

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5月9日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591122

研究課題名（和文） 動脈硬化における小胞体ストレス応答・酸化ストレス応答の役割

研究課題名（英文） Involvement of CHOP in Arteriosclerosis Acceleration with Augmented Biological Stress Responses

研究代表者

石垣 泰（ISHIGAKI YASUSHI）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50375002

研究成果の概要（和文）：小胞体(ER)ストレス応答蛋白 CHOP は動脈硬化病変に発現していることから、CHOP 欠損マウス(KO)を用いて動脈硬化における ER ストレス・酸化ストレス応答の役割を検討した。CHOP KO ではカフ傷害による動脈内膜肥厚と高脂血症による粥状動脈硬化進展が抑制されており、血管の酸化ストレス、炎症そして ER ストレスの抑制が認められた。CHOP は ER ストレスで誘導されるのみならず、酸化ストレスや炎症反応を増強し、さらに ER ストレス応答自体も調節し、動脈硬化形成に促進的に働いていると考えられた。

研究成果の概要（英文）： The processes of arteriosclerosis are affected by interactions among numerous biological pathways, such as responses to inflammation, oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress. C/EBP homologous protein (CHOP), which is well known to induce cellular apoptosis in response to severe ER stress, is reportedly up-regulated in plaque lesions. Cuff injury-induced neointimal formation and hypercholesterolemia-induced aortic plaque formation were markedly inhibited in CHOP^{-/-} mice with suppressed aortic expressions of inflammatory factors and oxidative stress markers. CHOP may play important roles in augmenting potentially pathological biological stress responses and contribute to the progression of vascular remodeling and atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・代謝学

キーワード：動脈硬化・小胞体ストレス・酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

全身の様々な病態に関与している生体反応として、小胞体ストレス応答が注目を集めている。動脈硬化との関連も精力的に研究が進んでおり、進行した動脈硬化病変において小胞体ストレスの亢進が認められることや、酸

化ステロールが小胞体ストレスの亢進を介してプラーク破裂を惹起することが報告されている。

これらの研究から、小胞体ストレス応答に関わる分子の中で動脈硬化の病態に深く関与していると考えられるのが CHOP(C/EBP

homologous protein)である。CHOP は C/EBPファミリーに属する転写因子で、小胞体ストレスによって発現が誘導され細胞をアポトーシスへと導く。動脈硬化病変では CHOP の発現亢進が認められ、マクロファージのアポトーシスを誘導していると考えられるが、一方で CHOP は酸化ストレス応答や炎症反応をも調節していると報告されており、動脈硬化の病態においても CHOP を介する多様な機序が関与している可能性がある。しかしながらこれまでの研究では、CHOP 蛋白の発現、ひいては、小胞体ストレス応答が動脈硬化の発症・進展にどのように関わっているかについては不明な点が多い。そこで、研究代表者は CHOP を欠損したマウスを用い小胞体ストレス応答、さらには CHOP によって調節される酸化ストレス応答や炎症反応を *in vivo* で解析すること、および、動脈硬化病変を形成する血管内皮細胞・平滑筋細胞・マクロファージの個々の細胞系を用いて解析し、*in vitro* でストレス応答に関する詳細な機序を解明することにより、動脈硬化の発症・進展の新たな機序を解明できるのではないかという研究を着想した。

2. 研究の目的

CHOP 欠損マウスを中心とした解析から、動脈硬化の発症・進展における小胞体ストレスと酸化ストレスの役割や相互作用を明らかにし、生体内のストレス応答を調節することによる動脈硬化に対する新規予防・治療法の可能性を探ることである。

3. 研究の方法

(1) CHOP 欠損マウスを C57BL/6 マウスとのバッククロスを行った。また、この CHOP 欠損マウスと C57BL/6 を背景に持つアポ E 欠損マウスと交配し、アポ E を欠損した CHOP ホモ欠損型を樹立した。

(2) 8週齢の CHOP 欠損マウスの大腿動脈にカフ傷害を施し、3週間後に動脈における反応性内膜肥厚を検討した。また同部位の血管から mRNA を抽出し、遺伝子発現を検討した。

