

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790782

研究課題名(和文)血管平滑筋細胞におけるオートファジーの機能解析

研究課題名(英文)The functional role of autophagy in smooth muscle cell.

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)：今回、動脈硬化に対する血管平滑筋細胞におけるオートファジーの役割を検討するため、平滑筋特異的ATG7欠損apoE欠損マウスとコントロールapoE欠損マウスを作成した。これらの10週令のマウスに14週間1.25%のコレステロールを含む西洋食を負荷した。結果として、血管平滑筋細胞におけるオートファジーの機能低下は、動脈硬化を促進させた。また、酸化ストレスによる細胞死は、平滑細胞特異的ATG7欠損マウスから初代培養した平滑筋細胞で増加していた。我々は、血管平滑筋細胞のオートファジーの機能低下が血管平滑筋細胞の細胞死を増加させ、動脈硬化の発症や進展を促進させることを新規に発見した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of autophagy in vascular smooth muscle cells (SMCs) on atherosclerosis. The apolipoprotein E-deficient mice, Atg7^{f/f} and SM22^{-Cre} mice bred with each other to generate mice with SMCs specific Atg7 deficiency (ATG7-SMCs KO) and littermate control (control). For atherosclerosis study, 10-week-old male mice were placed on a Western diet containing 1.25% cholesterol for 14 weeks. Plaque sizes in abdominal aortic areas of ATG7-SMCs KO apolipoprotein E-deficient mice exceptionally expanded compared to control apolipoprotein E-deficient mice. Hydrogen peroxide induced apoptosis related signals were significantly enhanced in primary culture SMC isolated from ATG7-SMCs KO apolipoprotein E-deficient mice compared to those from control apolipoprotein E-deficient mice. Our data suggest that SMC autophagy play a protective role on atherosclerosis through inhibiting SMC cell death.

研究分野：糖尿病、動脈硬化

キーワード：オートファジー 血管平滑筋細胞 動脈硬化

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（マクロファージ）の接着と遊走以外にも、平滑筋細胞の増殖と遊走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。中でも、進行した動脈硬化病変では内膜下に増殖・遊走した平滑筋細胞が重要な役割を担っている（Stary HC et al. *Circulation* 1995）。プラーク層はコレステロール・エステルを中心とする脂質、それを細胞質内に取り込んだ泡沫化マクロファージと死細胞の遺産物を中心とする脂質コア、それを被覆する内膜平滑筋細胞や細胞外基質で構成される線維性被膜による内膜肥厚で形成されている。急性冠症候群の発症のメカニズムの一つにはこのプラークの破綻が知られており、平滑筋細胞のアポトーシスによるプラークの脆弱化が強く関わっている。一方で、平滑筋細胞の増殖はプライマリーの動脈硬化形成に重要であるのみならず（Dzau VJ et al. *Nat Med* 2002）、冠動脈病変拡張後の再狭窄の重要なメカニズムである事が言われている（Kornowski R et al. *Circulation* 1997）。このような動脈硬化へ多岐に関与する平滑筋細胞にもオートファジーが存在し、重要な役割を果たしている可能性が示唆されてきている。

オートファジーとは自食、つまり、細胞が細胞質のタンパク質や細胞内小器官の品質管理のために、細胞質の古くなって機能が低下したタンパク質や細胞内小器官を二重膜によって隔離し、オートファゴソームを形成し、その後のリソソームとの融合によって隔離したタンパク質や細胞内小器官を分解する過程を示す。オートファジーにより生じたアミノ酸やその他の分解産物は細胞質に戻され再利用される。オートファジーは飢餓時に強く活性化されることが知られているが、飢餓以外にも各種のストレスやホルモン刺激がオートファジーを誘導することが明らかになってきている。また、哺乳類では誘導刺激のない通常状態でも、常に低いレベルでオートファジーは起きており、細胞自身の新陳代謝に働いている。さらに、オートファジーの機能は免疫応答、発癌抑制、炎症性反応制御、心不全抑制など多彩であることが明らかになっており、我々もオートファジーが膵細胞の正常機能に必須な機構であることを報告している（Ebata et al. *Cell Metabolism* 2008 325-324）。しかしながら、動脈硬化におけるオートファジーの役割は十分に明らかに

はなっていない。

最近、動脈硬化層や血管構成細胞にオートファジーが誘導されることが報告された（Martinet W et al *Circulation Research* 2009 304-317）。すなわち、コレステロールを負荷したラビットのプラーク層や酸化脂質を負荷した培養血管平滑筋細胞にオートファジーが発現していることが確認されている（Kockx MM, *Cir Reseach* 1998 378-387）（Martinet W, *ATVB* 2004 2296-2301）。また、ヒトのプラークにおいてもその発現が確認されている。一方、オートファジーの機能に関しては、コレステロールや炎症性サイトカインの負荷による平滑筋細胞のアポトーシスを抑制することなどが確認されている（Kedi Xu, *JLR* 2010 2581-2590）（Jia G, *Immunol cell Biol* 2006 448-454）。

このオートファジーの作用は進展した動脈硬化層のプラークの安定化に関わっている可能性を示唆したものである。しかしながら、これら *in vitro* の研究では単一の刺激下の状態を検討しているに過ぎず、様々な因子により進行する動脈硬化の過程において実際の平滑筋細胞におけるオートファジーの役割が明らかになったとは言えない。そこで我々は平滑筋特異的 Atg7 欠損マウス（Atg7 は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）を作成し、動脈硬化のモデルマウスである apoE 欠損マウスと交配することにより進行した動脈硬化層、特にプラークに存在する血管平滑筋細胞のオートファジーの役割を検討することとした。

2. 研究の目的

平滑筋特異的 Atg7 欠損 apoE 欠損マウスを作製し、動脈硬化における血管平滑筋細胞のオートファジーの役割を検討する。

また、血管平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスとコントロールより初代培養した血管平滑筋細胞を用いて、動脈硬化の進展に伴い増加する過酸化水素 (H₂O₂) を負荷し、H₂O₂ により誘導されるアポトーシスにオートファジーがどのように作用しているのかをその作用機序を含めて検討する。

3. 研究の方法

・ *in vivo*

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^{f/f} マウス

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^{tg} マウスを交配し血管平滑筋特異的 Atg7 欠損マウス(SM22-Cre;Atg7f/f)を作製した。次に、SM22-Cre;Atg7f/f マウスと apoE 欠損マウスを交配させ、平滑筋特異的 Atg7 欠損・apoE 欠損マウスとコントロール apoE 欠損(以下 ATGKO、WT)を作製した。10 週令のこれらのマウスに 14 週間の高コレステロール食を負荷し、大動脈を抽出し、以下の点を検討した。

(1)大動脈全体を oil red O 染色を行い、動脈硬化陽性面積を評価する。

(2)腹部動脈の血管径を評価する

(3)腹部大動脈の切片を作成し、以下の点を評価する

アザン染色で大動脈の中膜や動脈硬化層の弾性繊維を定量評価する。また、弾性繊維の断裂化などを観察する

免疫染色で大動脈の中膜や動脈硬化層の平滑筋細胞やマクロファージを定量評価する。

TUNEL 染色で大動脈の中膜や動脈硬化層のアポトーシス陽性細胞を定量評価する。

電顕にて大動脈の中膜や動脈硬化層における平滑筋細胞のオートファゴソームを観察する

コッサ染色で大動脈の中膜や動脈硬化層の石灰化を定量評価する。

・ in vitro

SM22-Cre;Atg7f/f マウスとコントロール(ATg7f/f)から血管平滑筋細胞を初代培養した。

(1)通常の FCS 培養下において細胞死を細胞死検出キットで測定した。

(2)酸化ストレスの刺激により血管平滑筋細胞にオートファジーが誘導されるかを LC-1, LC-II, P62 などのオートファジーに関連する因子をウエスタンブロッティング法で検討した。

(3)酸化ストレスを刺激した際の細胞死を細胞死検出キットで測定した。この際の、細胞死にかかわるシグナルをウエスタンブロッティング法で検討した。

4. 研究成果

In vivo

Atg7f/f マウスに SM22^{-Cre} マウスを交配し血管平滑筋特異的 Atg7 欠損マウス

(SM22^{-Cre/+};Atg7f/f)および WT(SM22^{+/+};Atg7f/f)を作製した。さらに、この血管平滑筋特異的 Atg7 欠損マウスに apoE 欠損マウスを交配し、平滑筋特異的 ATG7 欠損 apoE 欠損マウスとコントロール apoE 欠損を作成した。動脈硬化における血管平滑筋のオートファジーの機能解析を行うため、平滑筋特異的 ATG7 欠損 apoE 欠損マウスとコントロール apoE 欠損に 10 週令の時点で Western diet(1.25%コレステロール含)を 14 週間負荷して、動脈硬化病変に対する血管平滑筋細胞のオートファジーの役割を検討した。

高コレステロール食を 14 週間負荷後、WT に比較して ATGKO では摂食量が低下しており、体重が減少していた。摂食量が低下したためか、WT に比較して ATGKO では血清のコレステロール値が有意に低値であった。一方で、血管平滑筋は血管の収縮にも関連しているが、両群間で血圧に有意な差は認めなかった。

興味深いことに、14 週間の高コレステロール食を負荷中、WT に比較して、ATGKO では有意に死亡数が増加した(図 1)。この一部では胸腔内に出血を認め、胸部に動脈瘤性病変を認めた。従って、死亡したマウスの一部は動脈瘤の破裂が死因と考えられた。

次に 14 週令のマウスの大動脈を抽出し、oil red O 染色を行った。この結果、WT に比較して ATGKO では大動脈の oil red O 陽性面積が増加していた。さらに、動脈瘤の好発部位である腹部動脈の腎動脈直上領域に着目して解析を行った。WT に比較して ATGKO では、腹部大動脈領域の血管径の拡張を認めた。従って、この領域では動脈硬化によるポジティブリモデリングあるいは動脈瘤が引き起こされていると推測された。そこで、同部位に焦点をあて、平滑筋細胞のオートファジーが動脈硬化性病変にどのような影響を与えているかを同部位の切片を作成し、免疫染色等にて評価した。

まず、HE 染色では WT に比較して ATGKO で著明に動脈硬化層が進展していることが確認された(図 2)。電顕では、ATGKO に比較して WT の動脈硬化層の平滑筋細胞にオートファジーが誘導されていることを確認した。次に、アポトーシスやネクローシス、fibrous cap の厚さ、脂肪沈着、コラーゲン線維、マクロファージ数などを HE 染色や免疫染色等で比較検討した。その結果、WT に比較して ATGKO では腹部大動脈のプラーク層のアポトーシス陽性細胞数が著明に増加しており(図 3)平滑筋細胞の陽性面積も著明に低下していた。コラーゲン陽性面積やマクロファージ陽性面積は両群間で有意な差は認めなかった。WT に比較して ATGKO では fibrous cap が厚かったが一部希薄化しており、ネクロティックコアが著明に増大しており、プラークが脆弱化していると考えられた。

また、中膜の平滑筋細胞数は低下し、アポトーシス陽性細胞は、WT に比較して ATGKO で有意に増加していた。一部には、中膜の脆弱化により動脈瘤性病変を認めた。

以上 *in vivo* のデータより、血管平滑筋細胞のオートファジーは、平滑筋細胞のアポトーシスを亢進させることにより、動脈硬化促進的に働いていると考えられた。また、一部の ATGKO では、中膜の脆弱化を介して動脈瘤性病変を認めた。

In vitro

初代培養された ATGKO と WT の血管平滑筋細胞を用いて、通常の FCS 培養下において細胞死を細胞死検出キットで測定した。WT に比較して、ATGKO の平滑筋細胞では、細胞死が亢進していた。次に、酸化ストレスの刺激 (H2O2) により血管平滑筋細胞にオートファジーが誘導されるかを LC-11, LC-11, P62 などのオートファジーに関連する因子をウエスタンブロッティング法で検討した。この結果、WT の血管平滑筋細胞では、H2O2 により、LC-11 の増加が認められ、オートファジーが誘導されていると考えられた。一方で、ATGKO の平滑筋細胞では H2O2 の刺激で LC-11 が増加せず、P62 の増加が認められたことから、オートファジー不全状態であることが確認できた。H2O2 を刺激した際の細胞死を細胞死検出キットで測定した。その結果、H2O2 を負荷すると WT に比較して ATGKO マウスではアポトーシスに関わるシグナルが亢進していた。

