

令和元年6月21日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09250

研究課題名(和文)血管老化・動脈硬化に対するオルタナティブオートファジーを軸とした治療法の開発

研究課題名(英文) Alternative Autophagy is The Predominant Form of Autophagy in Regulating Arterial Senescence and Atherosclerosis

研究代表者

池田 義之 (Ikeda, Yoshiyuki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：00573023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：閉経における血管老化動脈硬化進展の分子機序を検討した。培養血管平滑筋細胞を使った研究においてエストロゲン受容体を阻害したところ、マイトファジー低下による異常ミトコンドリアの蓄積から細胞老化が進展した。正常マウスに卵巣摘除を行った研究でも、マイトファジー低下から異常ミトコンドリアが蓄積し血管老化が進展した。エストロゲン補充によりマイトファジーと血管老化は回復したが、これらはAtg5やAtg7には非依存性であり、Rab依存性であったことから、オルタナティブオートファジーがこのマイトファジーの主体であると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉経に伴う血管老化・動脈硬化の進展機序にRab9-依存性オルタナティブオートファジーを主体にしたマイトファジーの低下が関与することが本研究により明らかとなった。現在、閉経女性に対してホルモン補充療法が施行されるが、様々な副作用の問題がある。今回の我々の研究成果は、ホルモン補充療法に代わる新たな治療方法の確立に寄与できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria plays a crucial role to regulate cellular senescence, which undergo mitophagy to maintain mitochondrial quality. Female C57BL6 mice with ovariectomy (Ovx) showed lower plasma estrogen level and fewer number of mitophagy, mitochondrial dysfunction and accelerated arterial senescence compared to C57BL6 with sham operation. Whereas protein expression of arterial LC3II/LC3I was not different between the 2 groups, that of Rab9 was significantly lower in Ovx than in sham mice. Administration of Estradiol (E2) to Ovx increased Rab9 and mitophagy, improved mitochondrial function and retarded arterial senescence. In vitro experiment using HUVEC and VSMC demonstrated that E2 retarded cellular senescence and increased Lamp2 dots which co-localized with Rab9 and TOMM20 dots assessed by Immunohistochemistry, which was abolished by knockdown of Rab9. Rab9-induced alternative autophagy plays a crucial role in mediating Rab9-dependent mitophagy and retarding vascular senescence.

研究分野：循環器病、老年病

キーワード：オルタナティブオートファジー マイトファジー 血管老化 エストロゲン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景：加齢とともに血管が老化し動脈硬化が進展するが、女性においては閉経後にこうした変化が加速度的に進展し心血管疾患イベントを生じることが問題になっている。ミトコンドリアで産生される活性酸素は血管の老化・動脈硬化進展の主因の一つであり、ミトコンドリアに異常が蓄積するとさらにこの産生が増大する。近年、異常ミトコンドリアはオートファジーによる選択的ミトコンドリア除去機構である「マイトファジー」により排除されることが明らかとなってきた。マイトファジーを介してミトコンドリアの質を良好に維持することが、血管の老化や動脈硬化防止につながる可能性がある。

