

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591096

研究課題名(和文)低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素Ero1の心血管リモデリングにおける役割解明

研究課題名(英文)Role of ER oxidoreductin-1 in cardiovascular remodeling

研究代表者

南野 哲男(MINAMINO, TETSUO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30379234

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文):低酸素状態は虚血性心疾患や動脈硬化などの循環器疾患の病態形成に深く関与する。本研究では、低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素Ero1の心血管リモデリングにおける役割を明らかにするため、Gene trap ESクローンをを用いて、Ero1遺伝子欠失マウスを作製した。興味深いことに、ヒト腹部大動脈サンプルを用いた免疫組織学的検討の結果、同疾患部位においてEro1発現が上昇していることを見いだした。そこで、Ero1遺伝子欠失マウスにアンジオテンシンIIを持続投与したところ、腹部大動脈瘤が形成されることを見いだした。Ero1は腹部大動脈形成に重要な役割をはたしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文):Hypoxic stimuli play important roles in the development of cardiovascular diseases such as ischemic heart disease, atherosclerosis. In the present study, to clarify the role of ER oxidoreductin-1 (Ero1), a major ER oxidase, in the development of abdominal aortic aneurysm, we have tried and succeeded to create Ero1 knockout mice by ES trap method. Interestingly, we found that Ero1 expression increased in human samples from abdominal aortic aneurysm. We also found that continuous infusion of angiotensin II induced abdominal aortic aneurysm in Ero1 knockout, but not normal, mice, suggesting that Ero1 plays an important role in the development of abdominal aortic aneurysm.

研究分野：循環器内科学

キーワード：小胞体ストレス 腹部大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

小胞体は全蛋白質の約 30%を占める分泌蛋白質が合成される細胞内小器官である。新たに合成された分泌蛋白質は、小胞体内でシャペロンやジスルフィド結合などの翻訳後修飾によりフォールド(折りたたみ)された後、分泌経路に運ばれる。一方、低酸素刺激はミスフォールド蛋白質(高次構造上の異常蛋白質)の小胞体内蓄積を引き起こす(小胞体ストレス)。この小胞体ストレスに対する細胞応答として、蛋白質折りたたみを担う小胞体シャペロンが誘導され、同時に、新規蛋白質の翻訳が抑制され、小胞体への負荷を軽減させる(小胞体ストレス応答)。しかし、ミスフォールド蛋白質蓄積が小胞体応答による対応能力を逸脱した時、小胞体よりアポトーシスシグナルが発信される(小胞体発信アポトーシス)。現在では、小胞体は細胞の生死を決定する重要な細胞内小器官として注目されている。興味深いことに、ミスフォールド蛋白質蓄積が神経変性疾患や糖尿病・脂肪肝などの疾患に関与することが明らかになり、世界中で活発な研究が行われている。私たちは、ヒト不全心サンプルにて小胞体ストレス応答が惹起されていること、小胞体発信アポトーシスシグナルが心肥大・心不全発症に重要であることを示した(Circulation 2004, 2010)。また、ヒト冠動脈組織標本にて、プラーク破綻部位に小胞体ストレス応答が惹起されていること、ならびに、酸化コレステロールによるマクロファージの細胞死は小胞体発信アポトーシスシグナルを介することを示した(Circulation 2007)。以上より、小胞体ストレスが心肥大・心不全の発症や動脈硬化プラーク破綻に関与することを世界に先駆けて明らかにした(Minamino T et al. Circ Res 2010)。

小胞体内でおこなわれる、チオール基の酸化還元をベースとしたジスルフィド結合の形成・異性化・開裂は、蛋白質の高次構造形成および機能発現制御において重要な役割を担う。小胞体にはジスルフィド結合導入酵素として protein disulfide isomerase (PDI)が存在し、またその再酸化分子として Ero1 が存在する。Ero1 は PDI を酸化する際、活性酸素種(ROS)である過酸化水素を副産物として生じる(Zanget al.,2008)。また、Ero1 は小胞体膜上カルシウムチャンネル IP3 receptor (IP3R) を活性化し、小胞体からのカルシウム流入を制御する(Li et al.,2009)。すなわち、Ero1 は小胞体ストレス軽減、分泌蛋白質促進、ROS 産生、カルシウム制御など循環器系疾患の根幹になる病態に重要であることが予想されるが、その病態生理的な役割は明らかでない。そこで、培養ラット心筋細胞に小胞体ストレスの一つである低酸素刺激を加え、ジスルフィド結合関連酸化還元酵素の遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。興味深いことに、低酸素刺激早期から Ero1 のみが発現を急激に増大することを見出した。次に、低酸素状態が病態形成に深く関与するヒト心筋梗塞部位サンプル、ならびに、血管障害・修復の過程では様々なサイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼなどの分泌蛋白質が関与する

