

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460432

研究課題名(和文) 動脈老化と大動脈解離症におけるタンパク質発現・翻訳後修飾解析と病理組織学的解析

研究課題名(英文) Proteomic and pathological analyses of arterial aging and aortic dissection, especially focused on expression and posttranslational modification of the proteins

研究代表者

沢辺 元司 (SAWABE, Motoji)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号：30196331

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)：加齢とともに血管平滑筋細胞の構成タンパクが変化し、血管機能を低下させると想定されている。本研究ではヒト大動脈中膜の加齢性変化をプロテオーム解析した。対象は高齢群、中年群、若年群の病理解剖大動脈サンプルである。プロテオーム解析は2D-DIGEおよびiTRAQ法を用いた。加齢に伴いアクチンファミリー、細胞外基質、抗酸化のタンパクに発現の変動を認めた。すなわちアクチンファミリータンパクではアクチンの減少および他のアクチン関連タンパクの増加を、また抗酸化タンパクおよび酸化マーカーの増加を高齢者に認めた。以上よりアクチンとアクチン関連タンパクのインバランスおよび抗酸化タンパク質の増加を高齢者に認めた。

研究成果の概要(英文)：Previous studies reported that several proteins produced in vascular smooth muscle cells altered with aging, resulting in the deterioration of vascular function. We performed a proteomic study on the human aortic media with chronological aging, using autopsy samples of the aortic media from elderly, middle-aged, and young subjects. Two proteomic approaches, 2D-DIGE and iTRAQ, were performed. Differentially expressed proteins with aging were categorized into three groups: actin family proteins, extracellular matrix proteins, and antioxidant proteins. A decrease in actin and increase in other actin-related proteins in elderly media were found. The immunohistochemical analysis showed that expressions of antioxidant proteins and oxidation stress-marker proteins were higher in the elderly than in the young. In conclusions, the imbalance between actin and actin-related proteins occur with human aortic aging, and antioxidant proteins were induced by elevations in oxidative stress with aging.

研究分野：人体病理学

キーワード：動脈 老化 プロテオーム 動脈解離症

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 動脈老化の研究動向

「人は血管と共に老いる」と言われ、加齢と共に動脈は老化し、硬くなる。広く動脈硬化と呼ばれるこの現象は病理学的には内膜を中心とした粥状硬化症と、中膜を中心とした「加齢性中膜変性硬化症」に分かれる。加齢性中膜変性硬化症では弾性動脈(大動脈、頸動脈)が拡張し、動脈壁が硬化する。その結果として、大動脈瘤、収縮期高血圧、うっ血性心不全、冠不全、大動脈弁逆流症などの高齢者に特有の病態を引き起こす。加齢性中膜変性硬化症の原因としては エラスチンの機械的疲弊(量の減少、断裂、架橋の減少)

エラスチン、コラーゲンの糖化・糖酸化、酸化脂質による細胞障害、D体アミノ酸の増加、中膜アミロイド中間物質である medin oligomer による細胞障害、などが想定されている。最近、海外では動脈老化について関心が高まっており、主に培養細胞、実験動物を対象として優れた業績が出つつある。

### (2) 大動脈解離の研究動向

大動脈解離は心タンポナーデ・縦隔出血を起こす致死性疾患である。多くの症例は孤発性であり原因や発生機序に関しては不明の点が多い。遺伝性動脈中膜変性症としては Marfan 症候群、Ehlers-Danlos 症候群(2型)などが知られており、原因となる遺伝子異常が同定されている。中膜平滑筋細胞の機能維持には、fibrillin 1, elastin, fibulin 5, emilin などの間質を構成する構造分子と共に TGF シグナルが重要とされており、これらの遺伝子異常が遺伝性中膜変性症を引き起こす。

### (3) 動脈老化・大動脈解離のプロテオーム解析

我々は平成 23~25 年度で基盤研究(C)「動脈老化と動脈中膜変性疾患(大動脈解離、脳動脈瘤、脳動脈解離)のプロテオーム解析」の補助を得て 2次元ディファレンスゲル電気

泳動を用いたプロテオーム解析を行い、タンパク質に加齢に伴う変動をいくつか同定した。海外では幾つかの研究機関でプロテオーム解析が進んでいるが、日本では癌研究以外の領域ではプロテオーム解析はほとんど応用されていない。

