

令和元年5月31日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01833

研究課題名(和文) 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 roles of smooth muscle cell autophagy

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、オートファジーの機能は、様々な疾患との関連性が示されている。本研究では、マウスモデルを使用して、動脈硬化における平滑筋細胞のオートファジーの役割を検討した。平滑筋細胞のオートファジー機能不全状態に酸化コレステロールなどの負荷がかかると、細胞死や細胞老化が亢進し、動脈硬化層の拡大、プラークの不安定化や一部動脈瘤の破裂が起きることを明らかにした。平滑筋細胞のオートファジーは動脈硬化抑制的に作用している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。本研究の平滑筋細胞のオートファジーが動脈硬化抑制的に作用しているという結果は、今後、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り、意義の高い研究であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Defective autophagy has been implicated in various human diseases, including cardiovascular diseases. In this study, we aimed to elucidate the role of autophagy in vascular smooth muscle cells (SMCs) on atherosclerosis. SMCs cultured from mice with SMC-specific deletion of the essential autophagy gene atg7 (Atg7cK0) by 7-ketocholesterol exposure showed enhanced apoptotic cell death and cellular senescence. Atg7cK0 mice crossed with Apoe-deficient mice showed a reduced survival rate, increased plaque area, and aneurysm formation. In addition, we investigated the role of autophagy in SMCs on plaque instability in vivo. To generate a mouse model of plaque instability, we conducted to form a tandem stenosis in the carotid artery of Atg7cK0:apoeK0 mice. Our data suggest that defective autophagy in SMCs enhances plaque instability and the risk of plaque rupture. Thus, we suggest that activation of SMCs autophagy may be a new therapeutic target to reduce cardiovascular disease.

研究分野：糖尿病学、動脈硬化学

キーワード：オートファジー 平滑筋細胞 動脈硬化 細胞死 細胞老化 プラーク破綻

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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、単球の接着と遊走やマクロファージによる炎症以外にも、平滑筋細胞の増殖と遊走、アポトーシス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、動脈硬化層に存在する平滑筋細胞の慢性的なアポトーシスの亢進が、動脈硬化性病変のさらなる進展を引き起こすことも報告されている (Clarke MH et al. *Circulation Research* 2008)。さらに、中膜に存在する平滑筋細胞のアポトーシスは、大動脈瘤の形成や破裂にも関与することが示されている。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。近年、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、心不全抑制など各種疾患との関連性が示されている。我々もオートファジーが膵β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 (Ebato 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、ヒトやゲッ歯類の動脈硬化層に存在する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ている (Martinet W et al *Circulation Research* 2009 304-317)。血管平滑筋細胞においては、コレステロールや酸化脂質などの負荷によりオートファジーが誘導され (Kockx MM, *Cir Reseach* 1998 378-387) (Martinet W, *ATVB* 2004 2296-2301)、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)。これらの血管平滑筋細胞におけるオートファジーの役割は、動脈硬化層のプラークの安定化や動脈硬化の進展抑制に繋がっている可能性がある。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、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。それ故、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、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 (以下 ATG7KOapoE マウス、Control apoE マウス) を作製し、動脈硬化の進展過程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してきた。

それらのマウスに高コレステロール食を 14 週間負荷すると、Control apoE マウスに比較して、ATG7KOapoE マウスでは有意に死亡数が増加した。死亡した一部のマウスでは胸腔内に出血を認め、胸部に動脈瘤性病変を認めた。また、Control apoE マウスに比較して ATG7KOapoE マウスでは大動脈の oil red O 陽性面積が増加していた。さらに、腹部大動脈領域の動脈硬化層では、Control apoE マウスに比較して ATG7KOapoE マウスでは fibrous cap が一部希薄化し、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、Control apoE マウスに比較して ATG7KOapoE マウスで有意に増加していた。従って、一部のマウスでは、中膜の脆弱化が動脈瘤性病変発症の要因になっていると考えられた。

以上の結果から、血管平滑筋細胞のオートファジー機能不全モデルマウスでは、平滑筋細胞の細胞死が増加し、動脈硬化層の拡大や一部動脈瘤の破裂が引き起こされ、死亡率が増加していた。しかし、平滑筋細胞のオートファジー機能不全モデルマウスでの細胞死増加のメカニズムやプラーク破綻に対する影響は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、平滑筋細胞のオートファジーの機能不全が生じた場合に平滑筋細胞の細胞死が増加するメカニズムを検討する。また、これまでの得られた結果をさらに発展させるために平滑筋細胞のオートファジーの機能不全のプラークの破綻における役割を検討する。

