

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790394

研究課題名(和文) ASK1 knock outによるアポトーシスの粥腫破綻における役割

研究課題名(英文) Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Deficiency Attenuates Vascular Injury-Induced Neointimal Hyperplasia By Suppressing Apoptosis In Smooth Muscle Cells

研究代表者

山田 壮亮 (YAMADA, Sohsuke)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90525453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：活性化したASK1はアポトーシスを誘発することが知られている。我々は、ASK1をターゲットとした遺伝子組み替え動物(ノックアウトマウス、ASK1<sup>-/-</sup>)を用いて、古典的な(A)高脂血症モデルおよび(B)血管障害モデルを各々施行した。

(A)ASK1<sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup>の粥腫肥厚内膜では、組成の中心であるマクロファージのアポトーシスが有意に抑えられ、かつ中心壊死性脂質コアの面積がより減少しているにもかかわらず、動脈硬化巣が進展していた。(B)ASK1<sup>-/-</sup>の肥厚内膜では、組成の中心である平滑筋細胞のアポトーシスが有意に抑えられ、かつ細胞密度がより高いにもかかわらず、動脈硬化巣が抑制されていた。

研究成果の概要(英文)：We investigated neointimal remodeling in ligated carotid arteries of ASK1-deficient mice (ASK1<sup>-/-</sup>) for 3 weeks. ASK1<sup>-/-</sup> mice had significantly more suppressed intimal formation, inversely manifesting as potential anti-atherogenic aspects of ASK1 deficiency, characterized by fewer SMCs and less collagen synthesis; and fewer apoptotic SMCs, infiltrating T-lymphocytes and microvessels, associated with decreased apoptosis of luminal endothelial cells (ECs), compared to those of wild type (WT) mice. Injured arteries of ASK1<sup>-/-</sup> mice also showed significantly down-regulated expression of pro-apoptotic markers, adhesion molecules and pro-inflammatory signaling factors. Moreover, tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis was markedly suppressed in cultured aortic SMCs from ASK1<sup>-/-</sup> mice.

研究分野：病理学

キーワード：病理学 動脈硬化 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 は酸化ストレスや炎症性サイトカインの刺激を介してアポトーシス誘導に寄与する一酵素である。動脈硬化は炎症性複合病変であり、高血圧や脂質異常だけでなく、酸化ストレスや炎症性サイトカイン、アポトーシスなど多くの因子に規定され、組織学的には大きく粥腫形成と新生内膜肥厚に分けることが出来る。我々は、ASK1 と apolipoprotein E (apoE) の double knockout mice (ASK1<sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup>)を用いた高コレステロール血症モデルにおいて、ASK1<sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> の粥腫内マクロファージのアポトーシスが有意に減少することで necrotic core 形成が抑制され、粥腫破綻に対して保護的に作用する可能性を見出した。

2. 研究の目的

今回我々は、動脈硬化のもうひとつの側面と考えられる、血管平滑筋細胞 smooth muscle cells (SMC) の増生を主とした新生内膜肥厚に対する ASK1 の役割について、ASK1 knockout mice (ASK1<sup>-/-</sup>)を用いた血管障害モデルを施行して検討した。

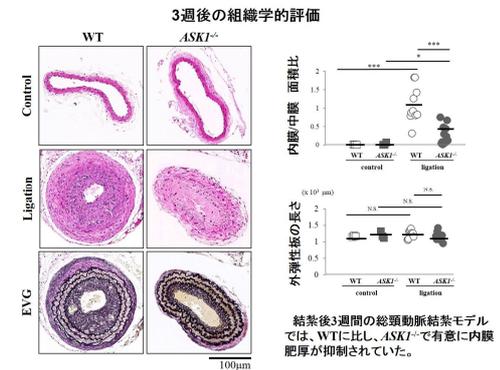
3. 研究の方法

(1) 総頸動脈結紮モデル: Wild type (C57BL/6, WT) および ASK1<sup>-/-</sup> (C57BL/6 background) を用い、左総頸動脈結紮後2週ないし3週で動脈を摘出した。組織学・免疫組織化学的観察: 結紮部より中極側へパラフィン包埋連続切片を作製し、H&E 染色を行って肥厚内膜の面積を比較した。加えて、Masson's trichrome 染色、transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色や bromodeoxyuridine (BrdU) 染色、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), CD3, CD31, ki-67 等について免疫組織化学的に検討を行った。SMC および血管内皮細胞 endothelial cells (EC) のアポトーシスに関して、TUNEL を用いた蛍光二重染色もしくは *En face* 蛍光二重染色も施行した。mRNA の抽出: 結紮後2週の左総頸動脈を用いて cDNA を作成した後、real time RT-PCR を施行し、種々の炎症性サイトカインや、SMC の遊走因子のひとつである platelet-derived growth factor (PDGF)-BB などの、mRNA レベルでの発現を検討した。

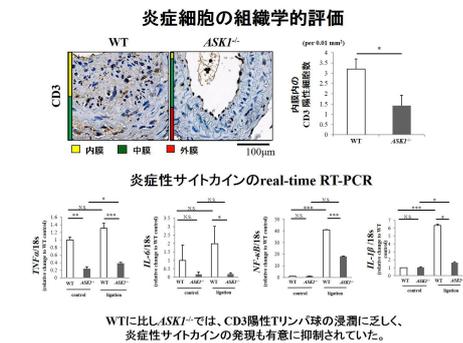
血清の採取: ELISA を施行して PDGF-BB を測定した。(2) 骨髄移植モデル: 9 Gy の X 線を照射した WT に、WT および ASK1<sup>-/-</sup> の骨髄を各々注射移植後5週で、同様の総頸動脈結紮モデルを作製し、組織学的観察を施行した。

4. 研究成果

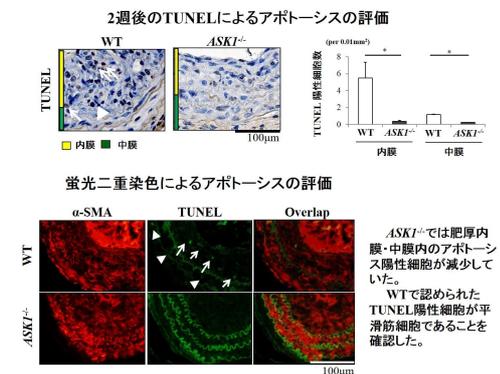
(1) 結紮後3週の左総頸動脈において、ASK1<sup>-/-</sup> では WT と比し、新生内膜肥厚が有意に抑制されており、肥厚内膜内の  $\alpha$ -SMA 陽性 SMC の単位面積当たりの数の減少も見られた。



(2) ASK1<sup>-/-</sup> では肥厚内膜内微小血管が有意に減少しており、浸潤する CD3 陽性 T リンパ球の減少も観察された。更に、複数の炎症性サイトカインの発現も減少していた。

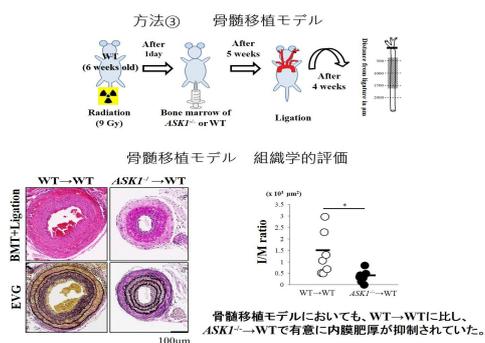


(3) ASK1<sup>-/-</sup> では、肥厚内膜内および中膜内 SMC のアポトーシスが有意に抑制されていた。加えて CD31 陽性 EC のアポトーシスも抑制されており、CD54/CD106 といった EC 由来の接着因子の発現も有意に抑制されていた。



(4) ASK1<sup>-/-</sup> と WT の肥厚内膜内における SMC の細胞増殖能(ki-67 or BrdU 染色陽性率)に有意な差は見られず、ASK1<sup>-/-</sup>において PDGF-BB の発現が有意に減少していた。ASK1<sup>-/-</sup>では、電子顕微鏡下の観察

で、肥厚内膜内 SMC の分泌型への脱分化は明らかでなく、Masson's trichrome 染色において、肥厚内膜内の細胞外基質の有意な減少が観察された。骨髄移植モデルにおいても、ASK1<sup>-/-</sup> donor 群では WT donor 群に比し、新生内膜肥厚が有意に抑制されており、非骨髄移植群の結果を支持する結果であった。

