

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790785

研究課題名(和文)血管内膜肥厚における酸化ストレス防御応答制御因子Nrf2の役割

研究課題名(英文)Role of the redox-sensitive transcription factor Nrf2 in vascular neointimal hyperplasia

研究代表者

芦野 隆 (Ashino, Takashi)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：00338534

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)：酸化ストレスは、血管平滑筋細胞の機能を障害し、動脈硬化の原因となる血管内膜肥厚を引き起こす。本研究では、生体内の酸化ストレス防御を担っているNrf2システムの血管平滑筋細胞遊走および血管傷害後の内膜肥厚における役割について検討を行った。その結果、Nrf2システムは、血小板由来増殖因子刺激による活性酸素種の産生と消去を制御することで血管平滑筋遊走を抑制し、さらにマウス大腿動脈のワイヤー傷害による血管内膜肥厚を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) are important mediators for platelet-derived growth factor (PDGF) signaling in vascular smooth muscle cells (VSMCs), whereas excess ROS-induced oxidative stress contributes to the development of vascular diseases, such as atherosclerosis. Activation of Nrf2 system is pivotal in cellular defense against oxidative stress by transcriptional upregulation of antioxidant proteins. This study aimed to elucidate the role of Nrf2 in PDGF-mediated VSMC migration and neointimal hyperplasia. PDGF promoted nuclear translocation of Nrf2, followed by the induction of target genes. Nrf2 depletion enhanced PDGF-promoted ROS production and -enhanced VSMC migration. In vivo, Nrf2-deficient mice showed enhanced neointimal hyperplasia in a wire injury model. These findings suggest that the Nrf2 system plays an important role in PDGF-stimulated VSMC migration via regulating ROS elimination, which may contribute to neointimal formation after vascular injury.

研究分野：毒性学

キーワード：動脈硬化 酸化ストレス 血管内膜肥厚 血管平滑筋細胞 細胞遊走 血小板由来増殖因子 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

我が国において心疾患は、死因別にみた死亡率で第2位であり、近年さらに増加する傾向にある。虚血性心疾患につながる動脈硬化発症のリスクファクターである高血圧、高脂血症、喫煙などが、いずれも生体の酸化ストレスを増大させることが報告されている。近年、活性酸素種 (ROS) がシグナル伝達分子として機能し、血管内膜肥厚の原因となる血管平滑筋細胞 (VSMC) の遊走や増殖を促進させることが明らかとなり、酸化ストレスと動脈硬化進展の関連性がますます注目されている。

酸化ストレスとは、生命活動、病態、紫外線や化学物質の暴露などで発生した ROS やフリーラジカルにより引き起こされ、動脈硬化、糖尿病、炎症増悪、発ガンなどの原因になることが示唆されている。生体には、酸化ストレスから組織の恒常性を維持するために、ROS に対する様々な消去系が存在している。その中でも、ROS センサーとして機能し、酸化ストレス防御遺伝子群の発現を統合的に制御する転写因子 Nrf2 が、酸化ストレス防御において中心的な役割を果たしていることが示唆されている。

Nrf2 は、1994 年にクローニングされて以来、その生体防御機能が注目され、化学物質暴露による発ガンや肺傷害を抑制することが明らかにされている。申請者らもこれまで、Nrf2 とその標的遺伝子が免疫系賦活時において酸化ストレスの要因となる過剰な一酸化窒素合成酵素発現を抑制すること、また薬毒物処置により誘発される臓器傷害に対して保護作用を示すことを明らかにしてきた。しかしながら、Nrf2 の血管内膜肥厚における役割については、明らかとなっていない。

