, Fukumoto M, Katagiri H, Mori K, Oka Y, Ishihara H. Atf6<sup>-</sup> null mice are glucose intolerant due to pancreatic  $\beta$ -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism*. 査読有、2012; 61(8): 1118-28.

Saito T, Hasegawa Y, Ishigaki Y, Yamada T, Gao J, Imai J, Uno K, Kaneko K, Ogihara T, Shimosawa T, Asano T, Fujita T, Oka Y, Katagiri H. Importance of endothelial NF- $\kappa$ B signalling in vascular remodelling and aortic aneurysm formation.

- Cardiovasc Res. 査読有、2013; 97(1): 106-14.
- Takahashi K, Yamada T, Tsukita S, Kaneko K, Shirai Y, Munakata Y, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Oka Y, Katagiri H. Chronic mild stress alters circadian expressions of molecular clock genes in the liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 査読有、2013; 304(3): E301-9.
- Tsukita S, Yamada T, Uno K, Takahashi K, Kaneko K, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, Ishihara H, Oka Y, Katagiri H. Hepatic glucokinase modulates obesity predisposition by regulating BAT thermogenesis via neural signals. *Cell Metab.* 査読有、2012; 16(6):825-32.
- Takagi M, Ishigaki Y, Uno K, Sawada S, Imai J, Kaneko K, Hasegawa Y, Yamada T, Tokita A, Iseki K, Kanno S, Nishio Y, Katagiri H, Mori E. Cognitive dysfunction associated with anti-glutamic acid decarboxylase autoimmunity: a case-control study. *BMC Neurol.* 査読有、2013;13:76.
- Kondo K, Ishigaki Y, Gao J, Yamada T, Imai J, Sawada S, Muto A, Oka Y, Igarashi K, Katagiri H. Bach1 deficiency protects pancreatic  $\beta$ -cells from oxidative stress injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 査読有、2013 ;305(5):E641-8.
- Sakata N, Goto M, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M. Clinical Experiences in the Treatment of Pancreatic Arteriovenous Malformation by Total Pancreatectomy With Islet Autotransplantation. *Transplantation.* 査読有、2013;96(5):e38-e40.
- Kodama S, Yamada T, Imai J, Sawada S, Takahashi K, Tsukita S, Kaneko K, Uno K, Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Simultaneous Copy Number Losses within Multiple Subtelomeric Regions in Early-Onset Type2 Diabetes Mellitus. *PLoS One.* 査読有、2014;9(4):e88602.
- Ishigaki Y, Kono S, Katagiri H, Oka Y, Oikawa S; NTPP investigators. Elevation of HDL-C in Response to Statin Treatment is Involved in the Regression of Carotid Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 査読有、2014 21(10):1055-65
- Suzuki S, Suzuki C, Hinokio Y, Ishigaki Y, Katagiri H, Kanzaki M, Azev VN, Chakraborty N, d'Alarcao M. Insulin-Mimicking Bioactivities of Acylated Inositol Glycans in Several Mouse Models of Diabetes with or without Obesity. *PLoS One.* 査読有、2014;9(6):e100466.
- Matsui M, Takahashi Y, Takebe N, Takahashi K, Nagasawa K, Honma H, Oda T, Ono M, Nakagawa R, Sasai T, Togashi H, Hangai M, Kajiwara T, Taneichi H, Ishigaki Y, Satoh J. Response to the dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in Japanese patients with type 2 diabetes might be associated with a diplotype of two single nucleotide polymorphisms on the interleukin-6 promoter region under a certain level of physical activity. *J Diabetes Invest.* 査読有、2015 6(2):173-81
- Tanaka M, Imai J, Satoh M, Hashimoto T, Izumi T, Sawada S, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai Y, Katagiri H. Glycemic control in diabetic patients with impaired endogenous insulin secretory capacity is vulnerable after a natural disaster: study of great East Japan earthquake. *Diabetes Care.* 査読有、2014;37(10):e212-3.
- Oda T, Taneichi H, Takahashi K, Togashi H, Hangai M, Nakagawa R, Ono M, Matsui M, Sasai T, Nagasawa K, Honma H, Kajiwara T, Takahashi Y, Takebe N, Ishigaki Y, Satoh J. Positive association of free triiodothyronine with pancreatic  $\beta$ -cell function in people with prediabetes. *Diabet Med.* 査読有、2014 Sep 26 (epub ahead of print).
- Tanaka M, Imai J, Satoh M, Hashimoto T, Izumi T, Sawada S, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai Y and Katagiri H. Impacts of the Great East Japan Earthquake on diabetic patients. *J Diabetes Invest.* 査読有、Article first published online : 11 MAR 2015
- 石垣 泰 .大血管障害発症予防を旨とした糖尿病診療.日本臨床内科医会誌、査読無、2014; 29(4): 521-4

石垣 泰 . 糖尿病患者の脂質管理 . 動脈硬化予防 . 査読無、2015 ; 13(4) : 30-35

[学会発表](計 10 件)

Ishigaki Y, Kono S, Katagiri H, Oka Y, Oikawa S; NTPP investigators. Elevation of HDL-C in Response to Statin Treatment is Involved in the Regression of Carotid Atherosclerosis. 74th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2014; San Francisco, U.S.A.

Oda T, Taneichi H, Ishigaki Y, J Satoh. Positive association of free triiodothyronine with pancreatic  $\beta$ -cell function in patients with prediabetes. 74th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2014; San Francisco, U.S.A.

Matsui M, Takahashi Y, Ishigaki Y, J Satoh. Association of a Diplotype of Two IL-6 SNPs with Efficacy of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in Japanese Type 2 Diabetes Patients with a Certain Level of Physical Activity. 74th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2014; San Francisco, U.S.A.

Kondo K, Gao J, Suzuki T, Ishigaki Y, Imai J, Yamada T, Katagiri H. CHOP Involvement in Hepatic Glucose Production and Insulin Resistance. 74th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2014; San Francisco, U.S.A.

Suzuki T, Gao J, Kondo K, Ishigaki Y, Imai J, Yamada T, Katagiri H. CHOP Modulates Adipose Tissue Macrophage Polarization. 74th Scientific Sessions American Diabetes Association; 2014; San Francisco, U.S.A.

近藤 敬一、石垣 泰(他9名、2番目) BTB and CNC homology 1 (Bach1)欠損による膵細胞保護効果 . 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 ; 2012年5月17-19日 ; 横浜

澤田正二郎、石垣 泰(他 10 名、2 番目) . 1 型と 2 型糖尿病患者の頸動脈血管弾性特性の比較検討 . 第 45 回日本動脈硬化学会学術集会 ; 2013 年 7 月 10-11 日 ; 東京

石垣 泰(他 4 名、1 番目) スタチンの頸動脈肥厚退縮効果<他施設共同前向き試験 (NTPP) から>. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.05.22-24、大阪 .

石垣 泰(他 8 名、3 番目) 肝糖新生にお

ける小胞体ストレス関連因子 CHOP の役割 : 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.05.22-24、大阪

石垣 泰(他 2 名、1 番目)糖尿病とアンチエイジング . さまざまな臓器の糖代謝調節における小胞体ストレス応答の役割 . 第 29 回糖尿病合併症学会、2014.10.3-4、東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石垣 泰 (ISHIGAKI YASUSHI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 50375002

(2)研究分担者

高 俊弘 (GAO JUNHONG)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 70455781

澤田 正二郎 (SHOUJIROU SAWADA)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 60509420

(3)連携研究者