(3) 様々な週齢の高コレステロール食を負荷した CHOP・アポ E ダブル欠損マウスを用いて動脈硬化病変を定量化した。また免疫染色や大動脈の遺伝子発現を検討した。

(4) 野生型マウスと CHOP 欠損マウスを用いて骨髄移植を行う。ドナーとレシピエントの組み合わせによって、全身に CHOP を有する、骨髄のみ CHOP を有する、骨髄のみ CHOP を欠損する、全身に CHOP を欠損する、の 4 群のマウスを作成し、カフ傷害や粥状動脈硬化に関する検討を行い、血球細胞あるいは血管壁構成細胞のいずれの CHOP が血管障害に重要であるか検討した。

(5) 腹腔マクロファージの初代培養や血管内皮、血管平滑筋の培養細胞を用いて、CHOP 欠損やノックダウンの影響を詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) CHOP 欠損マウスの特徴

CHOP 欠損マウスは、11 週齢の時点で体重、血糖値、血圧、脂質値に野生型との差を認めなかったが、血清アディポネクチン値が有意に高かった。apoE 欠損マウス交配モデルにおいても、体重、血糖値、血圧、脂質値に差を認めなかった。従来動脈硬化の危険因子と考えられている要素に関しては、CHOP 欠損マウスに明らかな特徴はないと考えられた。

(2) カフ傷害による反応性内膜肥厚の検討

CHOP 欠損マウスでは野生型マウスに比べカフ傷害後の内膜肥厚が 41%抑制されていた(内膜面積/中膜面積: 野生型 vs CHOP 欠損; 0.472 ± 0.03 vs 0.279 ± 0.025 , $P=0.0001$ 、図 1)。

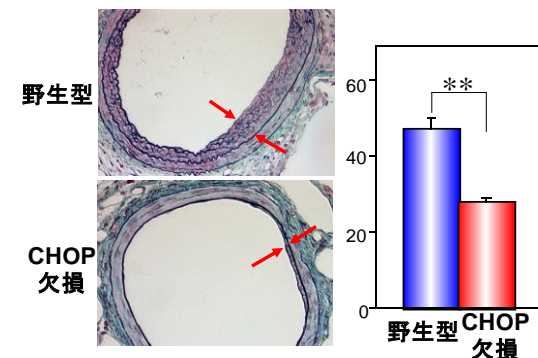


図1 カフ傷害後の反応性内膜肥厚

カフ傷害部位の血管の遺伝子発現を検討したところ、カフ傷害によって CHOP の発現が上昇することが確認された。さらに CHOP 欠損マウスでは MCP-1 や IL-6 といった炎症性サイトカインや PDGFB といった増殖因子の発現が著明に抑制されていた。以上の結果から、CHOP 欠損は炎症性サイトカインや増殖因子の抑制を介して炎症由来の反応性内膜肥厚を抑えていると考えられた。

(3) 粥状動脈硬化の検討

高コレステロール負荷 apoE 欠損マウス交配モデルでは、14 週齢の大動脈では動脈硬化面積に差が認められなかったが、CHOP 欠損マウスで MCP-1、iNOS、IL-1 β などの炎症性因子や ROS 産生に関わる GADD34、ER1、また接着因子 VCAM1 などの発現が抑制されていた。CHOP 欠損によって動脈硬化面積は 20 週齢の時点から進行が抑制され、32 週齢では野生型と比較して 46%抑制されていた(図 2)。32 週齢に時点でも 14 週齢とほぼ同様に、炎症性因子や ROS 産生因子の発現が抑えられていた。加えて TGF β や PDGFB といった平滑筋増殖因子の発現が抑制されていたが、接着因子には差を認めなかった。以上の結果から、

CHOP 欠損は高コレステロールによって導かれる、血管における炎症反応や酸化ストレス反応、接着因子の増大を抑制することで、その後の粥状動脈硬化進展を抑えていると考えられた。

