

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月16日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590952

研究課題名（和文）動脈硬化性プラーク破綻の新たな分子機構—カテプシンの役割及び遺伝子治療への応用

研究課題名（英文）The Molecular Mechanism Underlying Atherosclerotic Plaque Rupture: Impact on CysteinyI Cathepsin and Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis

研究代表者

成 憲武 (XIAN WU CHENG)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：30378228

研究成果の概要（和文）：

近年、カテプシン (cathepsin) の粥状動脈硬化巣における高発現やその活性増加が報告されたものの、プラーク・ラプチャー発症における役割は不明である。そこで、カテプシン S と内在性阻害物質シスタチン C (cystatinC) 遺伝子欠損マウスや合成阻害剤を用いて、プラーク・ラプチャー発症におけるカテプシン S の重要な役割を果たすことが明らかになった。スタチンは、カテプシン発現や炎症性細胞浸潤の抑制を介して、臨床のプラーク安定化に寄与することも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Although recent studies have suggested that cysteinyl cathepsins (Cats) participate in cell apoptosis, the Cat-related precise mechanism of in atherosclerotic plaque disruption remains poorly understood. Here, we focused to investigate the role of Cat in plaque rupture using a mouse carotid artery plaque rupture model. We have observed that CatS involves vascular smooth muscle cell apoptosis and contributes to plaque rupture. CatS is an important determination of atherosclerotic plaque composition and disruption, rendering CatS an attractive target for pharmaceutical prevention in atherosclerotic plaque vulnerability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：プラーク破綻、カテプシン、スタチン

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス蛋白分解酵素はプラーク・ラプチャー発症において重要な役割を果たす。

近年、システイン・プロテアーゼ (cysteine proteases) であるカテプシン (cathepsin) の粥状動脈硬化巣における高発現やその活性増加が

報告されたものの、プラーク・ラプチャー発症における役割は不明である。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、我々は、血管細胞由来のカテプシン S ならびに K の動脈硬化性プラーク・ラプチャーへの関与を提唱し、そのプロセスにおけるカテプシンの役割及び発症の分子機構を解明することを本研究の目的にした。本研究により、心筋梗塞や急性冠症候群発症原因である動脈硬化性プラーク破綻におけるカテプシンならびにシスタチン C の発現変化及びそれらの分子機能が明らかになると確信する。更に臨床の心筋梗塞や急性冠症候群治療に対する新たな遺伝子治療方法の提供が可能になる。

3. 研究の方法

- (1) ApoE^{-/-} と Cat S^{-/-} / ApoE^{-/-}、Cat K^{-/-} / ApoE^{-/-} や Cyst C^{-/-} / ApoE^{-/-} の 4 種マウス頸動脈にプラーク破綻モデルを作成後、生化学及び組織学的手法による 4 群マウスの表現型の解析を行う。
- (2) 合成選択的カテプシン阻害剤 (E64d や LVVS) やスタチン投与実験を行う。
- (3) 培養平滑筋細胞やマクロファージにおけるカテプシンの発現及びその制御機序に関する検討。

4. 研究成果

- (1) ApoE^{-/-} マウスと比較して、CatS 遺伝子欠損でのプラーク破綻率は著明に低下した。プラーク内アポトーシスした細胞 (主に平滑筋細胞) と浸潤した炎症性細胞 (主にマクロファージ) 数の低下や厚いファイブロス・キャップが観察された。
- (2) ApoE^{-/-} マウスと比較して、プラーク内出血率の増加傾向や、Cyst C 遺伝子欠損によるプラーク破綻率は著明に増加した。さらに、プラーク内アポトーシスした細胞 (主に平滑筋細胞) と浸潤した炎症性細胞 (主にマクロファージ) 数の増加や薄いファイブロス・キャップが観察された。
- (3) ピタバスタチンの低用量 (1mg/kg/d) と高用量 (10mg/kg/d) の経口投与による酸化ストレス、炎症性細胞浸潤や細胞死の抑制とコラーゲン蓄積によるプラーク破綻が抑制される一方、eNOS 合成阻害剤経口投与によりこれらの効果が抹殺された。
- (4) スタチン投与による NADPH Oxidase 活性、HIF- α 、IAP-2 や p-Akt の蛋白発現の増加が明らかになった。
- (5) E64d 内投与 (1 mg/kg/d: 腹膜) による酸化ストレス、炎症性細胞浸潤や細

