

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 1 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461130

研究課題名(和文) 動脈硬化の分子機序に基づいた動脈瘤形成機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for arteriosclerosis and aortic aneurysm

研究代表者

吉栖 正生 (Yoshizumi, Masao)

広島大学・医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号：20282626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、塩化カルシウム局所投与法によるマウスの大動脈瘤形成モデルにおいて、Osteoprotegerin (OPG) 遺伝子欠失によって動脈瘤の形成が著しく増悪し、塩化カルシウム局所投与後6週後には、中膜の弾性線維が完全に崩壊することを見いだした。野生型マウスにおいて大動脈瘤の形成にともなってOPG 遺伝子発現が増大する所見と合わせて、OPG が瘤形成に抑制的に作用している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated the possible involvement of Osteoprotegerin (OPG) in the prevention of AAAs through inhibition of Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). After the induction of AAA by CaCl₂ treatment, diameters of aorta were significantly increased with destruction of elastic fibers in the media in Opg knockout (KO) mice, as compared to wild-type mice. Moreover, up-regulation of TRAIL expression was observed in the media by immunohistochemical assay. In smooth muscle cells (SMCs) culture system, both the TRAIL-induced expression of matrix metalloproteinase-9 and the chemoattractive effect of TRAIL on SMCs were inhibited by OPG. These data suggest that Opg may play a protective role in the development of AAA through its antagonistic effect on Trail.

研究分野：循環器病学

キーワード：大動脈瘤 Osteoprotegerin

1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤は、大動脈壁が何らかの原因で破壊され、その一部が脆弱化したために血管が異常に拡張した状態となる病変である。先天性動脈壁形成不全や動脈炎など、腹部大動脈瘤発症に対する遺伝的素因や炎症性の病因が報告されているが、最近では、そのほとんどが動脈硬化症に起因するとされ、動脈硬化症を悪化させる条件である喫煙や飲酒、高血圧などの生活習慣病の増加に伴って、腹部大動脈瘤の罹患率も増加する傾向にある、現代病とも言える疾患である。動脈瘤は時間経過とともに拡張し、その破裂は突然死の原因の一つとなる。

大動脈壁は、内膜、中膜、外膜の三層構造で、特に中膜はエラスチンを主な構成成分とする弾性線維と、それに挟まれる平滑筋細胞と膠原繊維が交互に折り重なった層構造をとることによって、弾性に富み、血圧に耐えるだけではなく、その平準化に寄与している。腹部大動脈瘤では、この中膜の層構造が崩壊し、崩壊した領域にマクロファージなどが浸潤して、炎症が引き起こされることが明らかにされている。しかしながら、層構造崩壊のきっかけとなる初期病変は何か、マクロファージがいつ浸潤し、その病態に於ける役割は何かなど、大動脈瘤の発症機序は未だ明らかにされていない。

骨代謝関連因子として知られる *Osteoprotegerin* (*Opg*) は、骨芽細胞で産生され分泌されるサイトカインとして同定され、破骨前駆細胞に発現する Receptor activator of nuclear factor- κ B (Rank) 受容体の活性化に必要な Receptor activator of nuclear factor- κ B Ligand (RankL) と結合し、競合することによって Rank 受容体の活性化を阻害し、破骨細胞への分化を抑制する。*Opg* は、骨芽細胞以外に血管平滑筋細胞に発現することから、我々は、*Opg* 遺伝子欠損 (KO) マウスに高リン酸食餌および VitminD を投与し、動脈を構成する中膜に石灰化が頻出することを見いだした。一方、山口大 (現・久留米大) の青木らは、塩化カルシウム局所投与による大動脈瘤作製モデルを作出し、瘤形成における JUN kinase の関与を見いだした。