ヒト大動脈瘤サンプルを用いて免疫組織学的検討を行い、Ero1 発現が著明に増大していることを見出した。以上より、心血管リモデリングにおける Ero1 の病態生理学的な役割を検討するため、下記の研究計画を立案した。

2. 研究の目的

低酸素状態は虚血性心疾患、動脈硬化、腹部大動脈瘤などの循環器疾患の病態形成に深く関与する。私たちは、新しい病態概念である小胞体ストレスが心血管リモデリングの進展に重要な役割を果たすことを世界に先駆けて示した。本研究では、低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素 Ero1 (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1) の腹部大動脈瘤の形成過程における役割を明らかにする。本研究の成果として、心筋リモデリングにおける小胞体ストレスの役割解明が進み、Ero1 を標的とした循環器創薬に貢献することが期待できる。

3. 研究の方法

1.低酸素刺激による小胞体ストレス応答に及ぼす Ero1 の役割検討

ラット新生仔培養心筋細胞を用いて、低酸素条件下において、Ero1 のノックダウンまたは強制発現が、小胞体ストレス発信アポトーシスシグナルである CHOP や小胞体シャペロンである KDEL の発現に及ぼす影響を検討する。

2. ヒト血管平滑筋細胞、マクロファージ細胞を用いて、低酸素刺激時における各種蛋白質分泌に及ぼす影響ならびに小胞体ストレス軽減作用について Ero1 の役割検討

THP-1 細胞に PMA 処理を行い、マクロファージに分化させ、マクロファージにおける低酸素刺激による Ero1 発現変化を検討した。また、培養大動脈平滑筋に低酸素刺激を加え、Ero1 発現変化を検討した。

3. Ero1 KO マウスと ApoE KO マウスのダブル KO マウスを用いて、大動脈瘤形成に及ぼす Ero1 の役割検討

ApoE KO マウス、または、Ero1 KO マウスにアンジオテンシン II を持続投与することにより腹部大動脈瘤モデルを作製した。

4. 研究成果

低酸素刺激による心筋小胞体ストレスにおける Ero1 の役割

培養心筋細胞に低酸素刺激を加えると、Ero1 上昇と、CHOP 発現・KDEL 上昇を認め、Ero1 のノックダウンにより、CHOP 発現・KDEL 上昇の増強を認めた。逆に Ero1 を強制発現していると CHOP 発現・KDEL 上昇の抑制を認め、ノックダウンの Rescue も可能である。心筋細胞の TUNEL 染色陽性細胞数は、低酸素刺激で上昇し、Ero1 ノックダウンでよりさらに増加する。Ero1 は低酸素下で心筋保護的に働いている可能性が示された。

マクロファージ・血管平滑筋における Ero1 発現

THP1 細胞において、単球からマクロファージへの分化過程において、Ero1 発現が増大することを明らかにした。また、Ero1 遺伝子ノックダウンにより、マクロファージのケモカイン、サイトカインの分泌能は抑制されるが、食食能に変化を認めなかった。低酸素刺激により、マクロファージ、大動脈血管平滑筋細胞において、Ero1 が著しく誘導されることが明らかになった。

Ero1 KO マウス作製

Ero1 KO マウスには既存の報告(Li et al., 2009; Zito et al., 2010)があり、これは Gene trap 法により Ero1 の正常蛋白質合成を阻害し、Ero1 の機能が失われたことが確認されている。私たちは報告されている Gene trap ES クローンを購入し、KO マウスを作製し、遺伝子タイピングで確認し、Ero1 KO マウスの作製を確認した。

腹部大動脈瘤部位における Ero1 発現増大 動物モデルやヒト大動脈瘤サンプルを用いた検討

分担研究者羽尾は、ApoE KO マウスにアンジオテンシン II を持続投与することにより腹部大動脈瘤モデルの作製に成功している。このモデルを用いた免疫組織学的検討の結果、腹部大動脈瘤形成部位において、Ero1 発現が増大していることが明らかになった。

