

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09143

研究課題名（和文）ヒト大動脈壁試料の解析からはじめる酸化ストレスを介した大動脈瘤の発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Aortic Aneurysm Pathogenesis via Oxidative Stress Starting from Analysis of Human Aortic Wall Samples

研究代表者

田邊 佐和香（Tanabe, Sawaka）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教

研究者番号：00401993

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：酸化ストレス特異的核種⁶⁴Cu-ATSMが集積した大動脈標本を酸化ストレス関連因子で免疫染色を行ったところ4HNE陽性粥状硬化プラークを取り囲むようにNRXが帯状に発現低下し、NRXの発現低下部位に一致して -cateninが亢進しMMP-2、MMP-9が同部位に一致して亢進していた。ヒト血管平滑筋細胞において、H₂O₂が用量依存的にNRXの発現を低下させ、 -cateninの発現を上昇させることが示された。さらにNRXをノックダウンすると、Dvl、 -catenin、MMP-2、MMP-7、MMP-9が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈瘤の発症には、酸化ストレスの関与とマトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）の関与が知られている。しかし、酸化ストレスとMMPの分子的な因果関係は不明な点が多い。本研究では、術前に酸化ストレス特異的核種⁶⁴Cu-ATSMの集積を認めた術中大動脈標本および培養大動脈細胞を用いて、MMP発現における酸化ストレスおよびNRXの役割を検討した。結果から、大動脈粥状硬化プラーク由来の酸化ストレスがNRXをダウンレギュレートし、Dvl/ -cateninシグナルの活性化を介して、MMPsを増強する経路が、大動脈瘤発症の新たな病態である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Immunostaining of aortic specimens with ⁶⁴Cu-ATSM, an oxidative stress-specific nuclide, with oxidative stress-related factors revealed that NRX was down-regulated in a band surrounding 4HNE-positive atherosclerotic plaques, -catenin was up-regulated in the same region as NRX down-regulation, and MMP-2 and MMP-9 were up-regulated in the same region. MMP-2 and MMP-9 were upregulated at the same sites. In human vascular smooth muscle cells, H₂O₂ dose-dependently down-regulated NRX expression and up-regulated -catenin expression. Furthermore, knockdown of NRX increased Dvl, -catenin, MMP-2, MMP-7, and MMP-9.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈瘤 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤は60歳以上の4~9%に認め、破裂すると90%が死亡する。従来の病理学的手法では、粥状動脈硬化性病変に動脈瘤が好発することから、「動脈硬化仮説」が主流をなしていた。ところが近年、ノックアウトマウスなどの分子病理学的手法により、基質の分解や石灰化との関連が報告され「蛋白質分解酵素仮説」が主流となっており、従来の「動脈硬化仮説」とのあいだに知識的ギャップが生じている。本研究課題はこのギャップを「問い」として取り組んだ。近年、酸化ストレスに応答してシクロフィリンAが炎症性サイトカインの増幅を介して、マクロファージの浸潤とMMP-2を活性化により動脈瘤が発症することが示されたことから、本研究では酸化ストレスを起点として解明に挑んだ。

2. 研究の目的

本研究課題は酸化ストレスの視点から従来の病理学的「動脈硬化仮説」と現在の分子生物学的「蛋白質分解酵素仮説」のあいだに生じた知識的ギャップの補完を目的とした。

3. 研究の方法

術前に酸化ストレス特異的核種⁶⁴Cu-ATSMの集積を認めた術中大動脈標本および培養大動脈細胞を用いて、MMP発現における酸化ストレスおよびNRXの役割を検討した。研究準備として独自に作成した⁶⁴Cu-ATSM PET MRIを用いて術前検査を行い、集積部位を正確にマーキングして術中切離し、摘出標本を分割して集積部位を同定した。これらの部位には粥状硬化プラークが豊富で、酸化ストレスマーカー4HNEが陽性であることを確認した。

