

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17585

研究課題名(和文) DNA傷害が腹部大動脈瘤の形成および進展に与える影響の検討

研究課題名(英文) The role of DNA damage in development of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

高橋 徹也 (Takahashi, Tetsuya)

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40825775

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)：腹部大動脈瘤は無症状で進行し、大動脈瘤破裂時の死亡率は60%以上と予後不良である。大動脈瘤の発生には炎症や粥状硬化による大動脈壁の脆弱化が大きく関与する。大動脈瘤の内腔側には強い動脈硬化性変化がある。近年、血管平滑筋細胞のDNA傷害が、細胞老化やアポトーシス、炎症を促進し動脈硬化の進展に影響を及ぼしていることが報告された。しかし、DNA傷害と大動脈瘤形成の関係は未だ不明である。本研究では、腹部大動脈瘤モデルマウスを作成し、DNA傷害およびDNA傷害応答と大動脈瘤の形成および進展との関連について検討を行う。DNA傷害応答の制御因子ATMの阻害剤が腹部大動脈瘤の形成に与える影響も検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹部大動脈瘤は、動脈硬化と危険因子が共通するが、大動脈瘤形成および瘤破裂を抑制する治療法は確立していない。動脈硬化進展に血管平滑筋細胞のDNA傷害およびDNA傷害応答が関与することが報告された(Circ Res 2015;116:816-826)。しかし腹部大動脈瘤の進展に細胞のDNA傷害およびDNA傷害応答の関係は不明である。本研究は、腹部大動脈瘤の形成と進展におけるDNA傷害およびDNA傷害応答の役割を解明することで新たな治療標的になるかを検討する。また、抗癌剤として発展してきた抗DNA傷害応答薬(ATM阻害剤)をドラッグリポジショニングとして腹部大動脈瘤の治療に応用できるか検討を行う。

研究成果の概要(英文)：Abdominal aortic aneurysm is an asymptotically progressive disease with a mortality rate of over 60% at the time of aortic aneurysm rupture. Aortic wall weakening due to inflammation and atherosclerosis is associated with the development of aortic aneurysms. Recently, it has been reported that DNA damage of vascular smooth muscle cells causes cellular senescence, apoptosis, and inflammation and promotes the development of atherosclerosis. However, the relationship between DNA damage and aortic aneurysm formation remains unclear. In this study, we generate mouse models of abdominal aortic aneurysms and examine the relationship between DNA damage and the DNA damage response and the formation and progression of aortic aneurysms, as well as the effect of inhibitors of ATM, a regulator of the DNA damage response, on the formation of abdominal aortic aneurysms.

研究分野：循環器内科

キーワード：腹部大動脈瘤 DNA傷害 DNA傷害応答

1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤は、近年人口の高齢化に伴い増加しており、先進諸国では全死亡原因の 1-2% を占める (Nature 2011; 473: 308-316)。大動脈瘤が破裂した場合の死亡率は 60% 以上であり、予後不良な疾患である。腎動脈下の腹部大動脈瘤が、全大動脈瘤の 80% 以上を占める。近年の治療法の発展により、腹部大動脈瘤に対しては開腹手術による人工血管置換術に加え腹部大動脈瘤に対しては血管内治療 (ステントグラフト内挿術, endovascular aneurysm repair; EVAR) が施行されている。しかし、腹部大動脈瘤の進行を抑える有効な治療法は未だ確率していない (Nat Rev Cardiol 2011; 8: 92-102)。長年、腹部大動脈瘤は、動脈硬化の晩期進行病変として考えられてきたが、その発生機序は複雑であることがわかってきた。大動脈瘤の内腔側には強い動脈硬化性病変が存在していることがわかっているが (Circulation 2006; 113: e463-654)、大動脈瘤の形成と進展には動脈硬化に加え、大動脈壁の炎症や粥状硬化による脆弱化が関与していることが報告されている (Hum Pathol 1991; 22: 45-51、Circulation 2005; 111: 816-828)。近年、血管平滑筋細胞の DNA 傷害が、細胞の老化やアポトーシス、炎症を惹起することで、血管プラークの形成促進や不安定化を起し、動脈硬化の形成および進展に関与していることが報告された (Circulation 2015; 132: 1909、Circ Res 2015; 116: 816-826)。また、ヒトの大動脈のプラークに存在する血管平滑筋細胞には、正常な血管平滑筋細胞と比べ、細胞の DNA 傷害が有意に増加していることがわかっている (Circulation 2015; 132: 1909、Circ Res 2015; 116: 816-826)。しかし、DNA 傷害と腹部大動脈瘤の形成および進展に関して十分には検討されていない。

