

令和元年9月9日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09774

研究課題名(和文) 動脈硬化における小胞体ストレス及びミトコンドリアに対するWFS1の役割の解明

研究課題名(英文) Crucial role of WFS1 in preventing arteriosclerosis acceleration via inhibits biological stress response and mitochondrial dynamics deterioration

研究代表者

高 俊弘 (gao, junhong)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：70455781

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)：動脈硬化の分子メカニズムに関する研究の中で、小胞体関連タンパクWFS1が血管における複数の生態ストレスに対する影響を遺伝子改変マウスに対して複数の負荷を行うことやex vivo、in vitroの実験系を組み合わせることで、それぞれの反応の因果関係を確認し、血管における生体内ストレス応答と細胞内ミトコンドリア機能の相互作用について解析を行った。

WFS1は小胞体ストレス、炎症ストレスと酸化ストレスを軽減する役割があり、動脈硬化の発症発展の段階で防御的に影響を果たしている可能性を 시사した。酸化ストレス反応や炎症反応増加につながる機序として、ミトコンドリア機能低下の関与が想定される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食生活の欧米化や運動不足に伴い、糖尿病・高脂血症・高血圧などの代謝異常に伴って動脈硬化性疾患の増加が社会的問題となっている。動脈硬化の発症・進展には、代謝異常や喫煙などの動脈硬化の危険因子の下流で生体内ストレス応答が重要である。

動脈硬化の分子メカニズムに関する研究の中で、血管における小胞体、炎症、酸化ストレス反応及びミトコンドリア機能の関連におけるWFS1の役割についてまだ報告されていない。本研究では遺伝子改変マウスに対して複数の負荷を行うことやex vivo、in vitroの実験系を組み合わせることで血管における生体内ストレス応答と細胞内ミトコンドリア機能の相互作用について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of WFS1 in vascular cell biology. The WFS1 deficient mice were used to examine the effects of WFS1 on arteriosclerosis. WFS1 deficiency increased cuff injury-induced neointimal formation and hypercholesterolemia-induced atherosclerosis. Bone marrow transplantation experiments revealed that donor WFS1 deficiency plays a major role in enhanced neointimal formation after cuff injury and WFS1 expressed in both hematopoietic cells and vascular cells, and contributes to protect the atherosclerotic plaque formation induced by hypercholesterolemia. Transmission electron microscopy scanning showed WFS1 deficiency increased mitochondrial morphology change.

研究分野：代謝

キーワード：小胞体ストレス 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化や運動不足に伴い、糖尿病・高脂血症・高血圧などの代謝異常を重積する頻度が高まり、それに伴って心血管障害に代表される動脈硬化性疾患の増加が社会的問題となっている。近年では動脈硬化の発症・進展には、代謝異常や喫煙などの動脈硬化の危険因子の下流で、炎症ストレス、酸化ストレスや小胞体ストレスなど生体内ストレス応答が重要であると考えられてきている。

動脈硬化の発症・進展における小胞体ストレスの役割やその詳細な分子メカニズムはまだ不明な点が多い。そこで研究代表者は、動脈硬化形成における小胞体ストレスの役割を検討した。小胞体ストレスにて発現を増加させ、細胞をアポトーシスに導くと考えられていた C/EBP homologous protein (CHOP) の欠損マウスでは、高コレステロール血症による粥状動脈硬化進展や炎症にともなう血管リモデリングが抑えられており、血管壁では小胞体ストレス応答自体の軽減がみとめられ、さらに炎症反応や酸化ストレス反応の抑制が認められた。このことから、CHOP は、小胞体ストレスに応じて発現誘導され、酸化ストレス反応や炎症反応を惹起することにより、動脈硬化の促進に寄与していることが示された。これは、小胞体ストレスから動脈硬化発症につながる分子機序の一部を解明したものであるとともに、また、小胞体ストレス応答における CHOP の新たな役割をも解明したものである。

