

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791376

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤におけるカルパインの分子機構の解明

研究課題名(英文) The role of calpain on the development of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

内田 治仁 (Uchida, Haruhito)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00550857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：高脂血症モデルマウスを用いて、腹部大動脈瘤の発症・進展におけるCalpainの果たす役割に関して検討を行った。まずCalpain阻害薬を用いた検討では、腹部大動脈瘤の発症・進展が抑制された。一方でCalpain-1ノックアウトマウスを用いた検討では、腹部大動脈瘤の発症・進展が抑制されなかった。以上より、Calpainが腹部大動脈瘤の発症に関与していることが明らかとなったが、Calpainのどのアイソフォームが重要であるかに関してはまだわかっていない。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of calpain on the development of abdominal aortic aneurysm using AngII-infused apolipoprotein E deficient (apoE^{-/-}) mice model. First, a calpain inhibitor significantly attenuated the formation of abdominal aortic aneurysm. On the other hand, calpain-1 deficiency in apoE^{-/-} mice had no effect on the development of abdominal aortic aneurysm. Therefore, we found the significance of calpain on the development of abdominal aortic aneurysm however, it still remains unknown which isoform of calpain is important.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学 大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤（および解離）は、わが国において死因の第 14 位にランクされる重要な疾患であるにもかかわらず、その詳細な発症・進展のメカニズムにはいまだに不明な点が多く、さらにその治療法も外科的な治療に限局されている。現在のところ腹部大動脈瘤の病変組織においてはマクロファージなどの炎症細胞の集簇が認められ、これらの細胞の腹部大動脈瘤発症・進展への関与が強く示唆されているものの詳細はまったく不明である。最近、Calpain という、カルシウム依存性システインプロテアーゼがアルツハイマー病、糖尿病などの病気に関係しているということが報告されてきた。そこで我々は、今までの研究や報告により、Calpain がマクロファージなどの炎症細胞の浸潤や NF- κ B など炎症を制御し、それらによる炎症を介して腹部大動脈瘤の発症・進展に関与しているのではないかという仮説にいたった。

2. 研究の目的

腹部大動脈瘤における Calpain の発現の検討、

Calpain-1 ノックアウトマウスの腹部大動脈瘤発症・進展に対する影響の検討、

Calpain 阻害薬の腹部大動脈瘤発症・進展に対する影響の検討、

Calpain による炎症制御機構およびそれによる細胞外基質の調節機構の検討、
を行うことにより、腹部大動脈瘤における Calpain の重要性と分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ApoE ノックアウトマウス（高脂血症モデルマウス）へ AngII（1,000ng/kg/min）を浸透圧ポンプを用いて 4 週間持続投与し、腹部大動脈瘤を作成する。腹部大動脈における Calpain-1 および Calpain-2 の発現、また Calpain が主に作用する基質の Spectrin、さらに Cathepsin B や proteasome などのプロテアーゼの活性に与える影響を、腹部大動脈における組織学的な検討に加えて、mRNA 定量やタンパク定量、ELISA 法などにて大動脈瘤のないコントロール群と比較検討する。

Calpain-1 / ApoE ダブルノックアウトおよび ApoE ノックアウトマウスへ AngII（1,000ng/kg/min）を 4 週間持続投与し、腹部大動脈瘤発症・進展への影響を検討する。腹部大動脈瘤の形態学的な検討、および免疫染色法による組織学的な検討に加えて、炎症性サイトカインや NF- κ B シグナルの

mRNA 定量やタンパク定量、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の定量、プロテアーゼ活性の定量、NF- κ B のゲルシフトアッセイなどを行う。

ApoE ノックアウトマウスに AngII（1,000ng/kg/min）を投与すると同時に Calpain 阻害薬および Vehicle を 4 週間持続投与し、腹部大動脈瘤発症・進展への影響を検討する。腹部大動脈瘤の形態学的な検討、および免疫染色法による組織学的な検討に加えて、炎症性サイトカインや NF- κ B シグナルの mRNA 定量やタンパク定量、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の定量、プロテアーゼ活性の定量、NF- κ B のゲルシフトアッセイなどを行う。