2. 研究の目的：閉経における血管老化・動脈硬化進展の分子機序を明らかにし、治療ターゲットを検討すること。

3. 研究の方法

(1) in vitro 研究：

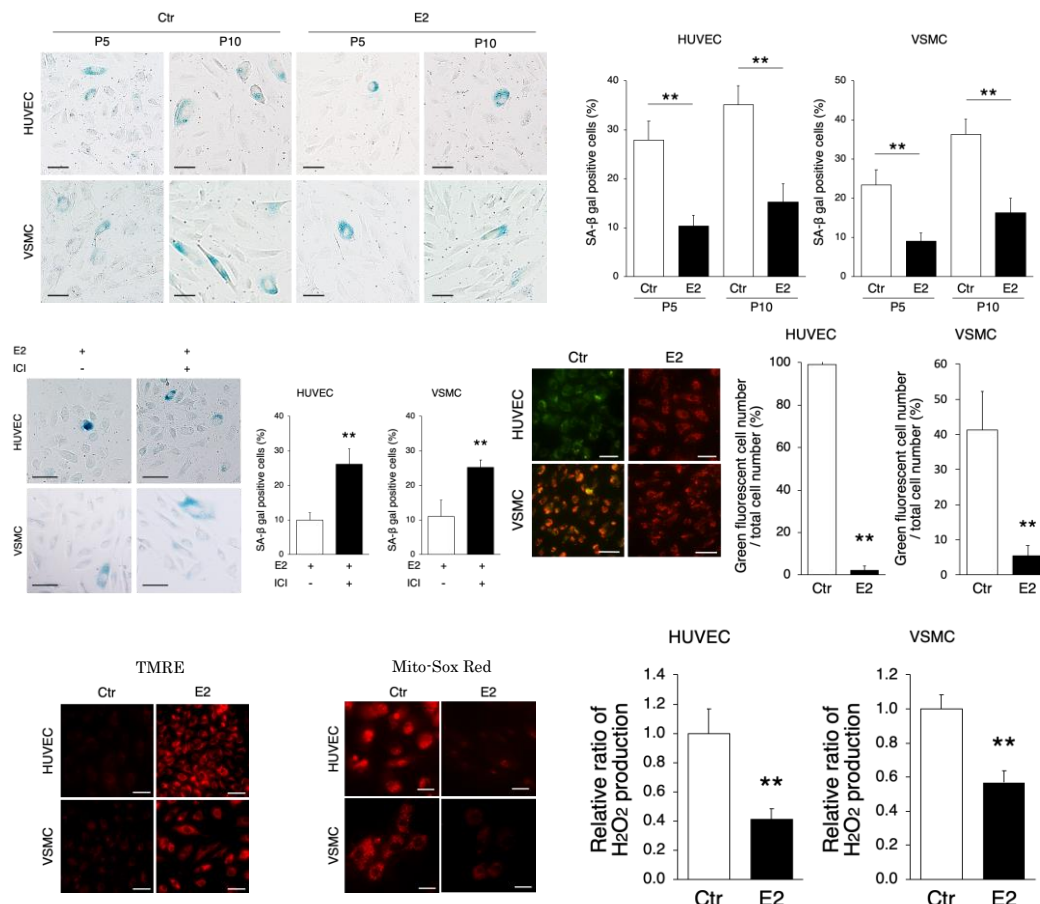
- ・培養血管平滑筋細胞 (VSMC) および血管内皮細胞 (HUVEC) を使用。細胞培養培地をエストロゲンフリーにする、もしくはエストロゲン受容体阻害薬 ICI を投与し、閉経状態を再現した。
- ・オートファジー/マイトファジーを、電子顕微鏡や免疫組織化学染色さらに Western blot にて評価した。
- ・ミトコンドリア機能を、Mito-Sox Red、JC-1、TMRE、Amplex Red Assay、H2O2 production assay で評価した。
- ・siRNA を用いた knock down 実験を行った。
- ・エストラジオールを添加したレスキュー実験を行った。