## 2. 研究の目的

動脈老化は高齢者の高血圧、うっ血性心不全、大動脈瘤の原因であり、大動脈解離症は循環器系致死性疾患である。動脈老化の分子機構は不明であり、非症候性大動脈解離症の原因は不明である。本研究の目的は大動脈中膜組織のプロテオーム解析により動脈老化、大動脈解離症のタンパク質発現、タンパク質翻訳後修飾の病態を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象

動脈老化研究に用いた症例は3群であり、高齢群が3例(平均年齢90歳)、中年群が5例(同57歳)、若年群が3例(同27歳)である。大動脈解離研究に用いた症例は年齢を調整した動脈解離群が5例、対照群が6例である。解剖時に胸部下行大動脈を採取し中膜組織のみを用いた。

### (2) iTRAQ 法によるプロテオーム解析

検体からタンパク質を抽出し、アセトン沈殿、還元、アルキル化、トリプシン消化しペプチドに分解する。これらのペプチドを、レポーター部分に安定同位体元素を持ち、質量分析で比較定量が可能な iTRAQ 試薬で標識する。それぞれ異なる分子量の iTRAQ 試薬で標識した若年群、中年群、高齢群を混合し、nano-LC/MALDI-TOF/TOF 5800 (KYA Tech./Sciex)にて分析する。解析ソフト ProteinPilot (Sciex)を用いて、iTRAQ 試薬レポーターイオンのシグナル強度比によるディファレンシャル解析とタンパク質の同定を同時に行い、動脈老化に特異的に変動する

タンパク質を明らかにする。

### (3) 免疫組織化学的検討

上記研究で変動の認められたタンパク質、修飾タンパク質については、組織標本切片上で免疫組織化学的方法により同定し病理組織学的に検討する。

### (4) 病態及び病因との関連性の検討

プロテオーム解析や免疫組織化学的解析により、動脈老化との関連性が示唆されたタンパク質について、正常ヒト大動脈血管平滑筋細胞を用いて、遺伝子改変を行い、病態及び病因との関連性について明らかにする。RNAi により発現を低下させたり、トランスフェクションにより強発現させたりすることにより、動脈老化において引き起こされる様々な細胞学的変化やタンパク質発現変化が生じるかどうかを調べる。

## 4. 研究成果

### (1) iTRAQ 法によるプロテオーム解析

iTRAQ 法を用いたプロテオーム解析により 1.5 倍以上の変動が見られたタンパク質について検討を行った。動脈老化では有意に増加したタンパク質は 30 であり、減少したタンパク質は 26 であった(表 1)。一方、大動脈解離では有意に増加したタンパク質は 20、減少したタンパク質は 12 であった。動脈老化では主に平滑筋収縮関連タンパク質のアクチンが減少し、アクチン結合タンパク質、トロポミオシン、ミオシンなどが増加、アクチンの脱重合関連タンパク質が減少することが明らかになった。細胞外基質タンパクとしては、プロテオグリカンの変化として、リンクタンパクの増加、ケラタン硫酸成分(ルミカン)の減少、ミクロフィブリル関連タンパクの減少、ヴィトロネクチンの増加を認めた。以前報告した蛍光二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)によるプロテオーム解析と比べると、

検出感度がよいため、タンパク質の検出数も変化したタンパク数も多かった。しかし、加齢に伴って変化したタンパク質のカテゴリーは同様であり(表 1)、アクチン、細胞外マトリクス、抗酸化酵素などの関連タンパク質が変動することが明らかになった。

表 1. 加齢に伴う大動脈中膜のプロテオーム解析結果

Protein Description	2D-DIGE	iTRAQ
Actin, actin related proteins and intermediate filament		
Actin, aortic smooth muscle	Down	Down
Myosin regulatory light chain 12A	Up	Up
Transgelin	Up	Up
Transgelin-2	Up	Up
Vimentin	Up	Up
Gelsolin	Up, Down	Down
Extracellular matrix and glycoproteins		
Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	Up	Up
Galectin-1	Up	Down
Lumican	Down	Down
Microfibril-associated glycoprotein 4	Down	Down
Vitronectin	Up	Up
Antioxidant proteins		
Peroxiredoxin-2	Down	Down
Thioredoxin	Up	Up

### (2) 酸化ストレス関連タンパク質の変動

酸化ストレス関連タンパク質である Extracellular SOD (EC-SOD), Glutathione S-transferase (GST), Thioredoxin (Trx)などが増加していた。ES-SOD, Trx, Peroxiredoxin 2 (Perx2)に関してはウェスタンブロット、免疫組織化学的検討により高齢者で発現が増加していた(図 1)。さらに、酸化ストレスマーカーである