3. 研究の方法

In vitro

- (1) 平滑筋細胞のオートファジー機能不全が生じた場合に平滑筋細胞の細胞死が増加するメカニズムに関する検討

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 F C S 培養下の SM22-Cre;Atg7f/f マウスとコントロールから単離した血管平滑筋細胞に 7-ケトコレステロール (7-KC) を負荷して、オートファジーが誘導されるかを LC-I, LC-II, P62 などのオートファジーに関連する因子に関してウエスタンブロッティング法で検討した。
- ② 7-KC を負荷後、細胞死のマーカーである cleaved キヤスパーゼ 3 をウエスタンブロッティング法で検討した。また、細胞死にかかわるシグナルを DNA 損傷のマーカーであるヒストン H2AX や p53 リン酸化、また、ケモカインである MCP-1 をウエスタンブロッティング法で検討した。
- ③ 7-KC 負荷による細胞老化の影響を SA- β -gal 染色で評価した。

In vivo

(2) 平滑筋細胞のオートファジー機能不全のプラーク破綻に対する影響に関する検討

10 週令の ATG7K0apoE マウス、Control apoE マウスに麻酔後、頸部を切開し、右総頸動脈を露出し、直径 150 μ m の針金を総頸動脈にそわせた。針金と血管をまとめて 6-0 ナイロン縫合糸で、分岐部の手前とそこから遠位部の 2 カ所を結紮した。針金を引き取り、縫合糸のみを残すことにより血管狭窄モデルが作製できた。術後、5 週間、高脂肪食で飼育し、右頸動脈を摘出した。組織検体に関して H.E 染色、p62 染色、鉄染色であるベルリン青染色などを行った。

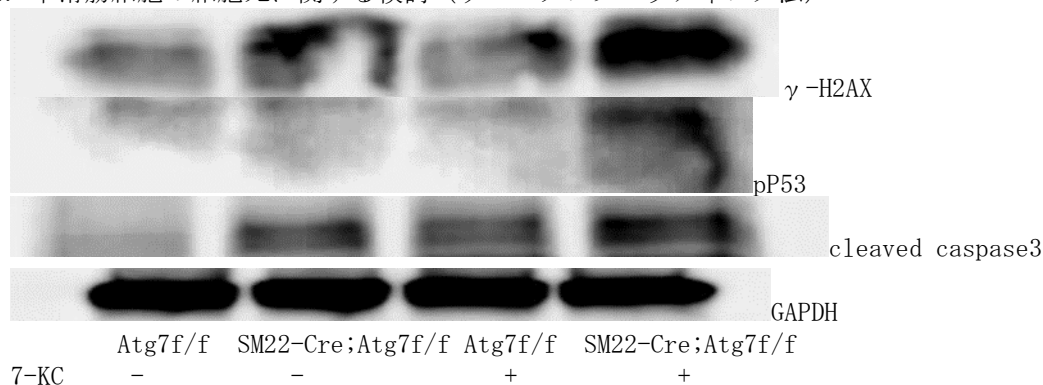
4. 研究成果

(1) 平滑筋細胞のオートファジー機能不全が生じた場合に平滑筋細胞の細胞死が増加するメカニズムに関する検討

Atg7f/f マウスと SM22-Cre;Atg7f/f マウスから単離した平滑筋細胞の間に cleaved キヤスパーゼ 3 の発現レベルに差はなかった。これまでの検討では、ATG7K0apoE マウスでは、西洋食を負荷した時にのみ、外側へのリモデリングを伴った動脈硬化の進展を示した。そこで、SM22-Cre;Atg7f/f マウスより単離した平滑筋細胞に酸化 LDL コレステロールを含有する動脈硬化惹起性の 7-KC を負荷することとした。まず、Atg7f/f マウスの平滑筋細胞に 7-KC を負荷するとオートファジーが誘導されることを確認した。次に、7-KC を負荷した際に、平滑筋細胞の細胞死に与える影響を検討するため、cleaved キヤスパーゼ 3 の発現量をウエスタンブロッティング法にて評価した。その結果、Atg7f/f マウスの平滑筋細胞でも負荷後の cleaved キヤスパーゼ 3 の発現レベルは増加したが、SM22-Cre;Atg7f/f マウスの平滑筋細胞でより増加していた (図 1)。同様に、DNA 損傷のマーカーであるヒストン H2AX や p53 リン酸化はコントロールに比較して、SM22-Cre;Atg7f/f マウスの平滑筋細胞でより増加していた (図 1)。さらに、老化マーカーである SA- β -gal 染色陽性細胞数は、コントロールに比較して SM22-Cre;Atg7f/f マウスの平滑筋細胞で増加していた。7-KC 負荷により SM22-Cre;Atg7f/f マウスの平滑筋細胞では آپトーシスや老化が起こりやすくなると共に、MCP-1 の発現も増加していた。