(2) in vivo 研究：

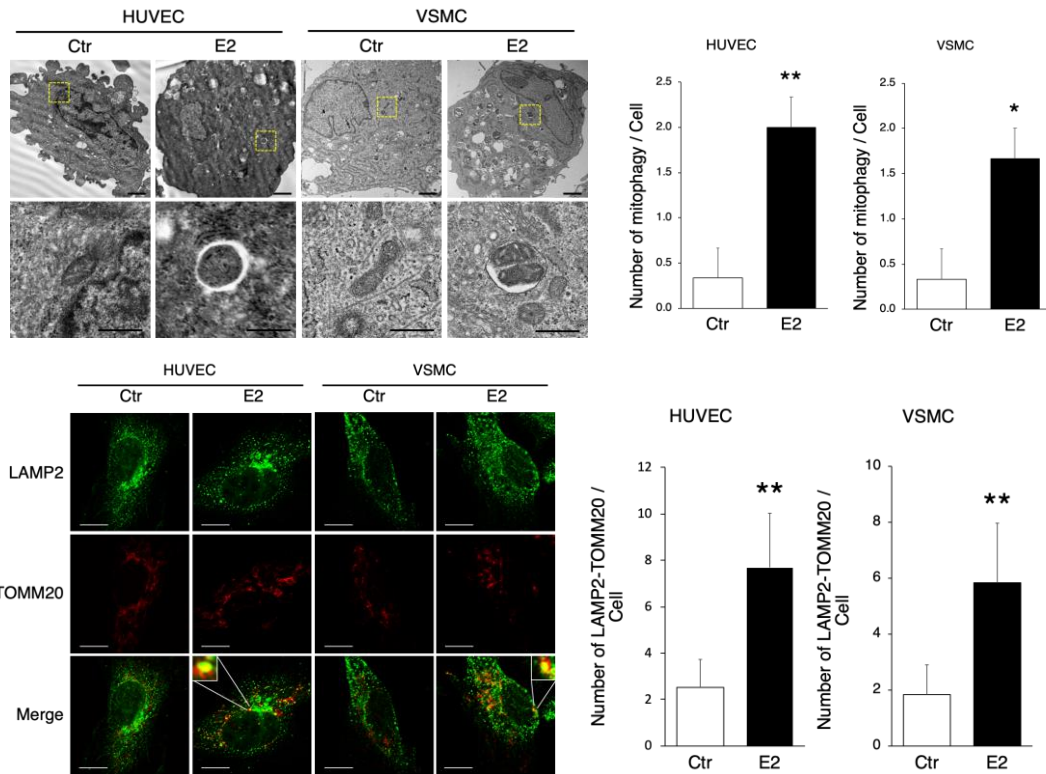
- ・雌 12 週齢の C57BL6 マウスを使用。卵巣摘除を行った群 (Ovx) と sham 手術群の二群を作成し実験を行った。
- ・オートファジー/マイトファジーを、電子顕微鏡や免疫組織化学染色さらに Western blot にて評価した。
- ・ミトコンドリア機能を、H2O2 production assay で評価した。
- ・Ovx マウスにエストラジオールを投与したレスキュー実験を行った。

4. 研究成果

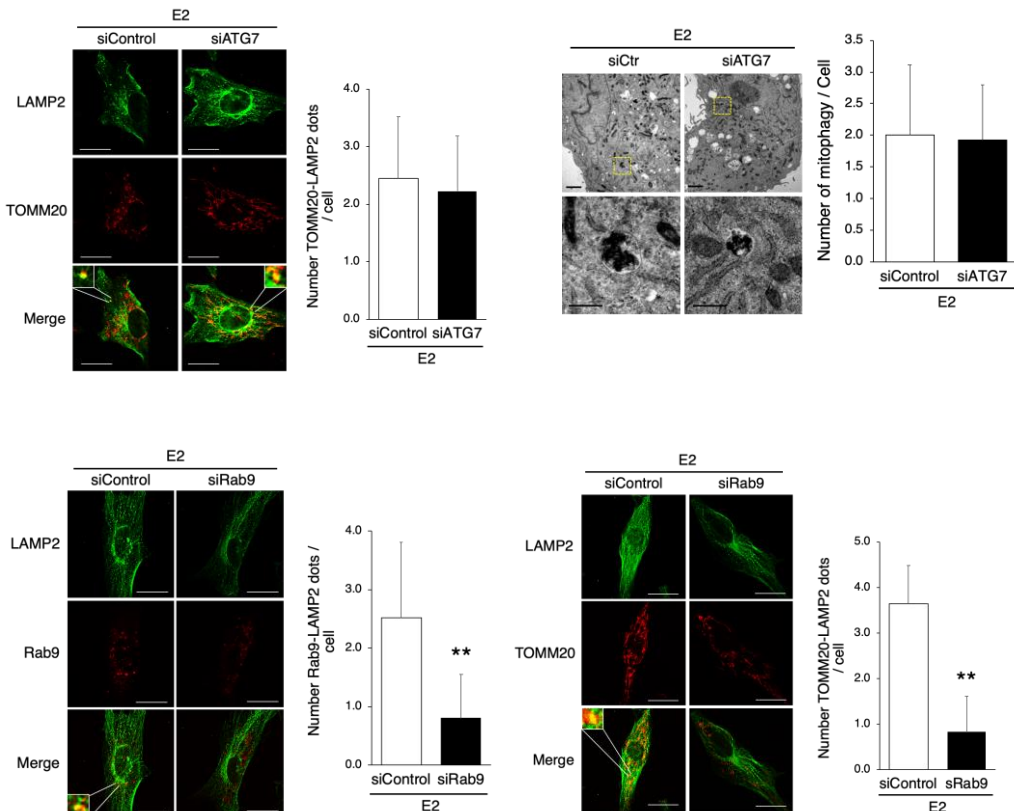
in vitro 研究においてエストロゲン受容体を阻害し閉経状態を再現したところ、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア由来酸化ストレス増大、Senescence-associated β Galactosidase 染色の増強、p53, PAI-1 発現の増強を認め、細胞老化が促進された。これらは、エストラジオール (E2) 投与により回復した。