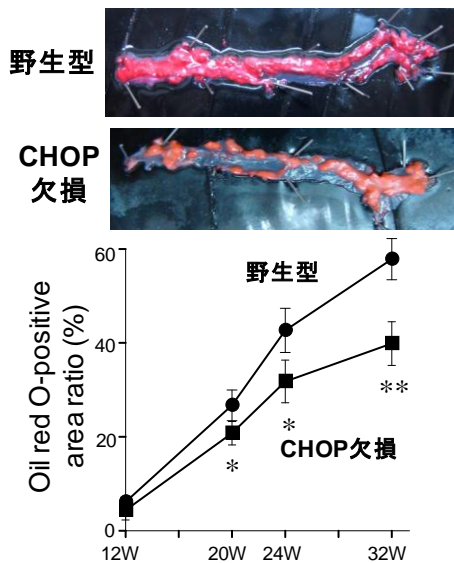


図2 動脈硬化面積の変化

(4) 骨髄移植を用いた検討

野生型→野生型のBMT群で最も強い内膜肥厚が認められ、次いで野生型→CHOP欠損のBMT群とCHOP欠損→野生型のBMT群が同程度で、さらにCHOP欠損→CHOP欠損のBMT群でカフ傷害後の内膜肥厚が最も抑えられていた(図3)。またapoE欠損を背景にした高コレステロールモデルにおける動脈硬化に関しても、同様の結果を認めた。各群間の内膜肥厚を検討したところ、血球細胞よりも血管壁細胞のCHOPが動脈硬化形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

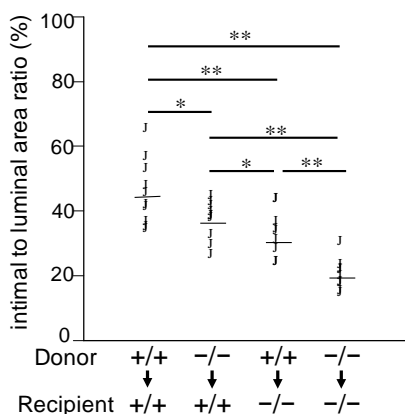


図3 骨髄移植後の反応性内膜肥厚

(5) 培養細胞を用いた検討

マウス腹腔マクロファージを採取し、小胞体ストレスを負荷したところ、CHOP欠損マクロファージでは炎症性サイトカインの上昇が抑えられていた。同様に小胞体ストレスを負荷したところ、血管平滑筋細胞では増殖因子

発現が、また血管内皮細胞では酸化ストレス反応や接着因子の発現が有意に抑制されていた。マクロファージ、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞のいずれにおいても、CHOP欠損は動脈硬化形成に保護的に働いていることが明らかとなった。

以上の研究結果から、血管壁における小胞体ストレス応答蛋白 CHOP が動脈硬化形成の鍵を握る分子のひとつであり、代謝異常から動脈硬化にいたる分子機構として、酸化ストレス、小胞体ストレス、炎症反応といった生体応答の複雑なクロストークが、重要な役割を果たしていることが明らかにできた。

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 13 件)

- ① Gao J, Ishigaki Y, Yamada T, Kondo K, Yamaguchi S, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Ishihara H, Oyadamari S, Mori M, Oka Y, Katagiri H, Involvement of Endoplasmic Stress Protein C/EBP Homologous Protein in Arteriosclerosis Acceleration With Augmented Biological Stress Responses. *Circulation*, 査読有, 124(7), 830-839, 2011
- ② Shoji K, Morita H, Ishigaki Y (他 7 名、3 番目) Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency without mutations in the coding sequence: a case report and literature review. *Clin Nephrol*. 査読有, 2011 76(4):323-328.
- ③ Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Matsusue K, Yamazaki T, Oka Y, Katagiri H. Hepatic peroxisome proliferator activated receptor- γ fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals. *Eur Heart J*. 査読有, 2011 Aug 8. [Epub ahead of print]
- ④ Kudo H, Emi M, Ishigaki Y (他 7 名、3 番目) Frequent loss of genome gap region in 4p16.3 subtelomere in early-onset type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res*. 査読有, 2011:498460.
- ⑤ Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y (他 6 名、4 番目) Interleukin-6 enhances glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta-cells:

potential involvement of the PLC-IP3-dependent pathway. *Diabetes*. 査読有、2011;60(2): 537-47.