以上の結果より、平滑筋細胞のオートファジー機能不全状態に酸化コレステロールなどの負荷がかかると酸化ストレスの増加などにより細胞障害が起きて、p53 経路が活性化される。それに伴い、細胞死や細胞老化が亢進し、MCP-1 の分泌が増加させることが分かった。血管壁局所の炎症は、マクロファージなどの炎症細胞を血管壁に集積させ、血管壁の構造破壊をもたらす一因になっていると考えられた (まとめ図参照)。

図 1. 平滑筋細胞の細胞死に関する検討 (ウエスタンブロッティング法)

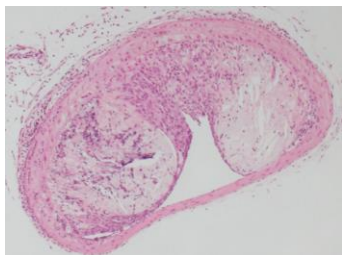


(2) 平滑筋細胞のオートファジー機能不全のプラーク破綻に対する影響に関する検討

まず、シャム手術を行った Control apoE マウスと ATG7K0apoE マウスの右総頸動脈の切片を評価した。いずれのマウスにおいても血栓病変は認めなかった。これらの切片におけるオートファジーの発現量をその機能低下のマーカーである P62 で評価した。Control apoE マウスの右総頸動脈では、中膜に P62 陽性細胞はほとんど認めなかった。一方で、ATG7K0apoE マウスでは、中膜に存在するほとんどの細胞で P62 陽性であった。次に、血管狭窄術を施行した Control apoE マウスと ATG7K0apoE マウスの右総頸動脈の切片を評価した。ATG7K0apoE マウスの右総頸動脈では、増加したアテロームを認めた。これらの病変は、泡沫化細胞、遊走した平滑筋細胞やコレステロール結晶を含む壊死など様々なステージの動脈硬化性変化の特徴を示した(図 2)。アテロームの表面は厚い線維性被膜に覆われているが、一部では線維性被膜は薄くなっていた。他方、Control apoE マウスではそのような病変はほぼ認めず、小さなアテロームを示すのみであった。シャム手術の ATG7K0apoE マウスに比較して血管狭窄術を施行した ATG7K0apoE マウスでは、P62 陽性細胞がさらに増加していた。特に、血管狭窄術を施行した ATG7K0apoE マウスでは、血管中膜のみならず、アテロームにも P62 陽性細胞が観察された。Control apoE マウスに比較して ATG7K0apoE マウスでは、血管狭窄術後の血管内腔の狭窄率が有意に増加していた。さらに、ATG7K0apoE マウスにのみ管腔内血栓を認めた。

図 2. 不安定なプラーク性病変(HE 染色)

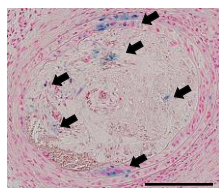
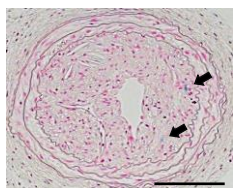
泡沫化細胞、遊走した平滑筋細胞やコレステロール結晶を含む壊死など様々なステージの動脈硬化性変化の特徴を示している。アテロームの表面は厚い線維性被膜に覆われているが、一部では線維性被膜は薄くなっている。



次に、血管平滑筋細胞のオートファジーのプラーク不安定化に与える影響を検討するために、プラーク内出血をベルリン青染色で評価した。Control apoE マウスのアテロームでは、ベルリン青染色陽性部位は、ほとんど認めなかった(図 3)。一方、ATG7K0apoE マウスのアテロームでは、ベルリン青染色陽性部位を多く認めた(図 3)。また、ベルリン青染色陽性泡沫細胞も認めた。ベルリン青染色陽性泡沫細胞の存在は、マウスが生きているときに、赤血球やヘモグロビンを泡沫細胞が同食したことを示している。すなわち、プラーク内出血を示唆する所見と考えられる。

また、14 匹中 5 匹の ATG7K0apoE マウスで血栓性病変を認めたが、Control apoE マウスでは血栓性病変は認めなかった。それら 5 匹の血栓性病変のうち、2 つは、血管壁側から新生した毛細血管、繊維芽細胞やコラーゲンで構成された管腔内血栓であり、器質性血栓と考えられた。他の 3 つは、白血球浸潤や新生血管を特徴としたアテローム血栓であった。これらの結果は、血管狭窄術施行後の ATG7K0apoE マウスはプラークの破綻や血栓形成を起こしやすいことを示している。

