

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590882

研究課題名(和文) Apoptタンパク質の動脈硬化治療へ向けた応用研究

研究課題名(英文) Applied Reserch of Apop protein for the treatment of Atherosclerosis

研究代表者

安田 修 (YASUDA OSAMU)

熊本大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：00372615

研究成果の概要(和文)：Apoptogenic Protein (Apop)は動脈硬化モデル動物の動脈硬化巣で発見された遺伝子である。モデル動物と同様に Apop 遺伝子の発現はヒト頸動脈の動脈硬化でも確認された。また動脈硬化発症に関与する増殖型の平滑筋細胞において発現し正常血管に存在する収縮型の平滑筋細胞では発現しないことから動脈硬化発症への関与が示唆された。またさらに本研究では Apop 遺伝子の機能を in vivo で確認するため Apop 遺伝子欠損マウスを作製した。

研究成果の概要(英文)：Apoptogenic Protein (Apop) was originally identified in the atherosclerotic plaques of model animals. Apop gene expression was also identified in human atherosclerosis in carotid arteries. Proliferative smooth muscle cells, which contribute to the formation of atherosclerosis, expressed Apop, while contractile smooth muscle cells in normal arteries did not. These findings indicate the *implication of Apop in the development of atherosclerosis*. Moreover, *Apop deficient mouse* was generated in this study to reveal the function of Apop gene in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化巣では血管平滑筋細胞にアポトーシスが認められること、また心筋梗塞を発症しやすい不安定プラークでは血管平滑筋細胞がアポトーシスによって減少していることが知られている。しかしアポトーシス誘導機構は明らかにされておらず、まして動脈硬化特異的に発現しアポトーシスを誘導する機能を持つ遺伝子を明らかにした研究

は世界的にも例がない。我々は高コレステロール血症によりヒトの動脈硬化に近い病変を発症するモデルマウス、ApoE 欠損マウスから動脈硬化血管において特異的に発現している遺伝子として Apop をクローニングした(J Biol Chem 2006;281:23899)。Apop タンパク質には機能性ドメインが存在しないため機能は不明であったが、培養細胞に Apop 遺伝子を導入して発現させた結果からミト

コンドリアに局在するタンパク質であり、しかもアポトーシス（細胞の能動的な死：自殺）誘導タンパク質であることが明らかになった。動脈硬化形成においてはミトコンドリア機能が重要な役割を果たすことが報告されている (Diabetes Res Clin Pract 2007;77 S1:S46)。本研究はこのような背景のもと、心筋梗塞発症と Apop 発現、またミトコンドリア機能と Apop 発現の解析を行うものである。

(2) 本研究と同様なストラテジーを用いて、我々がクローニングに成功した遺伝子のひとつは VIII 型コラーゲンであり、その動脈硬化発症における重要性は国際的にも認識され多くの成果が報告されている (J Vasc Res 2000;37:158, Ann N Y Acad Sci 2001;947:312, Atherosclerosis 2003;166:1, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:56)。

2. 研究の目的

(1) 本研究は申請者らが独自にクローニングした新規アポトーシス誘導タンパク質 (Apop) の分子生物学的な作用機構を解明し、ヒト動脈硬化形成ならびに動脈硬化プラークの不安定化における関与を明らかにして臨床に応用することを目的とする。

(2) Apop はミトコンドリア内膜に存在する酵素である Cyclophilin D 依存性にアポトーシスを誘導する。Cyclophilin D 依存性のアポトーシスは通常、動脈硬化発症に深く関わる酸化ストレスや心筋梗塞後の虚血再還流によって誘導される。従って Apop 発現は酸化ストレス関連の因子に制御され、心筋梗塞後の虚血再還流による心筋細胞死に関与していることが予想される。また動脈硬化巣からクローニングされた遺伝子であるため、動脈硬化には直接関係していることも予想される。以上より本研究の成果によって心筋梗塞の引き金となる動脈硬化の破綻機構および心筋梗塞治療後の心不全発症機構が分子レベルで解明されるとともに、本研究の成果は本邦における死因の常に上位を占める心疾患、脳血管障害予防法の構築に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) Apop 遺伝子発現誘導と転写調節因子の解明

①Apop 遺伝子発現誘導因子の解明

Apop 遺伝子の発現を誘導する因子は Apop アッセイ系不在のために明らかにされていなかった。しかし Apop 抗体作製によりウェスタンブロット法が確立されたことにより次第に明らかにされつつある。現在までに Apop

発現はサイトカインの一部によって誘導されることが判明した。動脈硬化巣には多くの炎症性サイトカインを始め、酸化ストレスによって LDL から生成した酸化 LDL が存在する。これらの刺激を受けた細胞での Apop 発現を解析し動脈硬化プラークでの Apop 発現誘導機構を解明する。

②Apop 転写制御機構の解明

Apop 遺伝子の 5' 上流領域には約 20 bp を隔てて別の遺伝子が存在するため、転写調節領域が存在する可能性は少ないと考えられる。そこで転写調節領域をイントロン内に検索する。イントロン内の領域をルシフェラーゼを用いた発現解析ベクターに挿入し発現促進あるいは抑制する領域を決定する。