胞死の抑制とコラーゲン蓄積によるプラーク破綻の抑制が観察された。

- (6) H₂O₂ 暴露における大動脈由来平滑筋細胞のアポトーシスがカテプシン S 遺伝子欠損や E64d 処理により著明に低下し、シスタチン C 遺伝子欠損により増加した。
- (7) ベースラインでの抗アポトーシス Bcl-2/Bcl-xL の蛋白発現の差はないものの、H₂O₂ 暴露下では、カテプシン S 遺伝子欠損マウス大動脈由来平滑筋での著明な増加が明らかになった。一方、シスタチン C 遺伝子欠損マウス大動脈由来平滑筋での著明に低下し、その遺伝子を戻すことで、著明に回復した。
- (8) 長期高脂肪食投与による慢性期動脈硬化病変で、CatS 遺伝子欠損マウスでの脂肪沈着及び動脈硬化病変形成低下が観察された。一方、シスタチン C 遺伝子欠損での両者の増加が観察された。さらに、カテプシン S 欠損により病変部位のコラーゲン成分沈着とエラスチン内弾性板温存がみられたのにたして、カテプシン C 欠損により両者の低下が観察された。

これらのことより、カテプシンは平滑筋細胞のアポトーシスやマクロファージ浸潤に深く関与し、プラーク・ラプチャー発症において重要な役割を果たすことが明らかになった。スタチンは、カテプシン発現や炎症性細胞浸潤の抑制を介して、臨床のプラーク安定化に寄与すると考えられる。

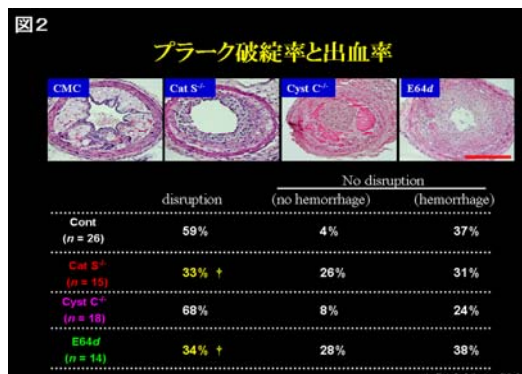
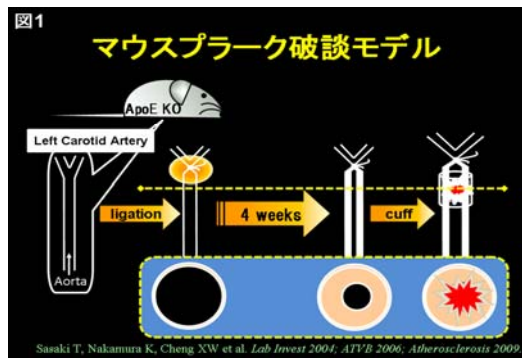