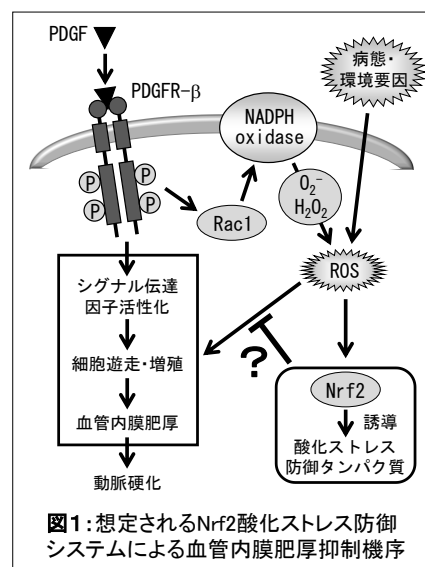
本研究により、Nrf2 酸化ストレス防御システムが血管組織においても機能し、動脈硬化発症や血管再狭窄に関与する過剰な VSMC 遊走および増殖と新生内膜肥厚に関与していること、また Nrf2 の標的である酸化ストレス防御遺伝子群の協調的な働きが生態防御機能発揮に重要であることが証明できると考えている。また Nrf2 システムの抗動脈硬化機能の解明は、Nrf2 をターゲットにした虚血性心疾患の予防や治療法の探索に貢献できると考える。

2. 研究の目的

血管傷害後の組織修復は、VSMC の遊走が重要な役割を担っている。しかし、酸化ストレスにより VSMC の機能が障害されると修復段階で過剰な血管内膜の肥厚が生じ、動脈硬化につながることを示唆されている。生体内において酸化ストレス防御に中心的な役割を果たしているのが、細胞内レドックス変化に鋭敏に反応し、各種抗酸化酵素の遺伝子発現を統

合的に制御する転写因子 Nrf2 である。本研究は、まだ明らかにされていない Nrf2 酸化ストレス防御システムの血管の新生内膜形成および肥厚段階における役割 (図1) の解明を目的に、以下のことを到達目標として研究を行う。

- (1) 血小板由来増殖因子 (PDGF) 刺激による VSMC の遊走における Nrf2 の役割
- (2) PDGF 刺激による Rac1 の活性化および ROS の産生・消去における Nrf2 の役割
- (3) PDGF シグナル伝達系の活性化における Nrf2 の役割
- (4) 血管内膜肥厚における Nrf2 の役割



3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ラット大動脈平滑筋細胞 (RASM 細胞) は、雄性 Sprague-Dawley ラット胸部大動脈からコラゲナーゼ/エラスターゼ溶液を用いた酵素消化法により単離した。RASM 細胞は、10% ウシ血清含有 DMEM 培地で培養し、薬物刺激 24 時間前に、血清非含有 DMEM 培地に交換した。

(2) 実験動物

実験動物は、C57BL/6 系雄性 8 週齢の野生型 (Wild-type, WT) または Nrf2 遺伝子欠損 (-/-) マウスを用いた。遺伝子型は、PCR により決定した。

(3) Modified Boyden chamber アッセイ法

細胞のケモタキシスは、8 μmポアサイズのトランスウェルチャンバーを用いた。チャンバー上方に細胞を播種し、薬物をチャンバー下側に処置し、8 時間後の遊走細胞数を計測した。

(4) ウェスタンブロット法

4%SDS 溶液に可溶化した細胞サンプルを SDS-PAGE 後、PVDF メンブランに転写した。各タンパク質は、酵素抗体化学発光法に基づき検出した。

(5) Rac1 activity assay

細胞可溶化液に含まれる活性型 Rac1 を、活性型 Rac1 (Rac-GTP) のみが特異的に結合する GST 結合 PAK-1 タンパク質結合領域ペプチドを用いて、pull-down した。その後、Western blot 法により、Rac1 を検出した。

(6) 細胞内 ROS 検出法

活性酸素用蛍光プローブおよび Hoechst 33342 で細胞を処理し、一定時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

(7) 培養細胞の蛍光免疫染色法

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.05%トライトン X-100 で処理した。3%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、1 次抗体で一晩処置した。PBS で洗浄後、蛍光標識された 2 次抗体で 1 時間処理し、その後対比染色として DAPI 溶液による核染色を行った。細胞の観察は、共焦点レーザー顕微鏡で行った。

(8) リアルタイム PCR 法

細胞から全 RNA を抽出し、RNA を逆転写後、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を行った。なお、検出した各 mRNA は恒常的に発現している β -アクチン mRNA で補正した。