(2) Apop 遺伝子における新しい疾患感受性遺伝子多型の同定

ヒト Apop 遺伝子において、すでに数種類の SNP (single nucleotide polymorphism) が同定されている。これらの SNP のなかで Apop の活性に影響を与える可能性が高いタンパク質翻訳領域の SNP を中心に動脈硬化性疾患に対して疾患感受性を有する遺伝子多型を同定する。現在、インフォームドコンセントを得た心筋梗塞の既往のある患者 (150 例) と対照群 (350 例) の DNA が抽出できており、解析可能な状況である。SNP の解析には ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (アプライドバイオシステム社) による TaqMan プローブ法を用いる。

(3) ヒト動脈硬化プラークにおける Apop 発現解析

ヒト頸動脈の動脈硬化は脳梗塞の原因となる危険な病態である。破綻することによって血栓形成により血管内腔の閉塞を起こしやすいプラークは不安定プラークと呼ばれる。不安定プラークの形成にはプラーク内の平滑筋細胞のアポトーシスによる減少が寄与している。インフォームドコンセントを得た患者から得られた頸動脈プラークの組織を安定プラークと不安定プラークに分類し、Apop 遺伝子、炎症性サイトカインの発現をリアルタイム PCR、免疫染色等の方法によって解析する。また組織を Apop 抗体と平滑筋細胞抗体、Apop 抗体と炎症細胞抗体との二重染色し、発現細胞の同定を行う。

(4) ノックアウトマウスの作製

組織特異的に Apop 発現を欠損したノックアウトマウス (Conditional Knockout Mouse) を作製する。心筋梗塞の治療法として現在では PTA (経皮的血管形成術) がしばしば行われる。PTA 後にしばしば問題になるのは血流再開後に心筋細胞がアポトーシスによって減少し、心不全をおこすことである。申請者

らは Apop 発現の抑制は低酸素/再酸素化によるアポトーシスを抑制することを培養細胞を用いて明らかにした (J Biol Chem 2006;281:23899)。そこで Apop ノックアウトマウスの心臓を用いて虚血再還流をおこなった心筋の壊死量を測定する。また Apop ノックアウトマウスにおいて中大脳動脈の閉塞による虚血実験を行い、脳梗塞形成における関与を明らかにする。

4. 研究成果

Apoptogenic Protein (Apop) 遺伝子は ApoE 欠損マウスの動脈硬化プラークに発現する遺伝子として研究代表者らによってクローニングされた。クローニングされた当初は機能不明の遺伝子であったが発現すると細胞にアポトーシス (能動的な死) を誘導することが明らかになった。

(1) Apop 遺伝子発現調節機構の解明

血管平滑筋細胞をラミニンコートディッシュ上で培養し、収縮型の表現型を有する培養平滑筋細胞を得た。一方通常条件で培養した平滑筋細胞は増殖型の表現型を有していた。これらの表現型を有する細胞の Apop 発現を解析した結果、Apop は増殖型の平滑筋細胞で収縮型の細胞よりも強く発現していた。またバルーン擦過モデルのラット頸動脈において Apop は増殖型平滑筋細胞の多い肥厚内膜に発現が見られ、収縮型平滑筋細胞の多い中膜においては見られなかった。これらの結果は血管平滑筋細胞における Apop 遺伝子発現は平滑筋細胞の表現型によって変化し Apop が収縮型平滑筋細胞のマーカーとして有用であることを示している。

(2) Apop 発現抑制による変化

マイクロアレイを用いた解析の結果、siRNA を用いて Apop 遺伝子発現を抑制した培養血管内皮細胞ではミトコンドリアの細胞死に対する感受性が変化していることが示唆された。この結果は Apop 発現を変化させることで血管内皮細胞の生存率を上昇させ動脈硬化発症を抑制できることを示している。

(3) Apop 遺伝子欠損マウスの作製

Apop 遺伝子の機能を明らかにするためには培養細胞を用いた in vitro 研究だけでなく実験動物を用いた in vivo 研究が重要である。そこで Apop Flox マウスから Cre-LoxP 系を用いて Apop 遺伝子を欠損したノックアウト (KO) マウスを作製した。ApopKO マウスの発育は野生型と同等であったが ApopKO マウスから生まれる産仔は野生型よりも少数であり、Apop 遺伝子が胎児の発育に重要であることが示唆される結果であった。