以上の結果から、血管壁細胞における小胞体ストレスを制御することにより、飽食の現代においても動脈硬化の発症・進展を抑制する手法の開発につなげるべく小胞体ストレスに対して防御的に働く小胞体ストレス応答蛋白 Wolfram syndrome (WFS)1 に着目して研究をすすめることとした。

2. 研究目的

(1) 動脈における WFS1 の免疫染色の結果、WFS1 はマクロファージや血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に発現しており、特に、動脈硬化プラーク病変に強く発現誘導されていることが明らかとなった (unpublished)。このことは、動脈硬化病変局所での小胞体ストレスが惹起され、何らかの形で WFS1 もその応答に関与していると考えられる。そこで、WFS1 欠損マウスを用いて、動脈硬化に関する検討を行ったところ、preliminary ながら、WFS1 欠損はカフ傷害による反応性内膜肥厚や高コレステロール食負荷による粥状動脈硬化を増悪させる傾向にあった。このことは、WFS1 は小胞体ストレスに応答し、血管病変形成に一定の歯止めをかけていることを示唆するものである。そこで本研究では、どの細胞に発現する WFS1 蛋白が、どのような機序で動脈硬化などの血管病変進展を抑制するのか、特に血管内皮細胞における役割を中心に解明し、動脈硬化の予防法・治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究方法

WFS1 の全身での欠損マウスを用い、カフ障害および apoE 欠損による粥状動脈硬化における影響を検討する。すでに予備実験の段階で、WFS1 欠損は、これらの血管病変を増悪させることが見出されているため、次の - の検討することにより、WFS1 の動脈硬化抑制作用の分子機序を

解明する。

管病変における遺伝子発現やストレスシグナル伝達の比較解析 電子顕微鏡や遺伝子発現解析を用いた血管細胞のミトコンドリア解析 骨髄移植による血球細胞および血管細胞の WFS1 の役割比較 マクロファージ・血管内皮・血管平滑筋の培養細胞や単離細胞を用いそれぞれの細胞における WFS1 の役割の解析 血管内皮細胞特異的誘導型 WFS1 欠損マウスを作製し、血管内皮細胞における WFS1 の役割の解明、これら *in vivo* *ex vivo* *in vitro* の解析を組み合わせることにより、WFS1 の血管保護作用の分子機序を解明する。

4. 研究成果

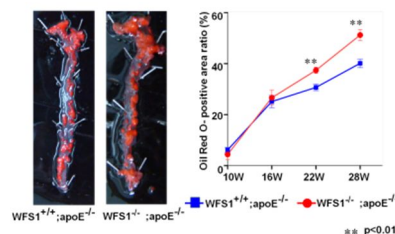
(1) 全身での WFS1 欠損マウスの動脈における表現型の解析

a. カフ障害における WFS1 欠損の影響の検討

8 週齢の WFS1 欠損マウスを用いて、片側の大腿動脈にカフ傷害を施し、3 週間後に同部位の動脈を採取、内膜の肥厚度の検討や免疫組織学的検討を行う。カフ留置部位の血管から mRNA を抽出し、炎症反応や小胞体ストレス、酸化ストレス応答に関連した分子の発現を検討した。WFS1 欠損によってカフ傷害による反応性内膜肥厚が増大する という結果を得ており、WFS1 によるカフ障害抑制効果が明らかになった。

b. WFS1・アポ E ダブル欠損マウスにおける粥状動脈硬化の検討

高コレステロール食を負荷した WFS1・アポ E 二重欠損マウスを用いて大動脈全体の内面を脂肪染色することで、動脈硬化病変を定量化し、また大動脈の免疫組織学的検討を行なう。大動脈全体から mRNA を抽出し、炎症反応や小胞体ストレス、酸化ストレス応答に関連した分子の発現を検討した。