動脈瘤形成の要因として動脈硬化が示唆されていること、並びに、血管の石灰化が動脈硬化の一つの表現系であることから、この腹部大動脈モデルを *Opg* KO マウスに適用し、動脈瘤形成への効果を検討した。その結果、腹部大動脈に巨大な大動脈瘤が形成されることを見いだした (図1)。この巨大瘤の組織では、中膜の弾性線維がほとんど消失し、さらに著明な血管石灰化をともなっていたことから、動脈硬化を主因とするヒトの腹部大動脈瘤に類似していると考えられた。以上より、この巨大瘤形成は、動脈瘤の発症機序を明らかにするための良いモデルとなると考えられる。

近年、 ω -3系統の多価不飽和脂肪酸の一種である Eicosapentaenoic acid (EPA) は、疫学調査において動脈硬化抑制の有用性が確認されていること、またハイリスクの動脈硬化性疾患を持つ患者において二次予防効果が報告されたことから、我々は腹部大動脈モデルを *Opg* KO マウスに適用した場合にみられる巨大動脈瘤が食餌中の EPA によって抑制されるか否かを検討したところ、顕著にその抑制効果が認められた (図1)。

2. 研究の目的

大動脈瘤等の大動脈疾患は、近年増加傾向にある。動脈硬化との強い関連が指摘されているが、その発症機序は明らかにされていない。我々は、*Osteoprotegerin* (*Opg*) のノックアウト (KO) マウスに対して、塩化カルシウム局所投与による腹部大動脈瘤モデルを適用した結果、コントロールに対して大動脈瘤形成が増悪されること、さらに Eicosapentaenoic acid (EPA) を先行して食餌させた場合、その病変が改善されることを見いだした。本研究では、*Opg* による腹部大動脈瘤発症抑制機序の解析を通じて、腹部大動脈瘤発症の分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、動脈硬化と密接に関連する *Opg* KO マウス・腹部大動脈瘤モデルを用いて、動脈硬化性疾患の治療薬である EPA の効果を検討することによって、動脈硬化の分子機序に基づいた腹部大動脈瘤形成の分子機構を明らかにすることを目的とする。この目的を達成するための目標を以下に示す。

1. 大動脈瘤形成の時間経過を追った組織学的な解析

塩化カルシウム局所投与による腹部大動脈瘤病態モデルにおいて中膜の弾性線維の崩壊がいつどのように起るのか、いつマクロファージが浸潤するのか、石灰化はいつから起るのかなど、腹部大動脈瘤病態の経時的变化を明らかにする。

2. 液性因子 *Opg* を介した抑制メカニズムの解析

Opg が結合する因子として、RankL の他に Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Trail) もあり、それを含めた *Opg* の大動脈瘤形成に於ける抑制効果のシグナル系を同定し、そのメカニズムを解析する。

3. EPA の *Opg* に対する効果の検討

Opg 欠損による巨大大動脈瘤形成に対する EPA の抑制効果を詳細に解析する。その結果に基づき、*Opg* による動脈瘤形成抑制作用のメカニズムを解明する。

4. 研究成果

(A) EPA は *Opg*-KO マウスに於ける AAA の増悪効果を減弱させる

EPA が *Opg*-KO マウスに於ける AAA の形成を抑制するかどうか確認するために、塩化カルシウム局所投与による腹部大動脈瘤病態 (AAA) モデルを *Opg*-KO マウスに適用した系において、EPA を 2 週間先行して食餌させた場合の動脈径を正常マウスと比較した。正常マウスにおいては、EPA の有無に関わらず AAA 作成後一週間で動脈径が増大しその後維持された。これに対し、*Opg*-KO マウスでは、通常食餌の場合一週間後も継続して動脈径が増大するが、EPA 添加した場合は、一週間後の増大が抑制された。大動脈の切片を作製し、HE 染色してその組織変化を比較したところ、正常マウスにおいては、EPA の有無に関わらず認められる中膜の有為な菲薄化することが認められた。さらに、EVG 染色によって弾性線維の状態変化を検討したところ、通常食で認められた弾性線維の崩壊が抑制されることが明らかとなった。

