

令和元年5月29日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09476

研究課題名(和文) 動脈硬化と動脈瘤の形成と進展におけるSMP30の役割

研究課題名(英文) The role of SMP30 in formation and progression of abdominal aortic aneurysm and atherosclerosis.

研究代表者

鈴木 聡 (Suzuki, Satoshi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60536944

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)：腹部大動脈瘤を作成するため野生型(WT)マウス、SMP30欠損(SMP30-KO)マウス、ApoE欠損(ApoE-KO)マウス、SMP30・ApoE両欠損(DKO)マウスに対しAngiotensin IIを投与した。投与後の腹部大動脈最大径はApoE-KOマウスで拡大しDKOマウスではさらに増大する傾向となったが、SMP30-KOでは拡大が認められなかった。大動脈組織における炎症マーカーの発現はApoE-KOマウスにおいて亢進しておりDKOマウスにおいては更に増加していたが、SMP30-KOマウスでは認められなかった。SMP30は炎症反応の抑制を介して大動脈瘤形成を抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SMP30が炎症反応の抑制作用を介して大動脈瘤の形成を抑制することが明らかになった。ただし、AngIIの非存在下ではこれらの作用は見られなかったことからSMP30のこのような作用の詳細は未だ明らかではない。本研究よりSMP30が大動脈瘤の形成および治療の標的になり得ることが示唆された。今後益々、高齢化と食生活の欧米化により動脈硬化性疾患の増加が予想されるわが国においては、大動脈瘤の治療あるいは進行を遅らせる薬の開発は切実である。そういった意味においても大動脈瘤の形成を抑制する可能性があるSMP30の効果が示された本研究の意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We administered angiotensin II (AngII) to wild type (WT) mice, SMP30 knockout (SMP30-KO) mice, apolipoprotein E knockout (ApoE-KO) mice, and SMP30/ApoE double knockout (DKO) mice to evaluate the SMP30 in the development of abdominal aortic aneurysm. Maximum diameter of abdominal aorta after AngII administration was largest in DKO mice followed by ApoE-KO mice, however abdominal aorta was not dilated in SMP30-KO mice. Inflammatory markers in aortic tissue increased in DKO mice followed by ApoE-KO mice, however these markers was not expressed in SMP30-KO mice. From these results, we demonstrated that SMP30 would suppress the formation of abdominal aortic aneurysm via suppression of inflammatory marker expression.

研究分野：生物系医歯薬学内科系臨床医学循環器内科学

キーワード：SMP30 腹部大動脈瘤 inflammation Apolipoprotein E

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Senescence Marker Protein-30 (SMP30)は加齢に伴い減少する分子量約 34-kDa の蛋白質として同定され (*Biochim Biophys Acta*, 1116:122-8,1992)、心臓を含むほとんどすべての臓器で発現が認められる。SMP30 ノックアウト(SMP30-KO)マウスは、外見上は野生型 (WT) マウスと変わりはないが、癌などの疾患は認められなかったものの臓器全体が萎縮しヒトの老衰に似た状態を示し約 6 ヶ月で半数のマウスが死亡した (*Biochem Biophys Res Commun* 315:575-80,2004)。老化には活性酸素種や炎症性マーカーの活性化などが強く関連しているが、SMP30-KO マウスを用いた研究では脳や肺の酸化ストレスの増加が病態の悪化を招くことが報告されたことから (*Mech Ageing Dev*, 127:451-457,2006, *Am J Respir Crit Care Med*, 174:530-537,2006)、SMP30 は抗酸化作用、抗炎症作用を介して、抗老化蛋白として機能していることが示唆された。

我々は以前、上記の SMP30-KO マウスを用いて心臓組織における SMP30 の役割について研究を行った。アンジオテンシン (Ang-) 投与による心肥大および心不全モデルマウスにおいては、WT マウスに比べて SMP30-KO マウスでは心肥大の進行や心筋間質線維化の亢進、左室拡張機能の低下、左室内圧の上昇をきたしており、それには SMP30-KO マウスにおける酸化ストレスやアポトーシスの増加、また老化タンパクの発現増加が関与していることを報告した (*Cardiovasc Res* 99:461-70, 2013.)。また我々は更に  $\beta$ -MHC プロモーターを用いて SMP30 心臓特異的過剰発現 (SMP30-TG) マウスを作成して同様に Ang- を投与したところ、SMP30-KO マウスでの反応とは逆に WT マウスに比べて心肥大や心筋間質の亢進の抑制や、酸化ストレス、老化タンパクの発現の抑制が認められた (*Biochem Biophys Res Commun* 439:142-7,2013.)。さらにドキシソルピシン投与による心不全発症モデルマウスの研究では、SMP30-KO マウスにおいては WT マウスに比べて心筋間質の線維化の亢進と心収縮力の低下、酸化ストレスとアポトーシスの亢進が認められたが、反対に SMP30-TG マウスではそれらが抑制されており、その細胞内シグナル伝達には c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化が関与していることを報告した (*PLoS One* 8:e79093,2013.)