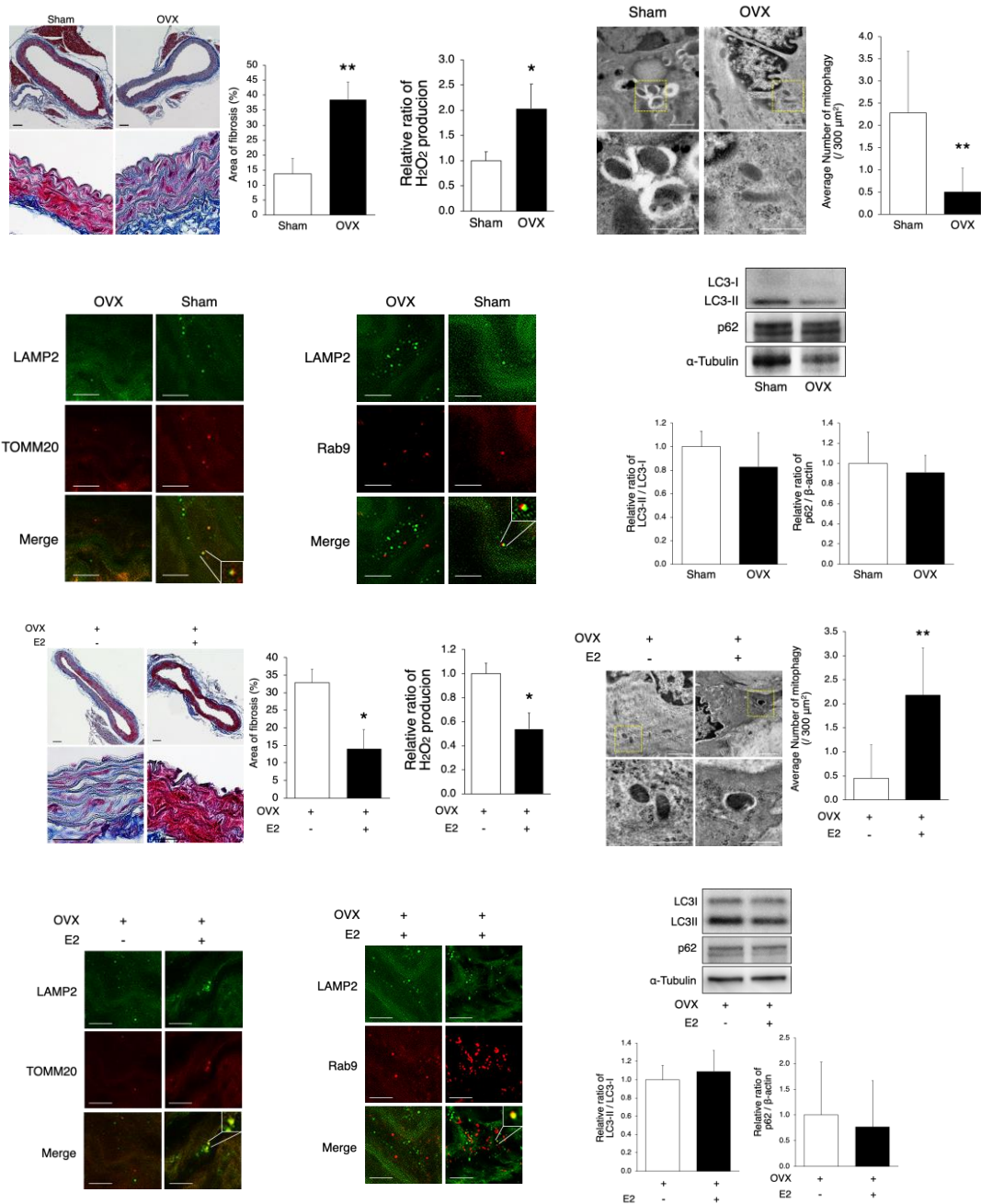
さらに免疫組織化学染色や電子顕微鏡による検討により、その要因としてマイトファジーの低下による異常ミトコンドリアの蓄積であることが明らかになった。