これまで *Opg*-KO マウスでは、腹部大動脈瘤の血管周囲の平滑筋細胞において、*Opg* が decoy 受容体と働きその機能を抑制することで知られる TNF-related apoptosis inducing ligand (Trail)、Trail によって活性化される JUN リン酸化酵素 (JNK) 並びに、エラスチン消化酵素である *Mmp-9* の発現が上昇することが、見出されている。EPA の食餌によってこれらの発現が減少するか否か免疫染色法で検討したところ、それらの発現が顕著に減少することを見いだした。それらの結果から、*Opg*-KO マウスでは、Trail の機能抑制がかからず、Trail によって活性化された JNK シグナル経路によって誘導される *Mmp-9* の発現増加によって弾性線維の状態変化が引き起こされ、この活性化を EPA が抑制すると予想された。

(B) EPA は *Opg*-KO マウスに於ける AAA の増悪効果を減弱させる

EPA が *Opg*-KO マウスで見られる動脈瘤形成の増悪効果に対して減弱する分子機構について検討した。最近、EPA が直接結合する受容体として GPR-120/FFAR-4 が発見された。そこで、EPA がリガンドとして働き、それによって活性化されるシグナルカスケードの効果によって、*Opg*-KO マウスで見られる動脈瘤形成の増悪効果が減弱される可能性を考えた。

まず、血管平滑筋に GPR-120/FFAR-4 が発現するか否かを免疫組織学的手法並びに RT-PCR 法によって解析した。その結果、EPA の受容体が腹部大動脈の中膜に存在する血管平滑筋細胞に発現すること、その発現が EPA の食餌によって上昇することなどが観察された。

次に血管平滑筋培養系において、EPA 並びに EPA-受容体の活性化型リガンドを添加した

場合、Trail の添加による JNK の活性化並びに *Mmp9* の発現上昇に対する抑制が見られるかを Western blot 法並びに qRT-PCR 法で検討した。その結果、EPA によって、Trail の添加による JNK の活性化並びに *Mmp9* の発現上昇に対する抑制が認められた。さらに、EPA-受容体の siRNA を添加すると、これらの EPA による抑制効果が減弱することを認めた。これらの結果から、EPA が動脈瘤に対して持つ減弱効果が EPA-受容体を介した効果であることが示唆された。

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 8 件)

- (1) *Dazl* is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. Kato Y, Katsuki T, Kokubo H, Masuda A, Saga Y. *Nat Commun.* 2016 Apr 13; 7:11272. doi: 10.1038/ncomms11272.
- (2) The Transcription Factor Hand1 Is Involved In Runx2-Ihh-Regulated Endochondral Ossification. Laurie LE, Kokubo H, Nakamura M, Saga Y, Funato N. *PLoS One.* 2016 Feb 26; 11(2):e0150263. doi: 10.1371/journal.pone.0150263.
- (3) Osteoprotegerin Prevents Development of Abdominal Aortic Aneurysms. Bumdelger B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Yoshimura K, Aoki H, Orita Y, Ishida T, Ohtaki M, Nagao M, Ishida M, Yoshizumi M. *PLoS One.* 2016 Jan 19; 11(1):e0147088. doi: 10.1371/journal.pone.0147088.
- (4) Evidence of Notch-Hesr-Nrf2 Axis in Muscle Stem Cells, but Absence of Nrf2 Has No Effect on Their Quiescent and Undifferentiated State. Yamaguchi M, Murakami S, Yoneda T, Nakamura M, Zhang L, Uezumi A, Fukuda S, Kokubo H, Tsujikawa K, Fukuda S. *PLoS One.* 2015 Sep 29; 10(9): e0138517. doi: 10.1371/journal.pone.0138517.
- (5) Role of DNA damage in cardiovascular disease. Ishida T, Ishida M, Tashiro S, Yoshizumi M, Kihara Y. *Circ J.* 2014; 78(1): 42-50. Review.
- (6) Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. Ishida M, Ishida T, Tashiro S, Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. *PLoS One.* 2014 Aug 5; 9(8): e103993. doi: 10.1371/journal.pone.0103993.
- (7) Enhanced prepulse inhibition and low sensitivity to a dopamine agonist in HESR1 knockout mice. Kanno K, Kokubo H, Takahashi A, Koide T, Ishiura S. *J Neurosci*