マウスの腹腔にチオグリコレートを注入、腹膜炎を惹起したのち腹腔内マクロファージを回収し、Calpain 阻害薬による炎症の制御を集簇するマクロファージの数、MCP-1 など炎症性サイトカインの mRNA 定量や ELISA を行う。

4. 研究成果

AngII を持続投与した結果腹部大動脈の組織においては、Calpain-1 の発現は亢進するが Calpain-2 は不変であった。Spectrin、Cathepsin B や proteasome などの活性は亢進した。

Calpain-1 ダブルノックアウトマウスを用いた検討では、予想に反して腹部大動脈瘤の発症抑制は認められなかった。MMP や炎症性サイトカインなどへの影響も認められなかった。

Calpain 阻害薬を用いた検討では、腹部大動脈瘤の発症・進展が抑制された。MMP や炎症性サイトカインなどの発現も抑制され、これらは Calpain 阻害薬によるものと考えられた。

Calpain 阻害薬を用いたマウスの腹腔内に炎症を惹起したところ、コントロールと比べてマクロファージの集簇は抑制され、それらの MCP-1 mRNA 発現や MCP-1 の分泌は抑制されていた。

以上より、Calpain が腹部大動脈瘤の発症に関与しているが、Calpain-1 を介していないことが明らかになった。Calpain のどのアイソフォームが重要であるかに関してはまだわかっていない。

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)

Subramanian V, Moorlegghen JJ, Balakrishnan A, Howatt DA, Chishti AH, Uchida HA. Calpain-2 compensation promotes angiotensin II-induced ascending and abdominal aortic aneurysms in calpain-1 deficient mice. PLoS One、査読有、8巻、2013、E77214、DOI: 10.1371/journal.pone.0072214

Subramanian V, Uchida HA, Ijaz T, Moorlegghen JJ, Howatt DA, Balakrishnan A. Calpain inhibition attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. J Cardiovasc Pharmacol、査読有、59巻、2012、66-76、DOI: 10.1097/FJC.0b013e318235d5ea

〔学会発表〕(計 6件)

内田治仁

腹部大動脈瘤の発症・進展におけるカルパイン-1および-2の役割の検討
第6回大動脈分子病態研究会、2013年8月22日、久留米市

Haruhito A. Uchida, Hatsuho Uchida, Ryoko Umebayashi, Kenichi Shikata, and Hirofumi Makino. Edaravone Attenuates Angiotensin II-induced Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysms in Apolipoprotein E Deficient Mice. European Atherosclerosis Society Congress, 2013/06/02, Lyon, France

Venkateswaran Subramanian, Jessica J. Moorlegghen, Anju Balakrishnan, Deborah A. Howatt, Athar H. Chishti, Haruhito A. Uchida. Angiotensin II Promotes Ascending Aortic Aneurysms via Calpain Mediated Filamin A Fragmentation in LDL Receptor Deficient Mice. ATVB, 2013/05/02, Florida, USA

Ryoko Umebayashi, Haruhito A. Uchida, Hirofumi Makino, Cilostazol Attenuates Angiotensin II-induced Abdominal Aortic Aneurysms Thorough Anti-inflammatory Effect in Apolipoprotein E Deficient Mice.

ATVB, 2013/05/02, Florida, USA

内田治仁

腹部大動脈瘤におけるカルパインの役割の検討

第5回大動脈瘤分子病態研究会、2012年8月30日、久留米市

Ryoko Umebayashi, Haruhito A. Uchida, Hirofumi Makino, Cilostazol Attenuates Angiotensin II-induced Abdominal Aortic Aneurysms in Apolipoprotein E Deficient Mice. ATVB, 2012/04/18, Chicago, USA

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 治仁 (Uchida Haruhito)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
助教

研究者番号：00550857

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：