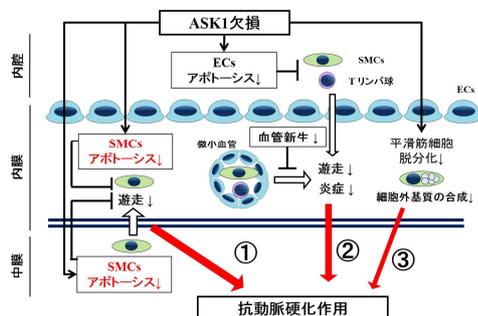


### 【考察および結論】

血管障害モデルでの血管再構築において、ASK1 の knockout により新生内膜肥厚が有意に抑制されることが確認された。加えて骨髄移植モデルにおいても非骨髄移植モデルの結果を支持したことから、肥厚内膜内の -SMA 陽性細胞には、中膜由来の SMC だけでなく、遊走した骨髄由来の SMC 前駆細胞も含まれる可能性が示唆された。ASK1 の欠損が、anti-atherogenic に作用する機序として、肥厚内膜内および中膜内の SMC のアポトーシス抑制による、中膜由来 SMC の遊走の抑制、

EC のアポトーシス抑制、および肥厚内膜内微小血管の減少による、骨髄由来 SMC 前駆細胞の遊走の抑制や、炎症細胞の新生内膜内への浸潤および炎症性サイトカイン分泌の抑制、 SMC 数の減少だけでなく、SMC 脱分化の抑制による、肥厚内膜内の細胞外基質の減少、等の経路が少なくとも考えられた。

ASK1欠損による抗動脈硬化作用機序 (schema)



我々は ASK1<sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup> を用いた高コレステロール血症モデルにおいて、安定プラーク形成に傾く可能性を見出し、今回 ASK1<sup>-/-</sup> を用いた血管障害モデルでの血管再構築において、新生内膜肥厚の減少だけでなく、肥厚内膜内の新生血管の有意な減少も認め、ASK1 knockout が安定プラーク形成に寄与する可能性を見出した。ASK1 signaling の阻止は、粥腫安定化や angioplasty 後の再狭窄の抑制に有効であるかもしれない。

### 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 2 件)

Noguchi H, Yamada S, Nabeshima A, Guo X, Tanimoto A, Wang KY, Kitada S, Tasaki T, Takama T, Shimajiri S, Horlad H, Komohara Y, Izumi H, Kohno K, Ichijo H, Sasaguri Y.: Depletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 prevents bile duct ligation-induced necro-inflammation and subsequent peribiliary fibrosis. Am J Pathol 184(3): 644-661, 2014. 査読有り [IF = 4.60]

Tasaki T, Yamada S, Guo X, Tanimoto A, Wang KY, Nabeshima A, Kitada S, Noguchi H, Kimura S, Shimajiri S, Kohno K, Ichijo H, Sasaguri Y. Apoptosis signal-regulating kinase 1 deficiency attenuates vascular injury-induced neointimal hyperplasia by suppressing apoptosis in smooth muscle cells. Am J Pathol 182(2): 597-609, 2013. 査読有り [IF = 4.60]

〔学会発表〕(計 4 件)

野口紘嗣、「ASK1 欠損は胆管結紮による肝壊死-炎症および胆管周囲線維化を抑制する」第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 ~ 26 日、広島国際会議場、広島県広島市

山田壮亮、「動脈硬化におけるアポトーシ

スの役割～ASK1 knockout mouse を用いて～」  
第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6～  
8 日、ロイトン札幌、北海道札幌市

田崎貴嗣、「ASK1 の欠損は平滑筋細胞のア  
ポトーシスの抑制によって血管障害モデル  
における内膜肥厚を減弱させる」第 102 回  
日本病理学会総会、2013 年 6 月 6～8 日、ロ  
イトン札幌、北海道札幌市

野口紘嗣、「ASK1 knockout によるアポトー  
シスの抑制は、肝障害及び肝線維化の進行を  
抑える」第 102 回日本病理学会総会、2013 年  
6 月 6～8 日、ロイトン札幌、北海道札幌市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 壮亮 (YAMADA Sohsuke)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90525453

(2)研究協力者

田崎 貴嗣 (TASAKI Takashi)

野口 紘嗣 (NOGUCHI Hiroto)