8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), N-(Carboxymethyl)lysine (CML)の含量を免疫組織化学的に検討したところ、高齢者で増加していた(図 2)。以上より、高齢者では酸化ストレスの亢進によって抗酸化酵素やそれらの関連タンパク質が増加することが示唆された。

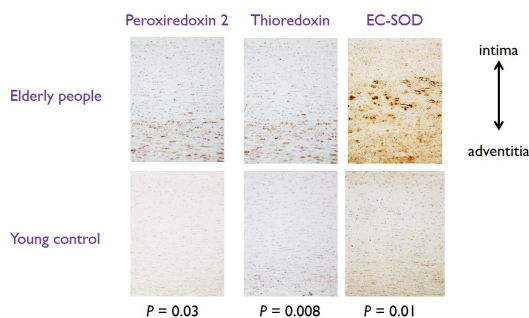


図 1 . 酸化ストレス関連タンパク質の加齢による変化

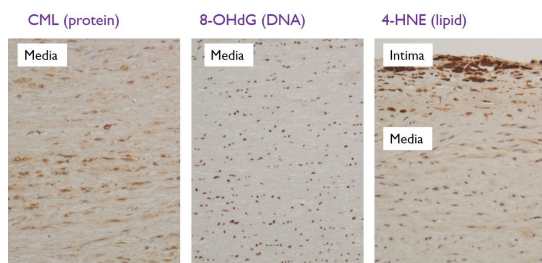


図 2 . 酸化ストレスマーカーの加齢による変化

### (3) ACTA2 の発現抑制実験

プロテオーム解析の結果を検証するため、特異的抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、超高齢において -アクチン (ACTA2)が減少し、アクチン関連タンパク質であるトランスゲリン 2 (TAGLN2)、ミオシン (MYL9)などが増加することが確認された。そこで、ACTA2 の減少とアクチン関連タンパク質の増加について関連性があるかどうかを調べるため、ヒト正常血管平滑筋細胞を用いた細胞培養系において ACTA2 の siRNA を行い、ACTA2 のノックダウンによる TAGLN2、MYL9、MYL12A の発現変化について調べた。タンパク質の検出 (WB) と

mRNA の検出 (quantitative RT-PCR) の両方について行ったが、どちらにおいても、アクチン関連タンパク質の有意な変動は認められなかった。この結果から、siRNA のような短期間 (72 時間) の ACTA2 ノックダウンにおいては、アクチン関連タンパク質の顕著な発現増加は認められないことが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Yamada Y, Sakuma J, Takeuchi I, Yasukochi Y, Kato K, Oguri M, Fujimaki T, Horibe H, Muramatsu M, Sawabe M, Fujiwara Y, Taniguchi Y, Obuchi S, Kawai H, Shinkai S, Mori S, Arai T, Tanaka M: Identification of EGFLAM, SPATC1L and RNASE13 as novel susceptibility loci for aortic aneurysm in Japanese individuals by exome-wide association studies. *Int J Mol Med* 査読あり 39: 1091-1100, 2017, 10.3892/ijmm.2017.2927

Yamada Y, Sakuma J, Takeuchi I, Yasukochi Y, Kato K, Oguri M, Fujimaki T, Horibe H, Muramatsu M, Sawabe M, Fujiwara Y, Taniguchi Y, Obuchi S, Kawai H, Shinkai S, Mori S, Arai T, Tanaka M: Identification of STXBP2 as a novel susceptibility locus for myocardial infarction in Japanese individuals by an exome-wide association study. *Oncotarget* 査読あり, 2017, 10.18632/oncotarget.16536

Miura Y, Endo T: Glycomics and glycoproteomics focused on aging and age-related diseases--Glycans as a potential biomarker for physiological alterations. *Biochim Biophys Acta* 査読あり 1860:1608-14, 2016, 10.1016/j.bbagen.2016.01.013

Zaw KT, Sato N, Ikeda S, Thu KS, Mieno MN, Arai T, Mori S, Furukawa T, Sasano T, Sawabe M, Tanaka M, Muramatsu M: Association of ZFH3 gene variation with atrial fibrillation, cerebral infarction, and lung thromboembolism: An autopsy study. J Cardiol 査読あり, 2016, 10.1016/j.jjcc.2016.11.005

Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Tamura N, Soejima Y, Sawabe M, Isobe M, Furukawa T: High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b. J Mol Cell Cardiol 査読あり 90: 38-46, 2016, 10.1016/j.yjmcc.2015.11.034

Maeda Y, Sato N, Naka-Mieno M, Mori S, Arai T, Tanaka M, Muramatsu M, Sawabe M: Association of non-synonymous variants in WIPF3 and LIPA genes with abdominal aortic aneurysm: an autopsy study. J Geriatr Cardiol 査読あり 13: 960-967, 2016, 10.11909/j.issn.1671-5411.2016.12.003

Miura Y, Hashii N, Tsumoto H, Takakura D, Ohta Y, Abe Y, Arai Y, Kawasaki N, Hirose N, Endo T, SONIC: Change in N-Glycosylation of plasma proteins in Japanese semisupercentenarians. PLoS One 査読あり 10:e0142645, 2015, 10.1371/journal.pone.0142645

Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Tamura N, Soejima Y, Sawabe M, Isobe M, Furukawa T: High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b. J Mol Cell Cardiol 査読あり 90: 38-46, 2015,

10.1016/j.yjmcc.2015.11.034

Sasaki T, Calkins H, Miller CF, Zviman MM, Zipunnikov V, Arai T, Sawabe M, Terashima M, Marine JE, Berger RD, Nazarian S, Zimmerman SL: New insight into scar-related ventricular tachycardia circuits in ischemic cardiomyopathy: Fat deposition after myocardial infarction on computed tomography--A pilot study. Heart Rhythm 査読あり 12: 1508-18, 2015, 10.1016/j.hrthm.2015.03.041

Mieno MN, Sawabe M, Tanaka N, Nakahara K, Hamamatsu A, Chida K, Sakurai U, Arai T, Harada K, Mori S, Inamatsu T, Ozawa T, Honma N, Aida J, Takubo K, Matsushita S: Significant association between hypolipoproteinemia(a) and lifetime risk of cancer: an autopsy study from a community-based Geriatric Hospital. Cancer Epidemiol 査読あり 38: 550-5, 2014, 10.1016/j.canep.2014.07.013

〔学会発表〕(計6件)

沢辺元司, 三浦ゆり, 津元裕樹, 岩本真知子, 副島友莉恵, 吉田祥子, 戸田年総, 新井富生, 濱松晶彦, 遠藤玉夫. ヒト大動脈老化のプロテオミクス解析: アクチン関連タンパク質の変動および抗酸化タンパク質の増加. 第49回日本動脈硬化学会総会 2017.07.06 グラントプリンスホテル広島(広島県広島市)

Sawabe M. Pathological and proteomic researches of arterial aging. The 48th annual meeting of Japan Atherosclerosis Society 2016.07.14-15 京王プラザホテル(東京都新宿区)

表谷 文美芳, 沢辺 元司. 大動脈平滑筋細胞 筋収縮タンパク質の加齢性変化. 第 47 回日本動脈硬化学会総会 2015.07.09 仙台国際センター (宮城県仙台市)

津元 裕樹, 岩本 真知子, 兼平 茜, 副島 友莉恵, 新井 富生, 濱松 晶彦, 遠藤 玉夫, 沢辺 元司, 三浦 ゆり. ヒト大動脈中膜の老化プロテオミクス. 第 38 回日本基礎老化学会大会 2015.06.13 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

三浦 ゆり, 岩本真知子, 兼平 茜, 津元裕樹, 副島友莉恵, 戸田年総, 森澤 拓, 新井富生, 濱松晶彦, 遠藤玉夫, 沢辺元司. ヒト大動脈老化のプロテオーム解析. 第 65 回日本電気泳動学会 2014.10.24-25 横浜情報文化センター (神奈川県横浜市)

三浦 ゆり, 岩本真知子, 津元裕樹, 副島友莉恵, 戸田年総, 森澤 拓, 新井富生, 濱松晶彦, 遠藤玉夫, 沢辺元司. ヒト大動脈解離症のプロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2014 年会 2014.7.17-18 つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

[その他]

ホームページ等

東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム プロテオーム研究

<http://proteome.tmig.or.jp/TMIG-PCC/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沢辺 元司(SAWABE, Motoji)  
東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科・教授  
研究者番号：30196331

### (2) 研究分担者

三浦 ゆり(MIURA, Yuri)  
東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長  
研究者番号：00216574

津元 裕樹(TSUMOTO, Hiroki)  
東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
研究者番号：00409385

副島 友莉恵(SOEJIMA, Yurie)  
東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科・助教  
研究者番号：60596964  
(平成 27-28 年度に研究分担者)