閉経状態再現に伴う血管・細胞内マイトファジーの低下やエストロゲン補充による回復は、Atg7 を knockdown しても観察されるものの、Rab9 knockdown により影響を受けたことから、今回のモデルにおいて影響をうけたマイトファジーは、Atg7/LC3 非依存性で Rab9 依存性のオルタナティブオートファジ発現抑制が主体であり、Atg7 依存性で LC3I から II への変換が必須のコンベンショナルオートファジーの関与は低いことが判明した。



C57BL6 マウスに卵巣摘除を行った *in vivo* 研究でも同様に、血中エストロゲン濃度の低下に伴い、血管におけるミトファジー低下から異常ミトコンドリアが蓄積し酸化ストレス増大から血管老化が進化した。*in vivo*, *in vitro* 実験ともに、エストロゲン補充によりミトファジーは回復し、血管老化が抑制された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Sasaki Y, Ikeda Y, Miyauchi T, Uchikado Y, Akasaki Y, Ohishi M. Estrogen-SIRT1 Axis Plays a Pivotal Role in Protecting Arteries Against Menopause-Induced Senescence and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2019 May 18. doi: 10.5551/jat.47993. (査読有)
- (2) Bhat S, Chin A, Shirakabe A, Ikeda Y, Ikeda S, Zhai P, Hsu CP, Sayed D, Abdellatif M, Byun J, Schesing K, Tang F, Tian Y, Babu G, Ralda G, Warren JS, Cho J, Sadoshima J, Oka SI. Recruitment of RNA Polymerase II to Metabolic Gene Promoters Is Inhibited in the Failing Heart Possibly Through PGC-1α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator-1α) Dysregulation. *Circ Heart Fail*. 2019 Mar;12(3):e005529. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005529. (査読有)
- (3) Saito T, Nah J, Oka SI, Mukai R, Monden Y, Maejima Y, Ikeda Y, Sciarretta S, Liu T, Li H, Baljinnayam E, Fraidenraich D, Fritzky L, Zhai P, Ichinose S, Isobe M, Hsu CP, Kundu M, Sadoshima J. An alternative mitophagy pathway mediated by Rab9 protects the heart against ischemia. *J Clin Invest*. 2019 Feb 1;129(2):802-819. doi: 10.1172/JCI122035. Epub 2019 Jan 22. (査読有)