動脈硬化と DNA 傷害の関係は過去にいくつか報告されているが、腹部大動脈瘤についてはほとんど報告がない。DNA 傷害は動脈硬化と同様に、腹部大動脈瘤の形成と進展にも関していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腹部大動脈瘤モデルを作成し、DNA 傷害と大動脈瘤の形成および進展に関するメカニズムを明らかにすることである。近年、動脈硬化の進行に血管平滑筋細胞の DNA 傷害が関与していることが報告されている (Circulation 2015; 132: 1909、Circ Res 2015; 116: 816-826)。腹部大動脈瘤の病変には強い動脈硬化性病変が存在していることがわかっており、腹部大動脈瘤の形成と進展にも DNA 傷害が関与している可能性が示唆される。しかし、これまで大動脈瘤の形成および進展に DNA 傷害の役割を検討した報告はほとんどない。ヒトの大動脈プラークおよびマウスの動脈硬化モデルを用いた報告では血管平滑筋細胞で酸化ストレスに伴う DNA 鎖切断が生じていることが明らかにされた (Circ Res 2006; 99: 156-164、Circulation 2013; 128: 702-712)。通常は DNA 鎖切断などの DNA 傷害が細胞に起きると速やかに修復されるが、過剰な DNA 傷害が発生した場合、DNA 傷害応答が生じる。この DNA 傷害応答の中核を担う酵素として ATM が知られている (Nat Rev Mol Cell Biol 2013; 14: 197-210)。過剰な DNA 傷害の結果 ATM がリン酸化され活性化すると、細胞のアポトーシスを誘導したり、細胞周期を停止させ細胞老化を引き起こすことが報告されている (Nat Rev Cancer 2012; 12: 709-720)。また、ATM は nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を活性化させ、細胞の炎症を惹起させることが報告されている (Science 2015; 349: aaa5612)。腹部大動脈瘤の形成と進展に酸化ストレスと炎症が関与しており (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2015; 35: 1507-14)、腹部大動脈瘤の病態に酸化ストレスに伴う DNA 傷害とそれに引き続く DNA 傷害応答と ATM の活性化が関与している可能性が考えられる。一方、ATM 特異的阻害剤が近年抗癌剤として臨床試験中であり (J Neurooncol 2012; 110: 349-57、Int J Radiat Biol 2015; 91: 368-78)、一部の癌に対して臨床試験も進行中である。また、ATM 阻害剤は抗癌剤としてだけでなく、酸化ストレスに対して細胞に保護的に働くことや、抗炎症作用や抗老化作用をもつことも報告されている (Science 2015; 349: aaa5612、Int J Biochem Cell Biol 2017; 87: 38-53)。医薬品開発費の高騰と新薬創出の低下の問題があり、既存の治療薬から、別の疾患に有効な薬効を見出すドラッグリポジショニングという概念も注目されている (Drug Discov Today 2015; 20: 1027-34)。ATM 阻害剤が腹部大動脈瘤の形成と進展を抑制したという報告は過去になく、本研究で検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト腹部大動脈瘤の患者の組織における DNA 傷害と DNA 傷害応答の発現の評価

当院心臓血管外科に腹部大動脈瘤のため入院し、開腹手術による人工血管置換術を受ける患者の腹部大動脈瘤の患部の組織とその周囲の正常大動脈瘤の組織を手術中に一部採取する。その腹部大動脈瘤と正常大動脈の組織において免疫染色法を用いて DNA 障害のマーカーである H2AX と DNA 障害応答のマーカーであるリン酸化 ATM を染めて発現を評価する。また、大動脈瘤の重症度(瘤の径や切迫破裂の有無)と H2AX、リン酸化 ATM の発現率との間に相関関係がないかを評価する。

(2) 腹部大動脈瘤モデルマウスにおける DNA 傷害と DNA 傷害応答の発現の評価

アポ E 欠損マウスにアンジオテンシン II (Ang II) (1000 ng/kg/min) を浸透圧ミニポンプで、4 週

間皮下投与し腹部大動脈瘤モデルを作成する。コントロール群と比較し、大動脈瘤の Neck および Sac 部位で、H2AX とリン酸化 ATM が増加しているかを組織の免疫染色法およびウエスタンブロット法にて評価する。