図2：カテプシンS 遺伝子欠損やカテプシン阻害剤投与によるプラーク破綻率の低下、シスタチンC 遺伝子欠損によるプラーク破綻率の増加

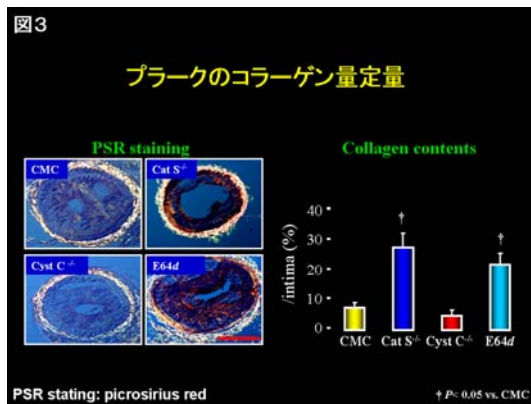


図3：カテプシンS 遺伝子欠損やカテプシン阻害剤投与によるプラークコラーゲン量の増加、シスタチンC 遺伝子欠損による低下

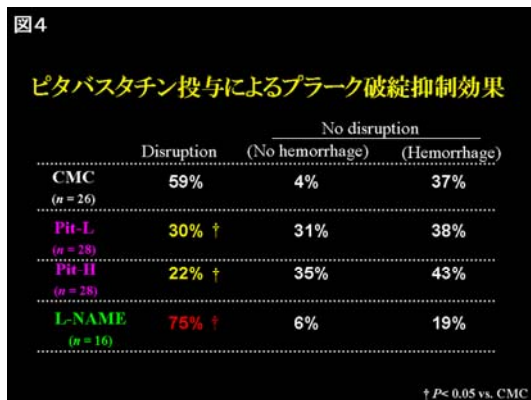


図4：ピタバスタチン投与による濃度依存的にプラーク破綻率の抑制と eNOS 合成阻害剤投与によるその破綻率の増加

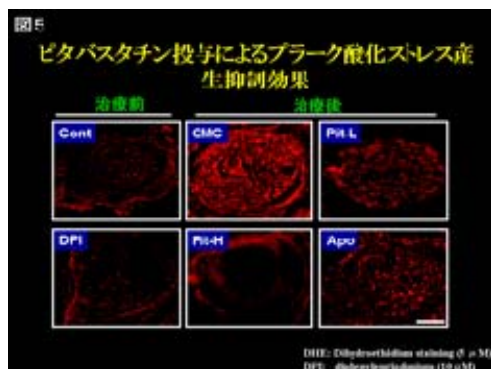


図5：ピタバスタチン投与により濃度依存的にプラーク内 NADPH oxidase-依存的酸化ストレス産生が低下し、eNOS 合成阻害剤投与によりその産生が増加された

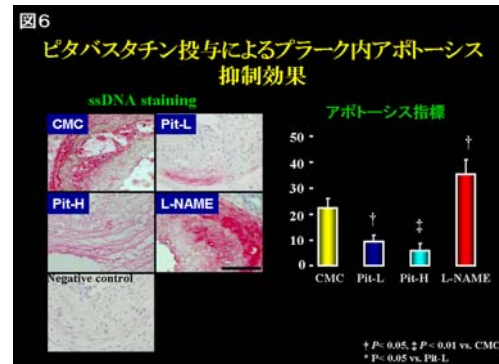


図6：ピタバスタチン投与により濃度依存的にプラーク内細胞アポトーシスが低下し、eNOS 合成阻害剤投与によりアポトーシスの増加した

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 36 件)

- 1) Cheng XW, Shi GP, Kuzuya M, et al (他 3 人, 1 番目) The Role for Cysteine Protease Cathepsins in Heart Disease: Focus on Biology and Mechanisms for Clinical Implication (review). *Circulation*. 125 (12):1551- 1562. 2012. 査読有.
- 2) Cheng XW, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T. Cysteine Proteases Cathepsins in Atherosclerosis-Based Vascular Disease and Complication (review). *Hypertension*. 58(6): 978 - 986. 2011. 査読有.
- 3) Cheng XW, Song H, Sasaki T, et al (他 7 人, 1 番目). Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Reduces Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Hypertension*. 57(5):981- 989. 2011. 査読有.
- 4) Cheng XW, Kuzuya M, Sasaki T, et al (他 11 人, 1 番目). Inhibition of Mineralocorticoid Receptor is a Renoprotective Effect of an HMG CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin. *Journal of Hypertension*. 29 (3):542- 552. 2011. 査読有.
- 5) Cheng XW, Kuzuya M, Kim W, et al (他 9 人, 1 番目). Exercise Training Stimulates Ischemia- induced Neovascularization via PI3K/Akt- dependent HIF-1 α Reactivation in Mice of Advanced Age. *Circulation*. 122 (7):707- 716. 2010. 査読有.
- 6) Cheng XW, Okumura K, Kuzuya M, et al (他 11 人, 1 番目). Mechanism of Diastolic

Stiffening of the Failing Myocardium and Its Prevention by Angiotensin Receptor and Calcium Channel Blockers. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 54(1):47-56. 2009. 査読有.

- 7) **Cheng XW**, Song H, Song H, et al (他3人, 1番目). Role of the Matrix Metalloproteinase System in Neovascularization. *Chinese Journal of Cardiology* (Review). 37(7): 660-662. 2009. 査読有.

[学会発表] (計 65 件)

- 1) **Cheng XW**. Lifestyle Intervention and Vascular Protection in Aged Animal and Human. *The 5th China vascular Disease Forum and Update of Preventive Cardiology*. 2011, Nov. 27, 2011. Guangzhou, China.
- 2) Hu L, **Cheng XW**, et al (他7人, 2番目). Cathepsin K Deficiency Suppresses the Development of Experimental Intimal Hyperplasia in Response to Injury. *American Heart Association- Scientific Sections 2011*. Nov. 16, 2011. Orlando, Florida, USA. (Presenter).
- 3) **Cheng XW**, Song H, et al (他7人, 1番目). Statins Enhance the Beneficial Effects of Olmesartan on Renal Injury in Salt-sensitive Hypertensive Rats via the Reduction of an Angiotensin-Mineralocorticoid Receptor Signaling Interaction. *American Heart Association - Scientific Sections 2011*. Nov. 15, 2011. Orlando, Florida, USA.
- 4) **成 憲武**, 井上愛子, ほか(5人, 1番目). Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Reduces Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. 第34回日本高血圧学会総会. 2011年10月20-22日. 栃木.
- 5) **Cheng XW**, 井上愛子, ほか(他5人, 1番目). Angiotensin II Receptor Antagonist Prevent Atherosclerotic Plaque Growth and Progression: Toll-like Receptor Activation Inhibition. 第34回日本高血圧学会総会. 2011年10月22日. 栃木.
- 6) **Cheng XW**, 胡麗娜, ほか(他5人, 1番目). Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Reduces Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. 第59回日本心臓病学会学術集会. 2011年9月23-25日. 兵庫.
- 7) **成 憲武**, 井上愛子, ほか(他4人, 1番目). Exercise Training Stimulates Ischemia-induced Neovascularization via PI3K/