- ⑥ 石垣 泰、動脈硬化発症・進展における血中酸化LDLの重要性、*糖尿病*、査読有、53 (4)、pp.231-233、2010
- ⑦ 石垣 泰、片桐 秀樹、岡 芳知、糖尿病性腎症と脂質代謝異常、*The Lipid*、査読無、Vol. 21 No. 2、pp. 37-41、2010
- ⑧ Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor *Curr Opin Lipidol*. 査読有、2009; 20(5): 363-9.
- ⑨ Imai J, Yamada T, Saito T, Ishigaki Y, Hinokio Y, Kotake H, Oka Y, Katagiri H. Eradication of insulin resistance. *Lancet*. 査読有、2009;374(9685):264.
- ⑩ Tokita A, Ishigaki Y, Okimoto H (他 8 名、2 番目) Carotid arterial elasticity is a sensitive atherosclerosis value reflecting visceral fat accumulation in obese subjects. *Atherosclerosis*, 査読有、261(1): 168-72, 2009.
- ⑪ Ishimura A, Watanabe M, Nakashima H, Ito K, Miyake K, Mochizuki S, Ishigaki Y, Saito T. Lipoprotein glomerulopathy induced by ApoE-Sendai is different from glomerular lesions in aged apoE-deficient mice. *Clin Exp Nephrol*. 査読有、2009; 13(5): 430-7.
- ⑫ Kaneko K, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Obesity alters circadian expressions of molecular clock genes in the brainstem. *Brain Research* 査読有、1263: 58-68, 2009.
- ⑬ 石垣 泰、及川眞一、片桐秀樹、岡 芳知、La(a) アイソフォームの糖尿病性腎症発症に及ぼす影響、*THERAPEUTIC RESEARCH*、査読無、Vol. 30 No. 9、pp. 1435-1436、2009

[学会発表] (計 8 件)

- ① Yasushi Ishigaki, Naoki Kawagishi, Yoshitomo Oka, Susumu Satomi, Hideki Katagiri, Shinichi Oikawa、Living donor liver transplantation for homozygous familial hypercholesterolemia、第 43 回日本動脈硬化学会、2011 年 7 月 15-16 日、札幌
- ② 石垣 泰、片桐 秀樹、代謝内科からみた metabolic surgery の有用性、第 29 回日本肥満症治療学会、2011 年 6 月 10-11 日、京都
- ③ 石垣 泰(他 6 名、1 番目)糖負荷後の血

糖上昇が血管性状に及ぼす影響の検討、第 25 回日本糖尿病合併症学会、2010 年 10 月 22-23 日、大津

- ④ 石垣 泰(他 6 名、1 番目)糖負荷後血糖上昇と血管性状変化の検討、第 3 回日本肥満症治療学会学術集会、2010 年 9 月 10-11 日、東京
- ⑤ Yasushi Ishigaki, Junhong Gao, Hideki Katagiri, Yoshitomo Oka, ER stress responses, both in macrophages and vascular cells, play important roles in the development of arteriosclerosis. 第 42 回日本動脈硬化学会総会、2010 年 7 月 15-16 日、岐阜
- ⑥ Keiichi Kondo, Junhong Gao, Yasushi Ishigaki, Yoshitomo Oka, Hideki Katagiri, The Role of CHOP Expressed in Vascular and Hematopoietic Cells in Vascular Remodeling、American Diabetes Association 70th Scientific Sessions、2010 年 6 月 27 日、Orlando Florida U.S.A.
- ⑦ 石垣 泰(他 9 名、1 番目)頸動脈血管弾性特性による肥満、代謝異常にともなう早期動脈硬化の評価、第 28 回日本脳神経超音波学会、2009 年 7 月 11 日-12 日、大阪
- ⑧ 石垣 泰、鴫田 藍、片桐 秀樹、岡 芳知。超音波測定による頸動脈血管弾性は内臓肥満に伴う早期動脈硬化を評価できる、第 2 回日本肥満症治療学会学術集会、2009 年 7 月 10 日-11 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石垣 泰 (ISHIGAKI YASUSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50375002

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

高 俊弘 (GAO JUNHONG)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70455781

澤田 正二郎 (SHOUJIROU SAWADA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60509420

山口 賢 (YAMAGUCHI SUGURU)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：70451614