(3) マウスにおける ATM 阻害剤の腹部大動脈瘤形成と進展に対する効果の検討

アポ E 欠損マウスに Ang II 投与を行い、腹部大動脈瘤モデルを作成する。ATM 阻害剤を腹腔内投与し、コントロール薬剤投与群と比較し、大動脈瘤形成および破裂に差があるか検討を行う。また、両群間において Caspase 3 の大動脈瘤における発現を組織の免疫染色法およびウエスタンブロット法にて評価し、ATM 阻害剤がアポトーシスに与える影響について検討する。炎症に関しては、ATM の下流シグナルターゲットである NF- κ B の発現をウエスタンブロット法にて両群間で評価する。さらに、interleukin (IL)-1、IL-2、IL6 などの炎症性サイトカインの血中レベルを市販の Bio-Plex システムを用いて両群間で評価する。また、病変部の MMP 活性に関しては、zymography および in situ zymography を用い、MMP-2、MMP-9、MMP-12 等を両群間で評価する。近年、腹部大動脈瘤の形成と進展に血管平滑筋細胞の老化が関係していると報告されており (Circ Res 2016; 119: 1076-1088)、細胞老化マーカーである senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) を組織の免疫染色法にて両群間で評価し、ATM 阻害剤が血管平滑筋細胞の老化に与える影響について検討する。

(4) ラット培養血管平滑筋細胞で Ang II 刺激に対する DNA 傷害および DNA 傷害応答の検討

細胞実験としてラット培養血管平滑筋細胞を用い、Ang II 刺激を行い、H2AX とリン酸化 ATM の発現について免疫染色法およびウエスタンブロット法にて評価する。また、ラット培養血管平滑筋細胞に ATM 阻害剤を投与し、その上で Ang II 刺激を行い、Caspase 3 の発現などを免疫染色法およびウエスタンブロット法にて評価し、細胞のアポトーシスに与える影響について検討する。さらに ATM 阻害剤の投与が Ang II 刺激による NF- κ B の活性化、IL-1、IL-2、IL6 などの炎症性サイトカインの発現、MMP 活性に与える影響についてウエスタンブロット法や Bio-Plex システム、zymography を用いて評価する。細胞老化については SA- β -gal の免疫染色法を行い、ATM 阻害剤がラット培養血管平滑筋細胞の老化に与える影響について検討する。

(5) アポ E 欠損/血管平滑筋特異的 ATM 欠損マウス、アポ E 欠損/血管平滑筋特異的 ATM 過剰発現マウスを用いた腹部大動脈瘤形成と進展に対する検討

血管平滑筋特異的 SM22 プロモーターによる Cre-loxP システムを用いてアポ E 欠損/血管平滑筋特異的 ATM 欠損マウス、アポ E 欠損/血管平滑筋特異的 ATM 過剰発現マウスをそれぞれ作成する。それぞれのマウスに Ang II 投与を行い、腹部大動脈瘤モデルを作成し、ATM が腹部大動脈の形成および破裂に与える影響について検討する。また、それぞれのマウスにおいて、アポトーシスや炎症、老化について与える影響について検討する。

4. 研究成果

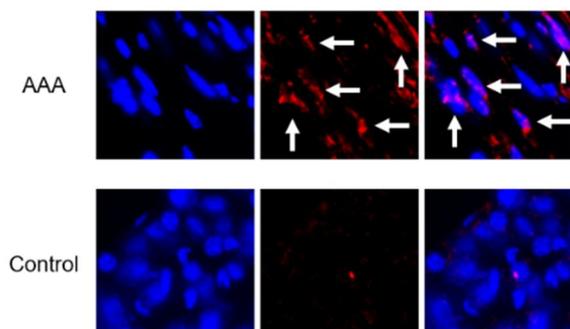
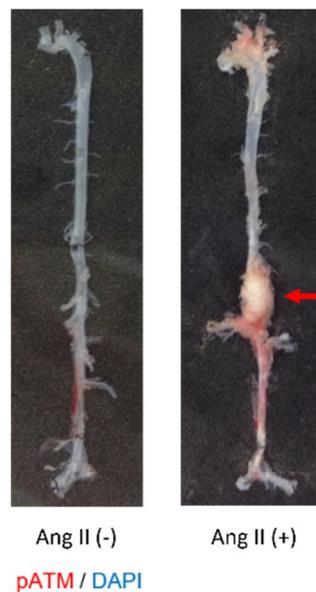
アポ E 欠損マウスに Ang II 投与を行い腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) を形成した。コントロール群とくらべて大動脈瘤の組織において活性化 ATM (pATM) の発現が増強していることを免疫染色にて確認した。

アポ E 欠損マウスに高脂肪食と Ang II 投与を行い、大動脈瘤モデルを作成するが、大動脈瘤が全例生じるわけではなく、3 割程度しか瘤形成が生じなかった。より高率に大動脈瘤が生じるモデルを検討し、エラストラーゼ誘発、塩化カルシウム誘発を試みた。

これらのモデルでは、高率に大動脈瘤が形成される半面、薬剤投与の効果を見るのは難しかった。

ATM 阻害剤の効果を検討したが、コントロール群と比較し、有意な大動脈瘤形成抑制は認められなかった。

モデル動物のさらなる検討を行っている。



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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------