- (4) Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, Akasaki Y, Ohishi M. The Impact of Autophagy on Cardiovascular Senescence and Diseases. *Int Heart J*. 2017 Oct 21;58(5):666-673. doi: 10.1536/ihj.17-246. Epub 2017 Sep 30. (査読有)
- (5) Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, Zablocki DK, Sadoshima J. Aging and Autophagy in the Heart. *Circ Res*. 2016 May 13;118(10):1563-76. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.307474. (査読有)
- (6) Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, Saito T, Maejima Y, Hsu CP, Nomura M, Egashira K, Levine B, Sadoshima J. Drp1-Dependent Mitochondrial Autophagy Plays a Protective Role Against Pressure Overload-Induced Mitochondrial Dysfunction and Heart Failure. *Circulation*. 2016 Mar 29;133(13):1249-63. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502. Epub 2016 Feb 25. (査読有)
- [学会発表] (計 24 件)
- (1) Sasaki Y, Ikeda Y, Akasaki Y, Uchikado Y, Higuchi K, Ohishi M. Estrogen/Sirt1/LKB1/AMPK axis plays a crucial role in mediating Rab9-dependent mitophagy and retarding arterial senescence. 第 83 回 日本循環器学会学術集会 (2019 年 3 月, 神奈川)
- (2) Uchikado Y, Ikeda Y, Sasaki Y, Akasaki Y, Higuchi K, Ohishi M. Metabolic stress and angiotensin II causes vascular senescence via AT1R signal-mediate mitochondrial fission. 第 83 回 日本循環器学会学術集会 (2019 年 3 月, 神奈川)
- (3) Akasaki Y, Ikeda Y, Uchikado Y, Sasaki Y, Higuchi K, Ohishi M. Metabolic stress causes sarcopenia via angiotensin II type I receptor signal-induced mitochondrial fission. 第 83 回 日本循環器学会学術集会 (2019 年 3 月, 神奈川)
- (4) Akasaki Y, Ikeda Y, Uchikado Y, Sasaki Y, Higuchi K, Ohishi M. Metabolic stress evokes muscular mitochondrial dysfunction and sarcopenia via angiotensin II type I receptor signal induced mitochondrial fission. American Heart Association Scientific Sessions 2018 (2018 年 11 月, Chicago, USA)
- (5) Uchikado Y, Ikeda Y, Sasaki Y, Akasaki Y, Ohishi M. Metabolic stress evokes mitochondrial dysfunction and vascular senescence via mitochondrial fission. The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research (2018 年 9 月, Nara, Japan)
- (6) Sasaki Y, Ikeda Y, Akasaki Y, Uchikado Y, Ohishi M. Estrogen Protects Artery from Senescence via Sirt1/AMPK/Rab9-mediated Mitophagy. AHA Basic Cardiovascular Science 2018 (2018 年 7 月, San Antonio, USA)
- (7) 佐々木雄一, 池田義之, 赤崎雄一, 内門義博, 樋口公嗣, 宮田昌明, 大石 充. エストロゲンの Rab9 依存性マイトファジーを介した血管老化抑制効果. 第 50 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2018 年 7 月, 大阪)
- (8) 佐々木雄一, 池田義之, 大石 充. エストロゲンは Rab9 依存性オルタナティブオートファジーによるマイトファジーを介して血管老化を抑制する. 第 60 回 日本老年医学会学術集会 (2018 年 6 月, 京都)
- (9) 池田義之, 大石 充. 心血管老化に対するミトコンドリアダイナミクスとオートファジーを軸とした治療法の検討. 第 60 回 日本老年医学会学術集会 (2018 年 6 月, 京都)
- (10) 佐々木雄一, 池田義之, 大石 充. エストロゲンは Sirt1/LKB1/AMPK 軸活性化による Rab9 依存性マイトファジーを介して血管老化を抑制する. 第 18 回 日本抗加齢医学会総会 (2018 年 5 月, 大阪)
- (11) 佐々木雄一, 池田義之, 赤崎雄一, 内門義博, 樋口公嗣, 大石 充. エストロゲンは Rab9 依存性マイトファジーを介して細胞老化を抑制する. 第 22 回 日本心血管内分泌代謝学会学術集会 (2018 年 4 月, 宮崎)
- (12) Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, Akasaki Y, Higuchi K, Miyata M, Ohishi M. Estrogen maintains mitochondrial function and retards vascular senescence via Rab9-dependent mitophagy. 第 82 回 日本循環器学会学術集会 (2018 年 3 月, 大阪)
- (13) Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, Akasaki Y, Higuchi K, Miyata M, Ohishi M. Inhibition of angiotensin II type 1 receptor retards development of cellular senescence and atherosclerosis via augmentation of Rab9-dependent mitophagy. 第 82 回 日本循環器学会学術集会 (2018 年 3 月, 大阪)
- (14) Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, Miyauchi T, Akasaki Y, Higuchi K, Miyata M, Ohishi M. Estrogen-induced alternative autophagy plays a crucial role in maintaining mitochondrial function and retarding vascular senescence. 第 1 回 日本循環器学会基礎フォーラム (2018 年 1 月, 東京)
- (15) 佐々木雄一, 池田義之, 宮内孝浩, 岩林正明, 赤崎雄一, 樋口公嗣, 宮田昌明, 大石 充. 選択的エストロゲン作動薬 (SERM) は、閉経モデルマウスにおける血管老化および動脈硬化の進展を抑制する. 第 21 回 日本心血管内分泌代謝学会学術集会 (2017 年 12 月, 大阪)
- (16) Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, Akasaki Y, Higuchi K, Miyata M, Ohishi M. Estrogen-induced Alternative Autophagy Plays a Crucial Role in Protecting Artery From Senescence and Atherosclerosis. American Heart Association 2017 (2017 年 11 月, Anaheim, USA)

