

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09127

研究課題名（和文）N型カルシウムチャンネルが腹部大動脈瘤発症・進展に与える分子機構の解明

研究課題名（英文）Effect of N typeCCB on development of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

内田 治仁（Uchida, Haruhito）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：00550857

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）：本研究では、腹部大動脈瘤の発症・進展におけるN型カルシウムチャンネル（N型CC）の意義について着目し、その重要性と分子機構を解明することを目的とした。そこで、遺伝子変異マウスであるN型CCノックアウトマウス（1Bノックアウトマウス）を用いた実験およびN型CC拮抗薬を用いた実験をそれぞれ行ったところいずれのモデルでも腹部大動脈瘤の有意な発症・進展抑制が認められた。細胞実験でN型CC選択的阻害が強い酸化ストレス・炎症抑制効果を示した。以上のことからN型CCは腹部大動脈瘤の発症・進展に深く関与することが基礎的な検討で示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹部大動脈瘤はひとたび破裂すると致死的な非常に重篤な疾患である。現在治療は外科的なものに限定されている。今回の我々の基礎的な検討によりN型カルシウムチャンネルが腹部大動脈瘤の発症・進展にかかわることが明らかとなった。この結果から、N型カルシウムチャンネルを有効に阻害する新規治療の開発につながる成果と考えられ、これらの新規治療の開発がもたらす人命救助の観点からその社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the significance of N-type calcium channels (N-type CC) in the development and progression of abdominal aortic aneurysms, and aimed to elucidate their importance and molecular mechanisms. Therefore, we conducted experiments using N-type CC knockout mice (1B knockout mice), which are gene mutant mice, and experiments using N-type CC antagonists, respectively, and found that both models significantly suppressed the onset and progression of abdominal aortic aneurysms. In vitro experiments, selective inhibition of N-type CC showed a strong inhibitory effect on oxidative stress and inflammation. In conclusion, our study showed that N-type CC is deeply involved in the onset and progression of abdominal aortic aneurysms.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：腹部大動脈瘤 N型カルシウムチャンネル

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤(および解離)は、わが国において死因の第11位にランクされる重要な疾患であるにもかかわらず、その詳細な発症・進展のメカニズムにはいまだに不明な点が多く、さらにその治療法も外科的な治療に限局されている。現在のところ疫学的大動脈瘤の危険因子として、古典的な喫煙、性別(男)、加齢、家族歴のほかに、高血圧、脂質異常症、慢性腎臓病、虚血性心疾患の既往といった動脈硬化危険因子の関与が示唆されている。病変組織においては動脈硬化性プラークのほか、壁在血栓の形成、炎症細胞の浸潤、弾性線維の断裂が認められており、高血圧などによる酸化ストレスや炎症反応の関与が強く示唆されているものの詳細はいまだに不明である。

これまでに、ヒトの組織で血管中膜での酸化ストレスや炎症の増悪が大動脈瘤破裂と関連することが報告されている。同様に動物モデルにおける腹部大動脈瘤発症・進展の制御機構として、酸化ストレスの関与や炎症の増悪の関与も明らかになってきている。一方、N型カルシウムチャンネル特異的阻害薬やN型カルシウムチャンネル欠損マウスにおいて、AngIIによる血管内皮機能障害や酸化ストレスが抑制されることが報告されている。このように、腹部大動脈瘤発症・進展における血管壁での酸化ストレス応答や炎症反応の制御機構において、特にN型カルシウムチャンネルが多面的に関与している可能性が予測される。

2. 研究の目的

そこで本研究では、腹部大動脈瘤の発症・進展におけるN型カルシウムチャンネルの意義について着目し、腹部大動脈瘤に対する新規治療法開発への足がかりとして、その重要性和分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

N型カルシウムチャンネルノックアウトマウスにおける腹部大動脈瘤発症・進展に対する影響の検討

まずN型カルシウムチャンネルノックアウトマウスとApoEノックアウトマウスを交配し、N型カルシウムチャンネル/ApoEダブルノックアウトマウスを作成する。この作成した雄のN型カルシウムチャンネル/ApoEダブルノックアウトおよびApoEノックアウトマウスへ浸透圧ポンプを用いてAngII(1,000ng/kg/min)を4週間持続投与し、腹部大動脈瘤発症・進展への影響を検討する。腹部大動脈瘤の形態学的な検討、および免疫染色法による組織学的な検討に加えて、酸化ストレスや炎症性サイトカインのmRNA定量やタンパク定量、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の活性の定量、などを行う。

N型カルシウムチャンネル阻害薬の腹部大動脈瘤発症・進展に対する影響の検討

次に雄のApoEノックアウトマウスへ浸透圧ポンプを用いてAngII(1,000ng/kg/min)を4週間持続投与する群と、AngII投与と同時に浸透圧ポンプを用いてN型カルシウムチャンネル拮抗薬(Cilnidipine)を投与する群を作成し、腹部大動脈瘤発症・進展への影響を検討する。投与量は、我々のpreliminaryな検討から、3mg/日(血圧に影響を与えない量)および10mg/日(血圧に影響を与える量)の2群を作成することとする。腹部大動脈瘤の形態学的な検討、および免疫染色法による組織学的な検討に加えて、酸化ストレスや炎症性サイトカインのmRNA定量やタンパク定量、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の活性の定量などを行い、検討する。

N型カルシウムチャンネル阻害による酸化ストレス制御機構および細胞外基質の調節機構の検討

血管内皮細胞(HAEC)、血管平滑筋細胞(AOSMC)それぞれの培養細胞を用いて、ATPおよびAngII刺激下でMMP-1, 2, 9, TIMP-1, uPA, PAI-1の発現、MCP-1やIL-1などの炎症性サイトカインのmRNA定量やタンパク定量などを行う。またこれらの細胞をAngII、H2O2、あるいはL-NAME存在下にて刺激し、4-HNE、8-OHdGの染色を行い、酸化ストレスに関する影響を検討する。N型カルシウムチャンネル特異的阻害薬(-conotoxin)存在下でも同様に検討を行う。

4. 研究成果

生理食塩水を投与したマウスでは、体重、血圧、T.Cho値、大動脈径などに関して群間で差は認められなかった。AngIIを投与したマウスについては、体重、血圧、T.Cho値について群間で差は認められなかった。大動脈径についてはDKOマウスのほうで有意に小さく、腹部大動脈瘤の発症率においても、DKOのほうで腹部大動脈瘤の有意な発症抑制が認められた。

apoE KOマウスへ浸透圧ポンプを用いてAngII(1,000ng/kg/min)を持続投与する群と、AngII投与と同時に浸透圧ポンプを用いてN型CC拮抗薬を投与する群を作成し、腹部大動脈瘤発症・進展への影響を検討した。N型CC拮抗薬投与群では、大動脈瘤径が有意に小さく、腹部大動脈

瘤の有意な発症抑制が認められた。

血管平滑筋細胞と血管内皮細胞をそれぞれ単離・培養し、過酸化水素とともに N 型 CC 選択的阻害薬および L 型カルシウムチャンネル選択的阻害薬を細胞と共培養したところ N 型 CC 選択的阻害薬が強い酸化ストレス・炎症抑制効果を示した。

以上のことからこの腹部大動脈瘤モデルにおいて N 型 CC はその発症・進展に深く関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otaka N, Uchida HA, Okuyama M, Hada Y, Onishi Y, Kakio Y, Takeuchi H, Umebayashi R, Tanabe K, Subramanian V, Daugherty A, Sato Y, Wada J.	4. 巻 34
2. 論文標題 Vasohibin-2 Aggravates Development of Ascending Aortic Aneurysms but not Abdominal Aortic Aneurysms nor Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 467 ~ 475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ajh/hpaa181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Muniappan L, Okuyama M, Javidan A, Thiagarajan D, Jiang W, Moorlegghen JJ, Yang L, Balakrishnan A, Howatt DA, Uchida HA, Saido TC, Subramanian V.	4. 巻 41
2. 論文標題 Inducible Depletion of Calpain-2 Mitigates Abdominal Aortic Aneurysm in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 1694 ~ 1709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.120.315546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Uchida HA, Takatsuka T, Hada Y, Umebayashi R, Takeuchi H, Shikata K, Subramanian V, Daugherty A, Wada J	4. 巻 12
2. 論文標題 Edaravone Attenuated Angiotensin II-Induced Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysms in Apolipoprotein E-Deficient Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom12081117.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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
---------	---------