WFS1 欠損によって、アポ E 二重欠損マウスによる粥状動脈硬化はさらに増大すること、さらに、粥状動脈硬化の血管では酸化ストレス関連する遺伝子の発現が亢進しているという結果を得つつあり、WFS1 による血管内炎症・酸化ストレス抑制による動脈硬化進展抑制効果を示唆した。

(2) 血管内皮細胞のミトコンドリア形態の観察

WFS1 欠損マウスの血管内皮細胞のミトコンドリアの形を電子顕微鏡を用いて検討するとともに、ミトコンドリア機能についても検討した電子顕微鏡での検討にて、WFS1 欠損マウスでは、ミトコンドリアの膨大化やクリステの減少など、形態変化が認められており、酸化ストレス反応や炎症反応増加につながる機序として、ミトコンドリア機能低下の関与が考えられた。

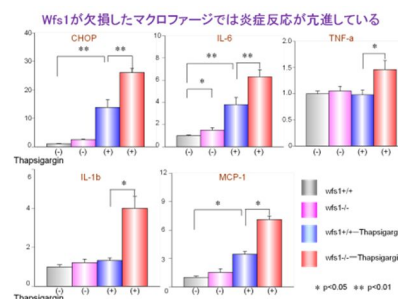
(3) 単離細胞・培養細胞を用いたストレス応答の検討

in vivo では動脈硬化形成に強く関与しているマクロファージや血管内皮細胞、平滑筋細胞の相互作用があり、詳細な分子メカニズムを解析するのが難しいため、それぞれの単離細胞や培養細胞を用いて様々な検討を行った。

a. 各培養細胞に小胞体ストレス(tunicamycin, thapsigargin)や酸化ストレス(酸化 LDL など)、炎症(LPS, TNF など)を誘導し、細胞蛋白や mRNA レベルで生体内ストレス応答について詳細

に解析した。

b. WFS1 欠損マウスから単離されたマクロファージで、
と同様の検討を行い、小胞体ストレス応答から発信される生体内ストレス応答調節について解析した。結果、WFS1 がマクロファージや血管細胞に炎症性ストレスや酸化ストレス、小胞体ストレスに対して保護的役割を果たしているのが明らかにした。



< 引用文献 >

1. Gao J, Ishigaki Y, Yamada T, Kondo K, Yamaguchi S, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Ishihara H, Oyadomari S, Mori M, Oka Y, Katagiri H. Involvement of endoplasmic stress protein c/ebp homologous protein in arteriosclerosis acceleration with augmented biological stress responses. *Circulation*. 2011;124:830-839
2. Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sato Y, Takikawa K, Nishimichi N, Matsuda H, Sawamura T, Oka Y. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*. 2008;118:75-83
3. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2005;352:1685-1695
4. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340:115-126
5. Kohno T, Urao N, Ashino T, Sudhakar V, McKinney RD, Hamakubo T, Iwanari H, Ushio-Fukai M, Fukui T. Novel role of copper transport protein antioxidant-1 in neointimal formation after vascular injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:805-813
6. Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circulation research*. 2007;100:607-621
7. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: Critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol*. 2002;14:73-81
8. Raines EW. Pdgf and cardiovascular disease. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15:237-254

5. 主な発表論文

上の結果は論文にまとめ雑誌投稿準備中である。

(雑誌論文) (計2件)

- 1) Toru Suzuki, Junhong Gao, Hideki Katagiri. "ER Stress Protein CHOP Mediates Insulin Resistance by Modulating Adipose Tissue Macrophage Polarity". Cell Reports. 査読あり、 2017 Feb 21;18(8):2045-2057
- 2) Midori Honma, Shojiro Sawada, Junhong Gao, Hideki Katagiri. "Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers". International Journal of Obesity(Lond). 査読あり、 2018 Sep;42(9):1544-1555

〔学会発表〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者：宇野 健司

ローマ字氏名： KENJI UNO

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：準教授

研究者番号：50596632

(2) 研究分担者：澤田 正二郎

ローマ字氏名： SHOJIRO SAWADA

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号：60509420