Res. 2014 Mar; 92(3): 287-97. doi: 10.1002/jnr.23291.

- (8) Induction of Timp1 in smooth muscle cells during development of abdominal aortic aneurysms. Bumdelger B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Ishida M, Ishida T, Yoshizumi M. Hiroshima J Med Sci. 2013 Sep;62(3):63-7.

〔学会発表〕(計8件)

- (1) Masayuki Fujii, Akane Sakaguchi, Masao yoshizumi, Yumiko saga, and Hiroki Kokubo Identification of early progenitors for the sinus venosus in heart development 日本分子生物学会 2015年12月1~4日 横浜
- (2) 鎌田諒、小久保博樹、Batmunkh Bumdelger、吉栖正生 腹部大動脈瘤の弾性繊維変性における骨形成因子の役割 循環器学会中国地方会 2015年11月28日 広島
- (3) 鎌田諒、小久保博樹、Batmunkh Bumdelger、吉栖正生 腹部大動脈瘤に於ける *Osteoprotegerin* の役割 脈管学会 2015年10月29~31日 東京
- (4) 鎌田諒、小久保博樹、Batmunkh Bumdelger、吉栖正生 腹部大動脈瘤形成における骨形成因子の抑制的役割 第8回 大動脈分子病態研究会 2015年8月20日 久留米
- (5) Hiroki Kokubo, Batmunkh Bumdelger, Ryo Kamata, and Masao Yoshizumi 大動脈瘤形成における血管平滑筋細胞による *TIMP1* 遺伝子の発現誘導 脈管学会 2014年10月30日から11月1日 倉敷
- (6) 小久保博樹 心血管系における Hes2 の役割 遺伝医学研究会 2014年7月25日 東京
- (7) Batmunkh Bumdelger, Hiroki Kokubo, Ryo Kamata, Masayuki Fujii, Hiroki Aoki, Mari Ishida, Takafumi Ishida and Masao Yoshizumi Induction of *Timp1* in Smooth Muscle Cells during Development of Abdominal Aortic Aneurysms. IVBM 国際血管学会 2014年4月14~17日 京都
- (8) 小久保博樹、Batmunkh Bumdelger、鎌田諒、吉栖正生 *Osteoprotegerin* の大動脈瘤形成に果たす役割 第6回 大動脈分子病態研究会 2013年8月23日 久留米

〔図書〕(計2件)

- (1) マウス実験の基礎知識 第2版 小出剛編 オーム社 2013年 **第13章 「トランスジェニックマウスを作製しよう」** P171-180, 第14章「ノックアウトマウスを作製しよう」P181-196 **執筆担当 小久保博樹**
- (2) 遺伝子図鑑 国立遺伝学研究所「遺伝子図鑑」編集委員会編 悠書館 2013年 第二章 2-2 人間を構成する

器官(2)消化器系、循環器系 p28-29, 第六章 6-3 動物の発生を制御する遺伝子 p124-125 **執筆担当 小久保博樹**

〔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

広島大学・吉栖 正生 (Yoshizumi Masao)
大学院医歯薬保健学研究院(医)・教授
研究者番号: 20282626

(2)研究分担者

広島大学・小久保 博樹 (Kokubo Hiroki)
大学院医歯薬保健学研究院(医)・講師
研究者番号: 10270480

(3)連携研究者

()

研究者番号: