

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860580

研究課題名(和文)筋細胞特異的遺伝子MURCの腹部大動脈瘤モデルにおける機能解析

研究課題名(英文)MURC/Cavin-4 deficiency exacerbates abdominal aortic aneurysm

研究代表者

宮川 浩太郎 (Miyagawa, Kotaro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60725612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カベオラ関連タンパク質であるMURCを単離、同定し、大動脈瘤進展の関連について研究を行っている。MURC-KOマウスでは傍大動脈へのCaCl₂浸漬による腹部大動脈瘤モデルにおいて、WTマウスに比較して有意に腹部大動脈の外径、内径拡大を認め、より高度に中膜弾性線維の断裂を認めた。MURC-KOマウスの大動脈瘤モデルでは、WTマウスに比べて有意にJNKの活性が亢進していた。またApoE-KOとMURC-KOマウスの交配により作製したダブルノックアウトマウスでのアンジオテンシン 持続投与による大動脈瘤モデルでは、ApoE-KOマウス、MURC-KOマウスに比べて有意に腹部大動脈瘤の内径拡大を認めた。

研究成果の概要(英文)：We showed the role of MURC (muscle-restricted coiled-coil protein)/Cavin-4 in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and AAA development. Wild-type and MURC knockout (MURC^{-/-}) mice were subjected to periaortic application of CaCl₂ to induce AAA. Six weeks after CaCl₂ treatment, internal and external aortic diameters were significantly increased in MURC^{-/-} AAA compared with WT AAA, which was accompanied by increased fibrosis in the tunica media of MURC^{-/-} AAA. JNK and matrix metalloproteinase-2 activities were increased in MURC^{-/-} AAA compared with WT AAA. TNF α -induced JNK activation was enhanced in MURC-knockdown VSMCs compared with control VSMCs. Furthermore, WT, MURC^{-/-}, apolipoprotein E^{-/-} (ApoE^{-/-}), and MURC and ApoE double-knockout (MURC^{-/-}-ApoE^{-/-}) mice were subjected to angiotensin II infusion. Four weeks after angiotensin II infusion, the internal aortic diameter was significantly increased in MURC^{-/-}-ApoE^{-/-} mice compared with ApoE^{-/-} mice and MURC^{-/-} mice.

研究分野：循環器内科学

キーワード：腹部大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

(1) 米国では65歳以上の男性の6~9%に腹部大動脈瘤を認め、55歳以上の男性では死因の第10位となっている。外科的治療が適用できない場合、瘤破裂による死亡率は高率であり、効果的な非手術的治療はないのが現状である。大動脈瘤の瘤径が破裂を予測する主要な因子であるため、大動脈瘤の瘤径を縮小させる非手術的治療が、破裂のリスクを減少させる治療方針になると考えられる。大動脈瘤は血管平滑筋細胞や浸潤してきたマクロファージがMMP-9やMMP-2を放出する大動脈壁の動脈硬化性変化と慢性炎症が特徴となっている。また大動脈瘤にみられる慢性炎症では、TNF- α やIL-1、IL-6、INF- γ など様々な刺激が関連しているとされているが、これらの刺激の多くは血管平滑筋におけるJNKを活性化させている。大動脈瘤進展に関わる因子とその機序を解明することで、大動脈瘤の瘤径を縮小させる非手術的治療法が望まれている。

(2) カベオラは、50-100nmの細胞膜の小さな窪みであり、受容体やイオンチャンネルなど様々な蛋白が局在し、細胞情報伝達やエンドサイトーシス、脂質糖代謝などに関わり、細胞外からの細胞膜を介した情報応答に重要な役割を果たしていることが示されている。カベオラには caveolin と呼ばれるタンパク質が存在し、カベオラの形成や機能に重要な役割を担っていることが知られていたが、最近 caveolin 以外に cavin family 蛋白質 (PTRF/cavin-1, SDPR/cavin-2, SRBC/cavin-3) もまたカベオラの制御に重要であることが明らかとなってきた。我々は筋細胞に特異的に発現している MURC を単離、同定し、MURC が心不全や不整脈発症に関与していることを示したが、その後 MURC が cavin family に属し、カベオラに局在することが報告され、カベオラを介した作用が示唆されている。

(3) 血管平滑筋細胞の働きと動脈硬化性変化の進展について考える際に、血管平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖が挙げられる。血管平滑筋細胞の増殖と遊走は様々な刺激により惹起されるが、その過程でカベオラが重要な役割を果たしていることが分かっている。平滑筋細胞のカベオラ形成に必要な caveolin-1 を欠失させると、平滑筋細胞内の Rho/ROCK シグナルの活性化を介した細胞増殖と遊走の亢進が起こり、動脈硬化に保護的な作用を及ぼすとされている。大動脈瘤の病態は動脈壁の動脈硬化性変化と慢性炎症が特徴であり、MURC と同じくカベオラを構成する蛋白質である caveolin-1 でみられるように、MURC が血管平滑筋細胞の増殖、遊走に関与し、動脈硬化に作用を及ぼしている可能性が考えられた。しかし MURC と動脈硬化、大動脈瘤進展の関係については全く不明であ

る。そこで血管平滑筋細胞において MURC の knockdown を行ったところ、caveolin-1 欠失の時とは逆に、増殖、遊走能の抑制を認めた。MURC の欠失は、血管平滑筋細胞の増殖、遊走能の抑制を起こし、動脈壁の脆弱化を引き起こす可能性が考えられた。そしてそれにより動脈壁にかかる圧が増大し動脈瘤の進展をきたしているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

現在高齢者において腹部大動脈瘤は比較的良好にみられる疾患となってきている。しかしながら外科的治療が適用できない場合、瘤の拡大と破裂による死亡率は高率となる。非手術的治療が待望されているが、大動脈瘤の分子病態は未だ不明な点が多く、選択肢が少ない状況である。シグナル伝達に関わる受容体の多くは細胞膜上のカベオラに局在しており、筋特異的発現タンパクの MURC もカベオラ上に局在している。本研究の目的は、腹部大動脈瘤の非手術治療を視野に血管平滑筋細胞における MURC の機能を解析することにより、腹部大動脈瘤における発症、進展の機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 全身 MURC knockout (MURC^{-/-}) マウスを作製。腹部大動脈を後腹膜結合織から剥離し、CaCl₂ 溶液を大動脈周囲に浸漬させて腹部大動脈瘤モデルを作製し、6週後に評価を行った。血管内径は麻酔下でエコーを用いて測定し、血管外径は灌流固定後に大動脈を摘出し測定を行った。また ApoE knockout (ApoE^{-/-}) マウスと交配を行い、MURC と ApoE のダブルノックアウト (MURC^{-/-}ApoE^{-/-}) マウスを作製。24週齢のマウスにおいて、アンジオテンシンの持続投与による腹部大動脈瘤モデルを作製し、4週後にエコーを用いて血管内径の評価を行った。

(2) 組織学的検討として、腹部大動脈瘤モデルの大動脈組織は hematoxylin and eosin (HE) 染色、Elastica van Gieson (EVG) 染色、Masson's trichrome (MTC) 染色を行い、線維化や中膜の弾性線維断裂の評価を行った。また線維化の評価として elastin degradation grading を用いて4段階に分類し評価した。

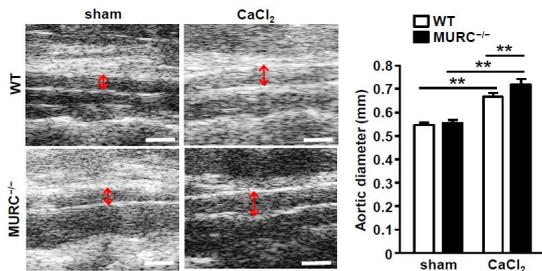
(3) 腹部大動脈瘤モデルの大動脈組織よりタンパクを抽出し、pJNK、JNK、GAPDH の Western blot を行い、活性の評価を行った。また Gelatin zymography も行い、Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の発現評価を行った。

(4) ラットの血管平滑筋細胞 (VSMC) にレトロウイルスを感染させることで、MURC overexpression と MURC knockdown を行った

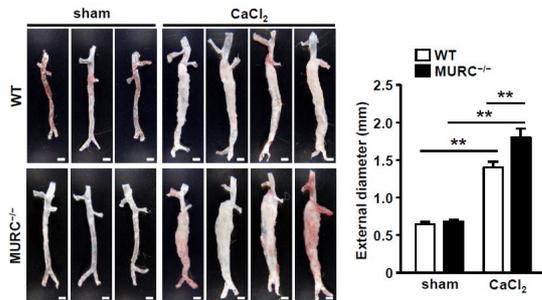
VSMC を作製。この VSMC に TNF もしくはアンジオテンシン による刺激を加え、タンパクを回収。Western blot と Gelatin zymography による評価を行った。

4. 研究成果

(1) Wild-type (WT) マウスと MURC^{-/-} マウスにおいて、0.5M CaCl₂ を大動脈周囲に浸漬させ腹部大動脈瘤モデルを作製。sham 群は CaCl₂ のかわりに生理食塩水を浸漬させて作製。6 週間後に血管内径をエコーで評価し、MURC^{-/-} マウスの CaCl₂ 浸漬大動脈瘤モデルでは WT に比べて有意に血管内径の拡大を認めた(図 1)。灌流固定後に血管外径を測定し、こちらも MURC^{-/-} マウスの CaCl₂ 浸漬大動脈瘤モデルでは WT に比べて有意な拡大を認めた(図 2)。

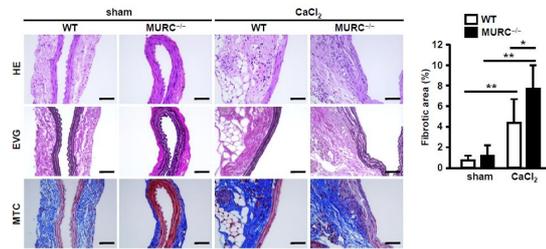


(図 1) 血管内径

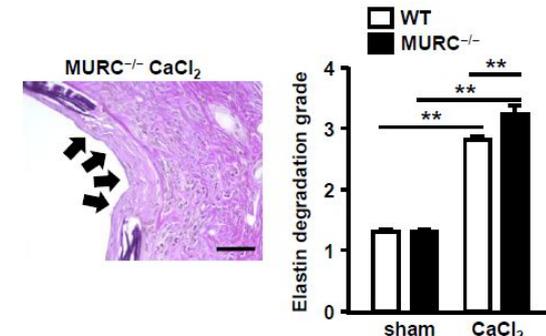


(図 2) 血管外径

(2) 組織学的分析として大動脈組織の HE 染色、EVG 染色、MTC 染色を行った。HE 染色と MTC 染色では、CaCl₂ 処置をした群では中膜への細胞浸潤が見られ、MURC^{-/-} マウスの CaCl₂ 浸漬大動脈瘤モデルでは WT に比べてより顕著に中膜の線維化を認めた(図 3)。さらに EVG 染色では、MURC^{-/-} マウスの CaCl₂ 浸漬大動脈瘤モデルにおいて弾性線維の断裂が認められた。腹部大動脈の拡大は弾性線維の退縮、破壊が関連している可能性が考えられ、EVG 染色での切片を用いて、弾性線維の退縮、破壊の程度を 4 段階に分けて評価を行い、MURC^{-/-} マウスの CaCl₂ 浸漬大動脈瘤モデルでは有意に高いグレードでの退縮、破壊が認められた(図 4)。

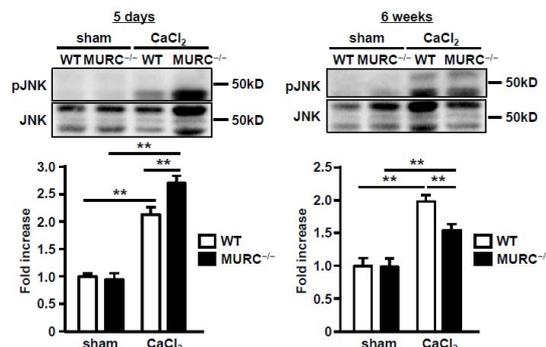


(図 3) HE 染色、EVG 染色、MTC 染色

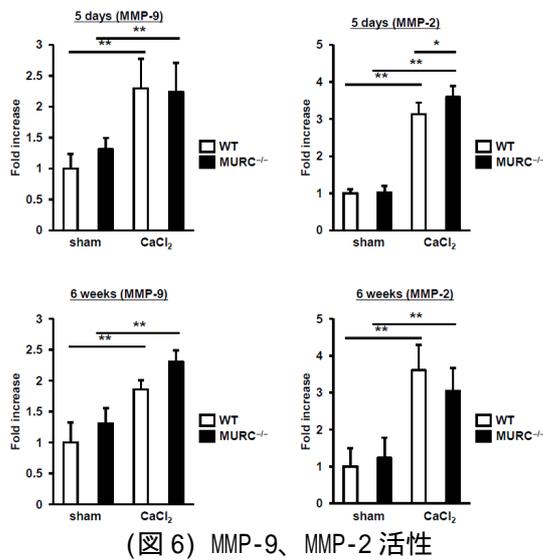


(図 4) Elastin degradation grading

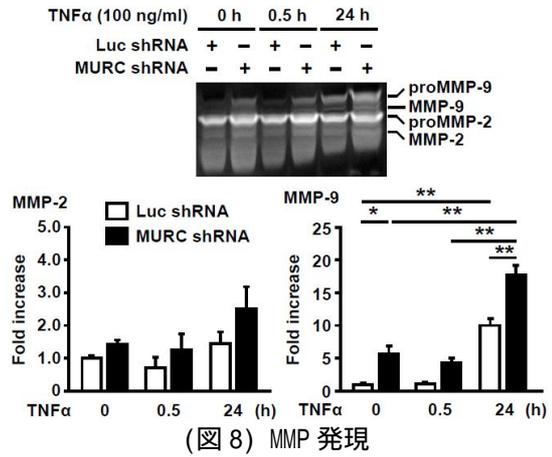
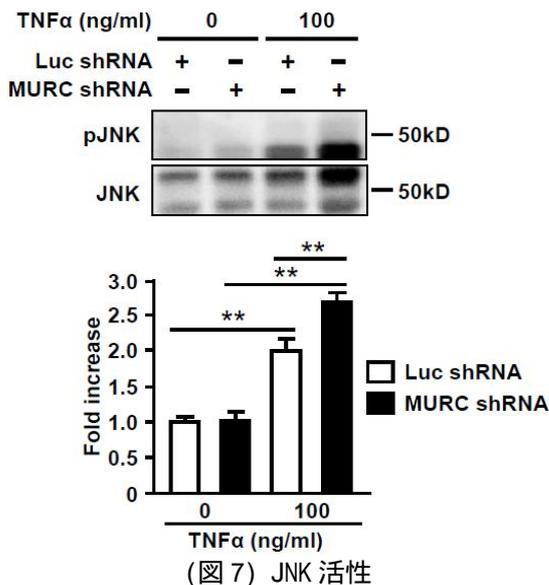
(3) WT マウスと MURC^{-/-} マウスの大動脈瘤モデルにおいて、CaCl₂ 処置後、5 日後と 6 週後の 2 つの時点において、Western blot による JNK 活性、Zelatin zymography による MMP-9、MMP-2 発現の評価を行った。CaCl₂ 処置群は sham 群に比べて、5 日後、6 週後ともに JNK 活性の亢進を認めた。また MURC^{-/-} マウスの CaCl₂ 浸漬大動脈瘤モデルでは、5 日後においては WT マウスに比べて、JNK 活性は亢進していたが、6 週後においては逆に JNK 活性は低下を認めた(図 5)。また MMP-9、MMP-2 とともに MURC^{-/-} マウスにおいて亢進傾向がみられ、5 日後の MMP-2 においては有意差を認めた(図 6)。このように大動脈瘤進展の早期の段階において MURC の欠失は JNK 活性、MMP-2 発現亢進を引き起こすと考えられた。



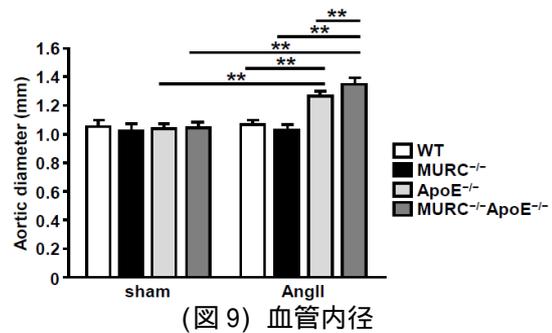
(図 5) JNK 活性



(4)MURC knockdown を行った VSMC において、JNK 活性と MMP 発現の評価を行った。VSMC は TNF 刺激を加えることで JNK の活性亢進を認めた。TNF 刺激を行った MURC knockdown VSMC では Control 群に比べて有意に JNK の活性亢進を認めた(図 7)。MMP-2 発現は、TNF 刺激の有無にかかわらず、MURC-knockdown VSMC でも Control 群でも有意な差は認めなかった。しかし TNF 刺激の有無に関わらず、MURC knockdown VSMC では Control 群に比べて MMP-9 の発現亢進を認めた(図 8)。



(5)24 週齢の WT マウス、MURC $^{-/-}$ マウス、ApoE $^{-/-}$ マウス、MURC $^{-/-}$ -ApoE $^{-/-}$ マウスにおいて、アンジオテンシン 持続投与を行い、腹部大動脈瘤モデルを作製。4 週間の持続投与後に、エコーで腹部大動脈血管内径の測定を行った。アンジオテンシン 持続投与を行った ApoE $^{-/-}$ マウスでは持続投与を行わなかった ApoE $^{-/-}$ マウスに比べて血管内径の拡大を認めた。アンジオテンシン 持続投与を行わなかった MURC $^{-/-}$ -ApoE $^{-/-}$ マウス、アンジオテンシン 持続投与を行った MURC $^{-/-}$ マウスでは、持続投与を行わなかった WT マウス、ApoE $^{-/-}$ マウス、MURC $^{-/-}$ マウスと血管内径に有意な差はみられなかった。一方で、アンジオテンシン 持続投与を行った MURC $^{-/-}$ -ApoE $^{-/-}$ マウスでは持続投与を行った ApoE $^{-/-}$ マウスに比べて有意な血管内径の拡大を認めた(図 9)。



(6)VSMC にアンジオテンシン 刺激を行い JNK 活性について評価を行った。アンジオテンシン 刺激により、MURC knockdown VSMC では Control 群に比べて用量依存性に JNK 活性の亢進を認めた。

(7) 考察

腹部大動脈瘤は慢性的な大動脈壁の炎症による変性を示し、結合組織の破壊、平滑筋細胞の減少がみられる。JNK は人の腹部大動脈壁で活性化しており、JNK の抑制は MMP の分泌を抑え、結合組織の破壊を阻止しうる。我々の研究ではマウスに CaCl₂ 処置をした大動脈瘤モデルの群では JNK と MMP 活性の亢進

を認めた。MURC-/-マウスの CaCl₂ 浸漬大動脈瘤モデルでは WT 群と比べて、処置後 5 日後の時点では JNK、MMP-2 の活性亢進を認めしたが、逆に 6 週後の時点では JNK、MMP-2 活性は抑制されていた。これらは MURC の欠失が大動脈瘤進展の早期に強く関わっていることを示唆している。

アンジオテンシン 持続投与による腹部大動脈瘤モデルでは、中膜の変性や細胞外組織の錯綜、白血球・マクロファージの浸潤、血栓形成、動脈硬化性変化といった人の腹部大動脈瘤にみられるのと同様の特徴が認められる。ApoE-/-マウスでは MURC も欠失させることで、アンジオテンシン 持続投与による腹部大動脈瘤モデルでの血管径増大を来しており、この結果からも、やはり MURC が腹部大動脈瘤の進展に重要な分子であることが示唆される。

MURC は筋特異的に発現しているタンパクであり、大動脈においては血管平滑筋細胞のみに発現している。JNK 活性や MMP 活性の亢進は動脈瘤周囲のマクロファージの活性化にも二次的に修飾されている可能性があることから、我々は血管平滑筋細胞での MURC の役割を解明するために in vitro での実験を追加で行った。MURC knockdown を行っただけの VSMC では JNK 活性に影響を及ぼさなかったが、TNF やアンジオテンシン 刺激による JNK 活性は MURC knockdown により亢進が認められた。一方で MMP-9 活性は TNF 有無に関係なく MURC knockdown を行っただけの VSMC で亢進を認め、TNF で刺激することによりさらに増強された。これらの結果は、平滑筋細胞内の MURC は、TNF やアンジオテンシン による JNK-MMP-9 活性シグナルを負に制御しているとともに、MMP-9 活性については刺激に関係なく負に制御している可能性を示唆している。

本研究により、血管平滑筋細胞の MURC は JNK や MMP-9 の活性を直接制御しており、大動脈瘤進展に関わっていることが示された。この制御の詳細がさらに解明されれば、MURC が大動脈瘤の進展予防における標的分子にもなりうると思われる。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

Kotaro Miyagawa、MURC/Cavin-4 aggravates aortic aneurysm with JNK overactivation in vascular smooth muscle cells、American Heart Association Scientific Sessions 2014、2014年11月18日、Chicago(USA)

Kotaro Miyagawa、Genetic Deletion of MURC/Cavin-4 Aggravates Abdominal Aortic Aneurysm、第78回日本循環器学会学術集会、2014年3月23日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

Kotaro Miyagawa、Genetic Deletion of

MURC/Cavin-4 Aggravates Abdominal Aortic Aneurysm、American Heart Association Scientific Sessions 2013、2013年11月20日、Dallas(USA)

宮川 浩太郎、MURC/Cavin-4 has a protective role in the progression of abdominal aortic aneurysm、第21回日本血管生物医学会学術集会、2013年9月28日、千里阪急ホテル(大阪府豊中市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮川 浩太郎 (MIYAGAWA, Kotaro)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：60725612