(4) ヒト動脈硬化巣における発現

ヒト Apop 遺伝子発現ベクターを大腸菌に導入することによりヒト Apop タンパク質を大腸菌で生産させた。精製したヒト Apop タンパク質をウサギに感作して抗 Apop ポリクローナル抗体を得た。アフィニティ精製した抗 Apop ポリクローナル抗体を用いてヒト頸動脈プラークを染色した結果、ヒト動脈硬化における Apop 発現が確認された。特にマクロファージあるいは泡沫化した細胞に強い発現が確認され、Apop が動脈硬化発症に関与していることを示す結果であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Maekawa Y, Ohishi M, Ikushima M, Yamamoto K, Yasuda O (5 番目/10) Rakugi H. Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway. *Geriatr Gerontol Int*. 査読有 2011 in press.
- ② Nakamura T, Fukuda M, Kataoka K, Nako H, Tokutomi Y, Dong YF, Yamamoto E, Yasuda O (8 番目/10). Eplerenone potentiates protective effects of amlodipine against cardiovascular injury in salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens Res*. 査読有 2011 in press.
- ③ Yamamoto E, Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Dong YF, Fukuda M, Nako H, Yasuda O (8 番目/10). Nifedipine prevents vascular endothelial dysfunction in a mouse model of obesity and type 2 diabetes, by improving eNOS dysfunction and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 403:2010; 258-263.
- ④ Fukuda M, Nakamura T, Kataoka K, Nako H, Tokutomi Y, Dong YF, Yasuda O (7 番目/9). Ezetimibe ameliorates cardiovascular complications and hepatic steatosis in obese and type 2 diabetic db/db mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有 335:2010; 70-75.
- ⑤ Kaimoto T, Yasuda O (2 番目/9), Fukuo K, Rakugi H. Nifedipine inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation via downregulation of Akt signaling. *Hypertension*. 査読有 56:2010; 247-252.
- ⑥ Shindo N, Fujisawa T, Sugimoto K, Nojima K, Oze-Fukai A, Yoshikawa Y,

- Wang X, Yasuda O (8 番目/10), Rakugi H. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. *J Hepatol*. 査読有 52:2010; 903-912.
- ⑦ Baba Y, Yasuda O (2 番目/12), Fukuo K, Rakugi H. Timp-3 deficiency impairs cognitive function in mice. *Lab Invest*. 査読有 89:2009; 1340-1347.
- ⑧ Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O (3 番目/10), Rakugi H. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine*. 査読有 35:2009; 341-346.
- ⑨ Hanasaki H, Takemura Y, Fukuo K, Ohishi M, Onishi M, Yasuda O (6 番目/11), Rakugi H. Fas promoter region gene polymorphism is associated with an increased risk for myocardial infarction. *Hypertens Res*. 査読有 32:2009; 261-264.
- ⑩ Sun X, Yasuda O (2 番目/10), Fukuo K, Rakugi H. Akt activation prevents Apop-1-induced death of cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 77:2008;31097-31101.
- ⑪ Sugimoto K, Akasaka H, Katsuya T, Node K, Fujisawa T, Shimaoka I, Yasuda O (7 番目/11), Rakugi H. A polymorphism regulates CYP4A11 transcriptional activity and is associated with hypertension in a Japanese population. *Hypertension*. 査読有 52:2008; 1142-1148.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 安田 修, 楽木宏実, 動脈硬化血管の遺伝子発現解析、第 52 回日本老年医学会学術集会・総会 2010. 6. 26 神戸国際会議場、神戸
- ② Yasuda O, Rakugi H. Functional Analysis of Apop Gene in the Viability of Cardiomyocytes. 第 14 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 2010. 4. 1 奈良県新公会堂、奈良
- ③ Yasuda O, Fukuo K, Rakugi H. Impaired memory function in Timp-3 deficient mice. Japan Society of Gene Therapy The 15th Annual Meeting 2009. 2009. 7. 10 Osaka University Convention Center, Osaka
- ④ 安田 修, 楽木宏実, 細胞外基質代謝による認知機能低下機構の解析、第 51 回日本老年医学会学術集会・総会 2009. 6. 19 パシフィコ横浜、横浜

- ⑤ 安田 修, 楽木宏実, Timp-3 欠損マウスの認知機能解析、第 50 回日本老年医学会学術集会・総会 2008. 6. 21 幕張メッセ国際会議場、千葉
- ⑥ Yasuda O, Fukuo K, Rakugi H. Apop gene is involved in hypoxia/reoxygenation induced cell death. 22nd International Society of Hypertension. 2008. 6. 19 Internationales Congress Centrum Berlin, Berlin, Germany
- ⑦ Yasuda O, Fukuo K, Rakugi H. inhibition of apop gene prevents death of cells in culture following hypoxia/reoxygenation. The 72nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2008. 3. 29 Fukuoka International Congress Center, Fukuoka

[図書] (計 2 件)

- ① 安田 修, 楽木宏実, 医学書院、生体の科学 61、2010、518-519
- ② 安田 修, 楽木宏実, ライフ・サイエンス、Geriatric Medicine 47、2009、845-848

[その他]

ホームページ等

http://www.kuh.kumamoto-u.ac.jp/education/department/junnai_kifu.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 修 (YASUDA OSAMU)

熊本大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：00372615

(2) 研究分担者

楽木 宏実 (RAKUGI HIROMI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20252679

福尾 恵介 (FUKUO KEISUKE)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：40156758