Akt-dependent HIF-1 α Reactivation in Aged Mice. 第74回日本循環器学会学術集会. 2011年8月3日. 神奈川.

- 8) **成 憲武**, 胡麗娜, ほか(他5人, 1番目). Statin Inhibits Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherogenic Plaque via eNOs/HIF-1 α -Mediated IAP-2 Activation: Implication for Plaque Stability. 第43回日本動脈硬化学会. 2011年7月16日. 北海道.
- 9) 胡麗娜, **成 憲武**, ほか(他7人, 1番目). Cathepsin K Deficiency Suppresses Neointimal Formation Response to Injuries. 第43回日本動脈硬化学会. 2011年7月15日. 北海道.
- 10) **成 憲武**, 葛谷雅文, ほか(他5人, 1番目). Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Reduces Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. 第43回日本動脈硬化学会. 2011年7月15日. 北海道.
- 11) **Cheng XW**. Exercise Rescues Vascular Action Response to Hypoxia in Aged Animals and Humans. *The Special Lecture at The Department of Cardiology of Korean University Hospital*. Seoul, Korea, Jul 3, 2011.
- 12) **Cheng XW**. Effects of Exercise and Age on Angiogenic Action. *The 5th Oriental Congress of Cardiology (OCC2011)*. May 26-29, 2011. Shanghai, China.
- 13) **成 憲武**, 葛谷雅文, ほか(他7人, 1番目). Exercise Stimulates Ischemia-induced Neovascularization via PI3K/Akt-dependent HIF-1 α Reactivation in Aged Mice. 第18回日本血管生物医学学会学術集会. 2010年12月1-3日. 大阪.
- 14) **成 憲武**, 佐々木健, ほか(他7人, 1番目). Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Reduces Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-deficient Mice. 第18回日本血管生物医学学会学術集会. 2010年12月1-3日. 大阪.
- 15) **Cheng XW**, Sasaki T, et al (他8人, 1番目). Superoxide-Dependent Cathepsin Activation is Associated with Hypertensive Renal Remodeling and Dysfunction and Represents a Target for Angiotensin Type 1 Receptor Blocker. *American Heart Association- Scientific Sections 2010*. Nov. 13-17, 2010. Chicago, IL, USA.
- 16) **Cheng XW**, Song H, et al (他8人, 1番目). Statin Inhibits Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherogenic Plaque via eNOs /HIF-1 α - Mediated IAP-2 Activation: Implication for

- Plaque Stability. *American Heart Association-Scientific Sections 2010*. Nov. 13-17, 2010. Chicago, IL, USA.
- 17) **Cheng XW**, Sasaki T, et al (他6人、1番目). Superoxide-Dependent Cathepsin Activation System Is Associated with Hypertensive Renal Remodeling and Dysfunction and Represents a Target for Statin. *6th China-Japan Cardiovascular Forum (CJCF)*. Oct 16-17, 2010. Beijing, China.
 - 18) **Cheng XW**, 胡麗娜、ほか(他5人、1番目). Exercise Training Stimulates Ischemia-induced Neovascularization in Mice of Advanced Age. **第33回日本高血圧学会総会**. 2010年10月15-17日. 福岡.
 - 19) **成憲武**, 永田浩三、ほか(他5人、1番目). Ca²⁺ channel blocker benidipine promotes coronary angiogenesis and reduces both left ventricular diastolic stiffness and mortality in hypertensive rats. **第33回日本高血圧学会総会**. 2010年10月15-17日. 福岡.
 - 20) **Cheng XW**, Sasaki T, et al(他7人、1番目). Superoxide-Dependent Cathepsin Activation System Is Associated with Hypertensive Renal Remodeling and Dysfunction and Represents a Target for Statin. **第33回日本高血圧学会総会**. 2010年10月15-17日. 福岡.
 - 21) **Cheng XW**, 胡麗娜、ほか(他5人、1番目). Inhibition of Mineralocorticoid Receptor is a Renoprotective Effect of an HMG CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin. **第58回日本心臓病学会学術集会**. 2010年9月17-19日. 東京.
 - 22) **Cheng XW**. Association of Diabetes with Myocardial Collagen Accumulation and Relaxation Impairment in Patients with Dilated Cardiomyopathy. *EST-West Medical Research Institute Basic Research Meeting*. Seoul, Korea, Jul. 27, 2010.
 - 23) **成憲武**, 佐々木健、ほか(他6人、1番目). Superoxide-Dependent Cathepsin Activation is Associated with Hypertensive Cardiorenal Remodeling and Represents a Target for Statins. **第42回日本動脈硬化学会**. 2010年7月15日. 岐阜.
 - 24) 胡麗娜、**成憲武**、ほか(6人、2番目). Deficiency of Cathepsin K Suppresses Smooth Muscle Cell Invasion and Development of Experimental Intimal Formation. **第42回日本動脈硬化学会**. 2010年7月15日. 岐阜.
 - 25) **Cheng XW**, Sasaki T, et al (他9人、1番目). Superoxide-Dependent Cathepsin Activation System Is Associated with Hypertensive Renal Remodeling and Dysfunction and Represents a Target for Statin. *XX World Congress ISHR 2010*. May 13-16, 2010. Kyoto, Japan.
 - 26) **Cheng XW**, Song H, et al (他6人、1番目). Exercise Training Stimulates Ischemia-induced Neovascularization via PI3K/Akt-dependent HIF-1 α Reactivation in Mice of Advanced Age. *XX World Congress ISHR 2010*. May 13-16, 2010. Kyoto, Japan.
 - 27) **Cheng XW**, Sasaki T, et al(他7人、1番目). Superoxide-Dependent Cathepsin Activation System Is Associated with Hypertensive Renal Remodeling and Dysfunction and Represents a Target for Statin. **第74回日本循環器学会学術集会**. 2010年3月5-7日. 京都.
 - 28) **Cheng XW**, Okumura K, et al(他6人、1番目). Exercise Training Stimulates Neovascularization in Response to Ischemia via HIF-1 α -VEGF-mediated Activation of MMP-2 in Advanced Age. **第74回日本循環器学会学術集会**. 2010年3月5-7日. 京都.
 - 29) **Cheng XW**, Okumura K, et al(他6人、1番目). Superoxide-Dependent Cathepsin Activation System Is Associated with Hypertensive Renal Remodeling and Represents a Target for Statin. *American Heart Association-Scientific Sections 2009*. Nov. 14-18, 2009. Orlando, Florida, USA.
 - 30) **Cheng XW**, Kuzuya M, et al(他6人、1番目). Exercise Training Stimulates Neovascularization in Response to Ischemia via HIF-1 α -VEGF-mediated Activation of MMP-2 in Advanced Age. *American Heart Association-Scientific Sections 2009*. Nov. 14-18, 2009. Orlando, Florida, USA.
 - 31) **Cheng XW** Okumura K, et al(他5人、1番目). Statin Prevents Apoptosis in Response to Oxidative Stress in Atherogenic Plaque via Enhancement of Antiapoptotic Protein IAP-2: Implication for Plaque Stability. *5th China-Japan Cardiovascular Forum (CJCF)*. Oct. 23-24, 2009. Beijing, China.
 - 32) **Cheng XW**, Kobayashi M, et al(他4人、1番目). Dobutamine Stress Testing as a Diagnostic Tool for Evaluation of Myocardial Contractile Reserve in Asymptomatic or Mildly Symptomatic Patients with Dilated Cardiomyopathy.

5th China-Japan Cardiovascular Forum (CJCF). Oct 23-24, 2009. Beijing, China.

- 33) 成 憲武、葛谷雅文、ほか(他7人、1番目).
Statin Prevents Apoptosis in Response to Oxidative Stress and Inflammation in Atherogenic Plaque via Enhancement of Antiapoptotic Protein IAP-2 and Bcl-2 Associated with Activation of eNOs: Implication for Plaque Stability. 第17回日本血管生物医学学会学術集会. 2009年10月8-9日. 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成 憲武 (XIAN WU CHENG)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：30378228

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

葛谷雅文 (KUZUYA MASAHUMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授