(9) 血管傷害モデルの作製

マウス大腿動脈の血管を切開し、0.38mm のストレートワイヤーを 5mm 以上血管に挿入し、内膜を傷害した。ワイヤーを取り除いた後、傷口を糸でしばり、1, 2, 4 週間後に傷害された血管を摘出した。

(10) 血管組織の免疫組織化学染色

5 μ m の厚さにスライスした切片を脱パラフィン後、10%正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体、ビオチン標識二次抗体、ペルオキシダーゼ基質溶液で反応させた。対比染色として核染色を行った。

(11) 血管組織の免疫蛍光染色

5 μ m の厚さにスライスした切片を脱パラフィン後、10%正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体、蛍光標識二次抗体を反応させた。

4. 研究成果

(1) Nrf2 による PDGF 誘発 VSMC 遊走制御

ラットから単離した RASM 細胞に VSMC 遊走を惹起する PDGF を処置すると、Nrf2 の核内への集積 (図 2) と標的遺伝子 (NAD(P)H:キノンオキシドレダクターゼ-1、ヘムオキシゲナーゼ-1、チオレドキシシン-1) の誘導が観察された。そこで、PDGF による VSMC 遊走に対して Nrf2 が機能的役割を果たすか、トランスウェルを用いて遊走アッセイ (Modified Boyden chamber assays) による検討を行っ

たところ、siRNA による Nrf2 のノックダウンがケモタキシス活性を増強させることが明らかとなった (図 3)。また創傷治癒アッセイ (Wound scratch assay) によっても PDGF 存在下で Nrf2 ノックダウンが wound injury 応答による方向性細胞遊走能を増強させることも確認した。PDGF 刺激による VSMC 遊走は、*N*-acetylcysteine、diphenylene iodonium、ebselen などの様々な抗酸化剤の前処置により有意に減弱することや、アデノウイルスを用いたヘムオキシゲナーゼ-1 高発現系で PDGF による VSMC 遊走が減弱することが報告されている。これらの結果から、Nrf2 システムが様々な抗酸化タンパク質の誘導を介して ROS を調節し、酸化ストレスを抑制することで、PDGF による VSMC 遊走を制御していることが示唆された。

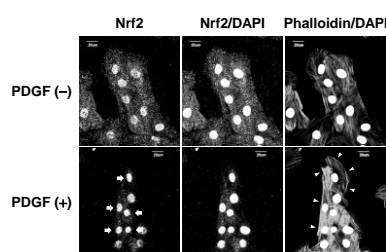


図2: VSMCにおけるPDGFによるNrf2の核移行促進

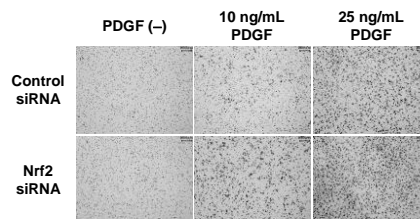


図3: PDGFによるVSMC遊走におけるNrf2の関与

(2) Nrf2 による PDGF 誘発 ROS 産生制御

RASM細胞へのPDGF刺激により、細胞内のROSレベルは5分後から有意に増加し、15から30分にかけてピークに達した。以前に、RASM細胞においてPDGFにより誘導されるROSレベルが、ROS捕捉剤*N*-acetylcysteineやROS産生酵素阻害剤apocyninにより低下することが報告されている。そこで次に、PDGF刺激によるVSMC内のROSレベルの変動におけるNrf2の関与について検討を行った。PDGFは、Control siRNA トランスフェクションおよびNrf2ノックダウン細胞の両方で細胞内ROSレベルを有意に増加させた。しかしながら、Control細胞の細胞内ROSレベルは、PDGF刺激60分後に刺激前のレベルに回復した一方で、Nrf2ノックダウン細胞は、その上昇が60分後においても持続していた (図 4)。これらのことは、VSMCにおいてNrf2システムによる抗酸化機能が、PDGFによるROSの過剰生成と蓄積を抑制していることを示唆している。

VSMCにおいてPDGF刺激により増加するROSの主な生成源はNAD(P)H oxidaseであり、その活性化は酵素複合体サブユニットの会合が要求され、Rac1 GTPaseの活性化によりコントロールされている。そこで、Rac1活性化におけるNrf2の役割についても検討し、Nrf2ノックダウン細胞がControl細胞と比較して、無刺激下およびPDGF刺激下の両方で、Rac1活性の有意な上昇を示すという興味深い知見を得た。Rho family GTPaseである Rac1は、リーディングエッジにおけるラメリポディアの形成やPDGFによる細胞遊走に重要な役割を果たすことから、Nrf2がアクチン細胞骨格系再構築にも関与している可能性が伺える。これらの結果から、Nrf2は細胞内レドックスバランスを維持することで酸化ストレスから細胞を保護するだけでなく、Rac1活性と細胞運動性の調節にも影響を与えると考えられる。

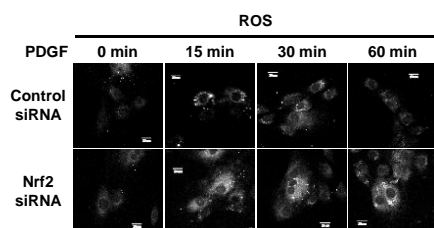


図4: PDGFによるROS産生におけるNrf2の関与

(3) PDGFシグナル伝達系の活性化におけるNrf2の役割

Nrf2ノックダウンにより、PDGFによるVSMCの細胞遊走の亢進とROS産生の持続が認められた。そこで、PDGFによる細胞内シグナル伝達因子活性化におけるNrf2の役割について検討を行った。その結果、マイトジェン活性化プロテインキナーゼのERKのリン酸化がNrf2のノックダウンにより持続した。

(4) Nrf2による血管傷害後内膜肥厚制御

PDGFによるVSMC遊走に関与するNrf2は、血管傷害後の修復にも影響を与えると考え、血管壁における内在性Nrf2の発現と傷害後の発現変動をin vivoで検討するため、WTマウスの大腿動脈にワイヤーを挿入し、内皮の剥離と血管の拡張を行った。傷害7日後の新生内膜形成初期段階において、内弾性板の管腔側でNrf2の高発現が見られた。傷害14日後には、Nrf2を高発現している細胞が血管の中膜および新生内膜部位で観察され、傷害28日後の新生内膜形成後期には傷害前のレベルまで回復した(図4)。このNrf2の発現は、VSMCマーカーである α -smooth muscle actinと共局在していたことから、血管傷害後の新生内膜形成期に、VSMC内の酸化ストレスが増加し、Nrf2が安定化状態にあったこと

を示している。

さらにNrf2が血管傷害後の再構築に直接影響するかどうか検討するために、Nrf2^{-/-}マウス大腿動脈にワイヤー傷害を施行し、WTマウスと比較した。血管傷害4週間後、Nrf2^{-/-}マウスは、WTマウスと比較して、管腔面積の有意な減少と、新生内膜エリアおよび内膜/中膜面積比(I/M比)の有意な増加を示し、Nrf2の欠如が著しく血管内膜肥厚を増大させることが明らかとなった(図5)。動脈硬化進展における抗酸化の役割に関しては、免疫調節薬スルファサラジンと天然ポリフェノールスチルベンのトランスレスベラトロールがNrf2標的遺伝子のヘムオキシゲナーゼ-1誘導を介して内膜肥厚を阻害することが報告されている。これらの結果は、Nrf2がin vivoにおいて血管再構築に寄与し、血管恒常性維持において中心的な役割を果たしていることを示唆している。

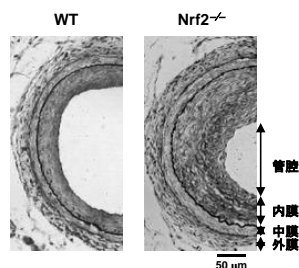


図5: 血管傷害後内膜肥厚におけるNrf2の関与

以上の結果から、レドックス感受性転写因子Nrf2が、PDGF依存性のROS産生を調節し、VSMC遊走と傷害後の血管再構築を調節することで過剰な新生内膜肥厚を抑制するという新規役割が明らかとなった。これらの本申請課題の成果は、Nrf2をターゲットにした虚血性心疾患の予防や治療法の探索に貢献できると考える。

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 5 件)

[1] Ashino T, Hakukawa K, Itoh Y, Numazawa S.

Inhibitory effect of synthetic cannabinoids on CYP1A activity in mouse liver microsomes.

J Toxicol Sci, 39(6):815-20, 2014 (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374372>

[2] Ashino T, Ohkubo-Morita H, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S

Possible involvement of nuclear factor

erythroid 2-related factor 2 in the gene expression of Cyp2b10 and Cyp2a5
Redox Biol, 2:284-288, 2014 (査読有)
DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.025.

[3] Kohno T, Urao N, Ashino T, Sudhahar V, Inomata H, Yamaoka-Tojo M, McKinney RD, Fukai T, Ushio-Fukai M
IQGAP1 links PDGF receptor- β signal to focal adhesions involved in vascular smooth muscle cell migration: role in neointimal formation after vascular injury
Am J Physiol Cell Physiol, 305(6):C591-600, 2013 (査読有)
DOI: 10.1152/ajpcell.00011.2013.

[4] Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S
Redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 33(4):760-768, 2013 (査読有)
DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300614.

[5] Kohno T, Urao N, Ashino T, Sudhahar V, McKinney RD, Hamakubo T, Iwanari H, Ushio-Fukai M, Fukai T
Novel role of copper transport protein antioxidant-1 in neointimal formation after vascular injury
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 33(4):805-813, 2013 (査読有)
DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300862.

[学会発表] (計 11 件)

[1] 芦野 隆, 伯川 加菜絵, 桜井 彩華, 伊藤 有香, 沼澤 聡
危険ドラッグ含有合成カンナビノイドによる薬物代謝酵素シトクロム P450 阻害作用
日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月, 神戸

[2] Ashino T, Yamamoto M, Numazawa S
Novel role of Kelch-like ECH-associated protein 1/NF-E2-related factor 2 system in vascular smooth muscle cell apoptosis following vascular injury
American Heart Association Scientific Sessions 2014, 2014 年 11 月, シカゴ

[3] 芦野 隆, 伊藤 有香, 伯川 加菜絵, 沼澤 聡
合成カンナビノイドによる薬物代謝酵素シトクロム P450 1A 阻害作用
第 41 回日本毒性学会, 2013 年 7 月, 神戸

[4] 渡邊 円香, 芦野 隆, 山本 雅之, 沼澤 聡
MCP-1 によるマクロファージ遊走における

Nrf2 の役割
日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月, 熊本

[5] Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S
Regulatory mechanism of neointimal formation after vascular injury by redox-sensitive transcription factor Nrf2
The XIII International Congress of Toxicology, 2013 年 7 月, ソウル

[6] Tanaka S, Yoshida T, Ashino T, Numazawa S
Lipopolysaccharide-activated microglia induced neurodegenerative animal model such as Parkinson's disease and dementia
The XIII International Congress of Toxicology, 2013 年 7 月, ソウル

[7] 芦野 隆, 山本 雅之, 吉田 武美, 沼澤 聡
転写因子 Nrf2 の ROS-ERK 経路を介した血管傷害後のリモデリング調節機構
第 40 回日本毒性学会, 2013 年 6 月, 千葉

[8] Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S
The redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates reactive oxygen species-dependent vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia
The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012 年 12 月, 徳島

[9] 小柴 郁, 芦野 隆, 山本 雅之, 吉田 武美, 沼澤 聡
血管内膜肥厚における酸化ストレス応答性転写因子 Nrf2 の役割
第 56 回日本薬学会関東支部大会, 2012 年 10 月, 東京

[10] Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S
Role of the redox-sensitive transcription factor Nrf2 in vascular smooth muscle cell migration and vascular remodeling
The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012 年 7 月, 仙台

[11] 芦野 隆, 山本 雅之, 吉田 武美, 沼澤 聡
血管平滑筋細胞遊走および血管リモデリングにおけるレドックス感受性転写因子 Nrf2 の役割
第 39 回日本毒性学会, 2012 年 7 月, 仙台

[その他]
ホームページ等
昭和大学薬学部毒物学部門ホームページ
(<http://www10.showa-u.ac.jp/~toxicol/i>)

ndex.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦野 隆 (ASHINO, Takashi)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：00338534