- (17) Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, Miyauchi T, Akasaki Y, Higuchi K, Miyata M, Ohishi M. Selective Estrogen Receptor Modulator Retards Arterial Senescence and Atherosclerosis Via Upregulation of eNOS/Sirt-1 Pathway in Post-menopause Model Mouse. The 8th Congress of the International Society for Gender Medicine. (2017年11月、宮城)
- (18) 佐々木雄一、池田義之、岩林正明、赤崎雄一、樋口公嗣、宮田昌明、大石 充. ミトコンドリアダイナミクス不均衡は、アンギオテンシ II による血管障害に対する有効な治療ターゲットとなる 第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 (2017年11月、福岡)
- (19) 池田義之、岩林正明、佐々木雄一、赤崎雄一、宮田昌明、大石 充. ミトコンドリアダイナミクスの血管老化および動脈硬化に及ぼす影響. 第 49 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2017年7月、広島)
- (20) Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, Miyauchi T, Akasaki Y, Higuchi K, Miyata M, Ohishi M. Estrogen retards arterial senescence and atherosclerosis through sirt1-mediated alternative autophagy. 第 81 回 日本循環器学会総会・学術集会 (2017年3月、石川)
- (21) Ikeda Y, Iwabayashi M, Sasaki Y, Akasaki Y, Higuchi K, Miyata M, Ohishi M. Mitochondrial dynamics plays a role in the effect of renin-angiotensin signal on arterial senescence and atherosclerosis. 第 81 回 日本循環器学会総会・学術集会 (2017年3月、石川)
- (22) 佐々木雄一、池田義之、岩林正明、宮内孝浩、赤崎雄一、樋口公嗣、宮田昌明、大石 充. 閉経に伴う血管老化進展にオートファジーは重要な役割を果たしている -閉経モデルマウスを用いた検討-. 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2016年7月、東京)
- (23) 佐々木雄一、池田義之、岩林正明、宮内孝浩、赤崎雄一、樋口公嗣、宮田昌明、大石 充. オートファジーは閉経に伴う血管老化進展に重要な役割を果たしている -閉経モデルマウスを用いた検討-. 第 58 回 日本老年医学会学術集会 (2016年6月、金沢)
- (24) Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, Miyauchi T, Akasaki Y, Miyata M, Ohishi M. Autophagy plays a role in the etiology of post menopause-induced arterial senescence and atherosclerosis. 第 80 回 日本循環器学会学術集会 (2016年3月、宮城)

〔図書〕 (計 2 件)

- (1) 池田義之・大石 充. 日本臨床「心不全」ミトコンドリアダイナミクス.
- (2) 佐々木雄一、池田義之、大石 充. 循環器内科 第 80 巻第 5 号 特集 / 超高齢社会における循環器診療「心臓老化とマイトファジー」
- 〔産業財産権〕 ○出願：無，○取得：無
- 〔その他〕 ホームページ等：無

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：赤崎 雄一

ローマ字氏名：AKASAKI YUICHI

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域附属病院

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：00631920

研究分担者氏名：大石 充

ローマ字氏名：OHISHI MITSURU

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50335345

(2) 研究協力者

なし