複数のヒト大動脈瘤サンプルを用いて免疫組織学的検討を行い、Ero1 発現が著明に増大していることを確認した。

腹部大動脈形成における Ero1 の役割検討

10 週齢の Ero1^{-/-} KO マウスを用いて、AngII 持続投与を行ったところ、大動脈に瘤形成が認められた。本 KO マウスのバックグランドである 10 週齢の B6 マウスに対し AngII 持続投与を行っても瘤形成は認められないことから、Ero1 は腹部大動脈瘤形成に重要な役割を果たすことが示唆された。今後、さらに、サンプル数を増加するとともにメカニズムに関する検討をさらに進める。

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 3 件)

Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T. Antibody-modified lipid nanoparticles for selective delivery of siRNA to tumors expressing membrane-anchored form of HB-EGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読あり, 2014;449(4):460-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.043.
Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, Minamino T, Oku N. Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with

asialo-erythropoietin. *J Control Release*.

査読あり, 2012;160(1):81-7. doi:

10.1016/j.jconrel.2012.02.004.

Ishii T, Asai T, Oyama D, Agato Y, Yasuda N, Fukuta T, Shimizu K, Minamino T, Oku N.

Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes

encapsulating FK506. 査読あり, *FASEB J*.

2013;27(4):1362-70. doi:

10.1096/fj.12-221325. Epub 2012 Dec 14.

Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O,

Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S,

Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K,

Asanuma H, Asakura M, Minamino T,

Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M,

Komuro I, Asano Y, Takashima S. Evaluation

of intramitochondrial ATP levels identifies

G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator

of oxidative phosphorylation. 査読あり,

Proc Natl Acad Sci U S A.

2014;111(1):273-8. doi:

10.1073/pnas.1318547111.

Takahashi A, Asakura M, Ito S, Min KD,

Shindo K, Yan Y, Liao Y, Yamazaki S,

Sanada S, Asano Y, Ishibashi-Ueda H,

Takashima S, Minamino T, Asanuma H,

Mochizuki N, Kitakaze M.

Dipeptidyl-peptidase IV inhibition improves

pathophysiology of heart failure and

increases survival rate in

pressure-overloaded mice. *Am J Physiol*

Heart Circ Physiol. 2013 May

15;304(10):H1361-9. doi:

10.1152/ajpheart.00454.

Yoshida A, Asakura M, Asanuma H, Ishii A,

Hasegawa T, Minamino T, Takashima S,

Kanzaki H, Washio T, Kitakaze M. Derivation

of a mathematical expression for predicting

the time to cardiac events in patients with

heart failure: a retrospective clinical study.

Hypertens Res. 2013 May;36(5):450-6. doi:

10.1038/hr.2012.200.

Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H,

Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani

Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura

M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y,

Kitakaze M, Takashima S. Augmented

AMPK activity inhibits cell migration by

phosphorylating the novel substrate Pdlim5.

Nat Commun. 2015 Jan 30;6:6137. doi:

10.1038/ncomms7137.

Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H,

Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M,

Shinzawa-Ito K, Takafuji K, Higo S, Kato H,

Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A,

Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto Y,

Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y,

Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S.

Higd1a is a positive regulator of cytochrome

c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015

Feb 3;112(5):1553-8. doi:
10.1073/pnas.1419767112.
Asanuma H, Sanada S, Asakura M, Asano Y,
Kim J, Shinozaki Y, Mori H, Minamino T,
Takashima S, Kitakaze M. Carperitide
induces coronary vasodilation and limits
infarct size in canine ischemic hearts: role
of NO. Hypertens Res. 2014;37(8):716-23.
doi: 10.1038/hr.2014.70.

研究者番号:80589151

〔学会発表〕(計 2 件)

富 海英、南野哲男 . Development of Novel
Therapy for Autoimmune Myocarditis with
Nanotechnology. 日本心不全学会 YIA .
2013 年 11 月 29 日 . 埼玉県大宮市 .

南野哲男 . Academic Drug Development for
Treatment of Acute Myocardial Infarction
Using Nano-sized Liposomes. 2014 年 3 月
23 日 . 東京 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

南野 哲男 (MINAMINO, Tetsuo)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号:30379234

(2)研究分担者

肥後 修一郎 (Higo, Schuichiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号:00604034

(3)研究分担者

羽尾 裕之 (Hao, Hiroyuki)
兵庫医科大学・医学系研究科・准教授
研究者番号:40393243

(4)研究分担者

朝野 仁裕 (Asano, Yoshihiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60527670

(5)研究分担者

真田 昌爾 (Sanada, Shoji)
大阪大学・保健センター・助教
研究者番号:70593797

(6)研究分担者

塚本 蔵 (Tsukamoto, Osamau)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究
員