動脈硬化は生命に重大な危機を及ぼす脳血管疾患を引き起こすが、加齢とともに進展する動脈硬化は一般的に、動脈壁の石灰化やコラーゲン沈着、また弾性線維の主成分であるエラスチンの変性・脱落といった生理的な変化が主体であり、そこには血管平滑筋などのアポトーシスも強く関連するといわれている (*Circ Res* 111:245-59,2012.)。さらに近年の日本社会においては食生活の欧米化が進んできたことで高脂血症や糖尿病の有病率が増加しており、喫煙などの環境要因も加わることでコレステロールの動脈壁への沈着による動脈硬化、いわゆる粥状動脈硬化による心筋梗塞などの冠動脈疾患が増加している側面もある。粥状動脈硬化は加齢による動脈硬化とは進展形式が異なるものの、実臨床の場ではこれらは混在して動脈硬化性疾患を進展させていることがほとんどである。また粥状動脈硬化の形成には酸化ストレスや炎症反応が大きく関与する。酸化ストレスは low-density lipoprotein (LDL) コレステロールの酸化をきたすことで酸化 LDL コレステロールを生みだし酸化 LDL コレステロール受容体の動脈壁での発現を増加させ、血管内皮における炎症反応を引き起こして粥状動脈硬化の形成を進展させる。

また高齢化の進行とともに増加している大動脈疾患である大動脈瘤は、破裂により突然死に至る可能性が高い重篤な疾患である。動脈瘤の形成は、LDL コレステロール値とは相関しないことなどから動脈硬化の形成過程とは異なり、血管壁中膜の構造破壊などによる大動脈壁の脆弱化によるものであり、その形成には加齢や酸化ストレス、炎症反応の活性化が関与するといわれる。つまりは加齢や喫煙などの刺激が血管内皮細胞や血管平滑筋細胞を活性化させることで炎症反応を引き起こしサイトカインなどの産生を誘導することで、細胞外マトリックスの分解や血管平滑筋細胞のアポトーシスを引き起こし、血管壁の脆弱化や拡張をきたすと考えられている。

このように酸化ストレスや炎症反応は動脈硬化や動脈瘤の形成と進展に重要な役割を演じていることが広く認識されているが、動脈瘤の形成と SMP30 との直接的な関連については検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

SMP30 は、ノックアウトマウスの解析から抗酸化作用、抗アポトーシス作用を有することが判明し、抗老化蛋白として機能していることが示唆されている。現代社会においては高齢化と食生活の欧米化に伴い動脈硬化性疾患が増加しており、動脈硬化の形成には酸化 LDL の形成をはじめとした酸化ストレスや炎症反応、アポトーシスは重要な役割を演じているが、SMP30 との関連については検討されていない。本研究では SMP30 が動脈硬化の形成と進展においてどのような役割を有するかを明らかにする。遺伝子操作マウスを用いて、SMP30 の抗酸化作用、抗炎症作用に着目し、新しい動脈硬化への治療の開発について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

SMP30-KO マウスと ApoE 欠損 (ApoE-KO) マウスを交配し、SMP30・ApoE 両欠損マウス (DKO) の子孫が得られた。本研究は、主に ApoE-KO マウスと DKO マウスに形成された大動脈瘤を比較することを目的としているが、コントロールとして WT マウスおよび SMP30-KO マウスも用いた。腹部大動脈瘤を作成するため、8-10 週齢の WT、SMP30-KO、ApoE-KO、DKO マウスそれぞれに対し、生食 (sham 群) または Angiotensin (Ang 群) を注入したマイクロ浸透圧ポンプを両肩甲骨中央部皮下に植え込み、AngII は 1000 ng/kg/min の投与速度で 28 日間皮下投与した。Ang 投与 14 日後にマウス用非観血的血圧測定装置 BP-98A-L (ソフトロン社製) を用いて血圧を測定し、Ang が有効に投与されていることを確認した。申請者らはこれまで予備実験にて Ang 投与によりマウス体血圧が上昇すること、および既報と同程度の割合で腹部大動脈瘤が形成されることを確認している。Ang 投与 28 日後に大動脈を摘出し、腹部大動脈最大径を測定し SMP30 の腹部大動脈瘤形成に対する効果を検討した。またそれぞれのマウス群ごとに大動脈瘤破裂による死亡率を調べ、大動脈壁の組織を Hematoxylin Eosin 染色、Masson Trichrome 染色、Elastica van Gieson 染色を行って組織学的に解析した。さらに腹部大動脈瘤形成における SMP30 の関与として、大動脈組織における炎症マーカーの発現を定量的 PCR 法を用いて評価した。

### 4. 研究成果

Ang 投与 28 日後に大動脈を摘出し腹部大動脈最大径を測定したところ、WT マウスと比較して ApoE-KO マウスでは最大径が拡大し、DKO マウスではさらに最大径が増大する傾向となった。しかし SMP30-KO マウスでは腹部大動脈に影響は認めず、死亡率についても最大径と同様の結果であった。腹部大動脈瘤の病理組織は中膜弾性線維層が菲薄化する傾向にあり、瘤化した部位に線維芽細胞の集簇および炎症細胞の浸潤を認めた。ApoE-KO マウスの大動脈組織において mRNA の発現を定量 RT-PCR にて測定したところ、Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、Interleukin-6 (IL-6)、Interleukin-1 (IL-1)、Tumor necrosis factor (TNF) の発現が WT マウスに比べ亢進しており、DKO マウスにおいては ApoE-KO マウスに比してより増加していた。一方、SMP30-KO マウスではこれらの発現亢進は認められなかった。また、Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現は Ang 投与にて増加したが、WT マウスに比して ApoE-KO マウス、SMP30-KO マウス、DKO マウスいずれにおいても有意な変化は認められなかった。以上の結果から、SMP30 は AngII の pro-inflammatory 作用に拮抗することにより大動脈瘤形成を抑制していることが示唆された。一方、SMP30-KO による表現型は明らかでなく、今後より詳細な細胞内メカニズムの解明が必要であると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

〔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:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕 なし

## 6．研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤彰彦

ローマ字氏名：Sato Akihiko

研究協力者氏名：渡邊俊介

ローマ字氏名：Watanabe Syunsuke

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。