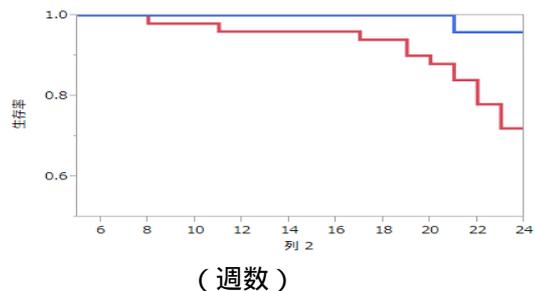
これらのデータをまとめると、血管平滑筋細胞におけるオートファジーは、高コレステロール血症などによる酸化ストレスの増加による平滑筋細胞のアポトーシスに対して保護的に作用し、動脈硬化の進展を抑制する可能性がある。

全世界において心血管イベント抑制は重要な課題である。様々な動脈硬化の発症進展を抑制する薬が開発され、患者の生命予後は改善してきているものの十分ではないのが現状である。オートファジーの動脈硬化における役割を示唆する *in vitro* の報告が症数なされている。しかし、オートファジーが動脈硬化のどの段階に誘導されるのかあるいは何らかの役割を果たすのかなど不明な点が多い。本研究で、血管平滑筋細胞のオートファジーは動脈硬化の進展に対して保護的に働くことが新規に見出された。今後、動脈硬化の進展に伴いオートファジー不全が引き起こされた際に、オートファジーを誘導させるような治療法が開発されれば、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

能性があると考えられる。

図 1. 生存曲線

WT に比較して ATGKO では生存率が有意に低下していた。



青 WT 赤 ATGKO

図 2 . 動脈硬化性病変

HE 染色で動脈硬化性病変を比較検討した。WT に比較して、ATGKO では動脈硬化性病変が増加していた。

WT



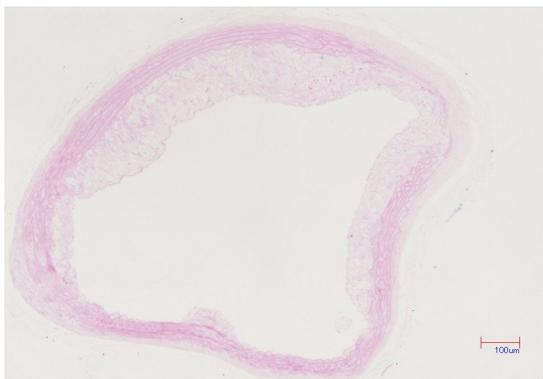
ATGKO



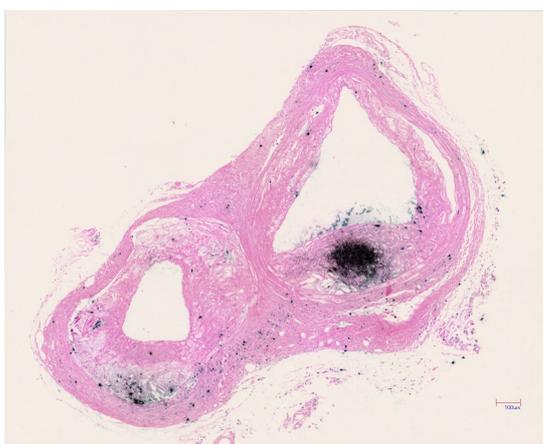
図3 TUNEL 陽性細胞の比較

TUNEL 染色での細胞死に関する検討。WT に比較して、ATGKO では TUNEL 陽性細胞が増加していた。

WT



ATGKO



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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三田 智也 (Tomoya Mita)

順天堂大学大学院 代謝内分泌内科学
准教授

研究者番号：90532557

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：