図 3. ベルリン青染色



Control apoE マウス

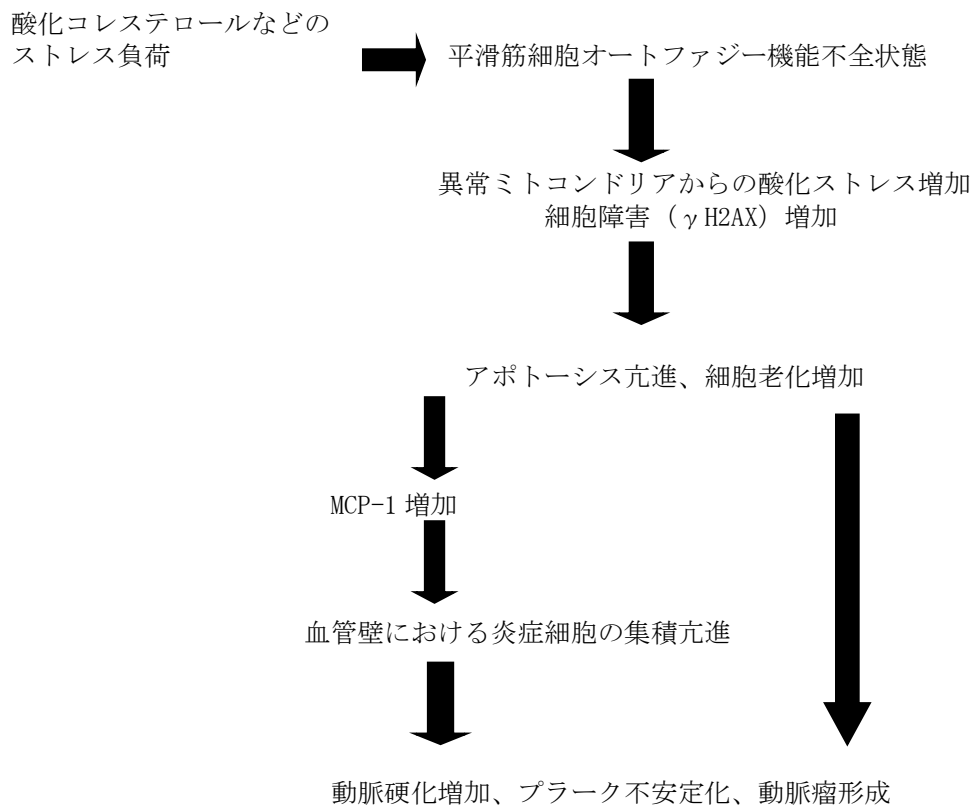
ATG7K0apoE マウス

本研究では、プラーク破綻モデルを使用することにより、血管平滑筋細胞のオートファジーの機能低下がプラークの不安定性に関与していることが明らかになった。特に、プラークの破綻や不安定性に関連する所見として、プラーク内出血や管腔内血栓が挙げられる。プラーク内出血は、プラーク内の新生血管の破綻あるいはプラークの破綻により管腔内よりプラーク内に赤血球が侵入した際に認められる所見である。他方、管腔内血栓は、プラークの

破綻により、血液とプラークが相互に影響を与えた場合に認められる所見である。このようなプラークの破綻や不安定性に関連する病変は、ATG7K0apoE マウスで多かった。

血管平滑筋細胞のオートファジー機能低下がプラークの不安定化に寄与する機序は明らかではないが、血管平滑筋細胞のオートファジーの機能の低下は、平滑筋細胞の細胞死を増加させることを知見として得ている、細胞死の亢進がプラークの不安定性にも関わっている可能性があると考えられた（まとめ図参照）。

まとめ図



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances atherosclerotic plaque instability.

Masuyama A, Mita T, Azuma K, Osonoi Y, Nakajima K, Goto H, Nishida Y, Miyatsuka T, Mitsumata M, Watada H.

Biochem Biophys Res Commun. 2018 Nov 10;505(4):1141-1147.

Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis.

Osonoi Y, Mita T, Azuma K, Nakajima K, Masuyama A, Goto H, Nishida Y, Miyatsuka T, Fujitani Y, Koike M, Mitsumata M, Watada H.

Autophagy. 2018;14(11):1991-2006.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：遅野井 雄介

ローマ字氏名：(OSONOI yusuke)

研究協力者氏名：増山 敦

ローマ字氏名：(MASUYAMA atsushi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。