さらに⁶⁴Cu-ATSM集積部位をさまざまな酸化ストレス関連因子で免疫染色を行った

4. 研究成果

大動脈瘤症例の3例に術前にCu-ATSM PETを施行し、術中に大動脈壁を採取した。

Cu-ATSMは、ミトコンドリアの機能不全部位に集積する酸化ストレス特異的PET核種である。MRI/PETの所見に基づいて、Cu-ATSM集積部位を正確にマーキングし大動脈瘤の標準術式である人工血管置換術を施行し、術式に影響のない範囲で大動脈壁を摘出した。

剖検例から採取した正常な大動脈壁と、⁶⁴Cu-ATSM PET陰性領域と陽性領域から採取した大動脈壁標本を用いて、以下の研究を行なった。

アテローム性プラーク領域のパーセンテージを比較したところCu-ATSM陽性標本で有意なアテローム性プラーク領域が観察された。

酸化ストレスマーカー4HNE(4-hydroxy-2-nonenal)とマクロファージマーカーCD68に対する免疫染色を行ったところ、アテローム性プラーク領域で有意な4HNEとCD68の染色性の亢進を認めた。

次に、4HNE陽性のアテローム性プラークにおいて、酸化ストレス関連因子の発現を調べた。

酸化ストレス依存的 β -カテニン抑制因子であるNRXは、アテローム性プラークの周辺で特異的にダウンレギュレートされていた。

β -カテニンは、NRXの発現が減少したプラーク周辺で、発現が増加していた。

さらに β -カテニンは動脈瘤誘発因子MMPの発現を媒介するため、MMP-9の発現を調べた。

MMP-9は、 β -カテニンの発現が増加したプラーク周辺で増加した。

免疫蛍光二重染色にて同じ切片におけるNRXおよび β -カテニン発現の局在を調べた。

NRX を緑色に、 β -カテニンを赤色に染色した。

NRX の染色が減弱した領域で、 β -カテニンの増強が観察された。

ピアソンの共局在解析では NRX と β -カテニンの共局在シグナルは観察されなかった。

今度は MMP-9 を緑色に、 β -カテニンを赤色に染色したところ、MMP-9 の染色領域と同じ領域で β -カテニン染色の増強が観察された。

ピアソンの共局在解析では MMP-9 と β -カテニンの共局在シグナルが観察された。

術中摘出標本での免疫染色の結果を培養ヒト大動脈平滑筋細胞で確認した。

培養ヒト大動脈平滑筋細胞を過酸化水素 (H₂O₂) で処理して、アテローム性プラークにおける酸化ストレスを模倣し、NRX と β -カテニンの発現をウエスタンブロットングで評価した。デンシトメトリー分析により、H₂O₂ 処理によって NRX の発現が時間依存的に減少することが明らかになった。

β -カテニン発現は H₂O₂ 処理時間に応じて増加し、術中摘出標本での免疫染色に合致した変化が観察された。

NRX ダウンレギュレーションと動脈瘤促進因子との関係をさらに調査するために、NRX ノックダウンの効果を評価した。

NRX ノックダウンは、 β -カテニン の発現を増強した。

NRX ノックダウンにより、MMP の発現増加を認め、術中摘出標本での免疫染色に合致した変化が観察された。

以上の結果より、NRX の酸化またはノックダウンは、 β -カテニン シグナルの活性化につながり、 β -カテニンシグナルは MMP の発現上昇を介して大動脈瘤形成に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田邊佐和香
2. 発表標題 酸化ストレス特異的PET陽性ヒト大動脈瘤壁におけるレドックス依存的大動脈瘤発生機序
3. 学会等名 第76回日本胸部外科学会
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	樋口 翔平 (Higuchi Syouhei) (00867848)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特別研究員 (13401)	
研究分担者	辻川 哲也 (Tsujikawa Tetsuya) (30380033)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	
研究分担者	今村 好章 (Imamura Yoshiaki) (40223341)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・准教授 (13401)	
研究分担者	岡沢 秀彦 (Okazawa Hidehiko) (50360813)	福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	糟野 健司 (Kasuno Kenji) (60455243)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授 (13401)	

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