2021年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	**動脈硬化治療薬開発を目指した細胞外マトリックス研究 ー動脈硬化治療ターゲットとしてのSPARCの有用性についてー**
キーワード	①細胞外マトリックス、②動脈硬化、③慢性腎臓病

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏　名	トバ　ヒロエ 鳥羽　裕恵
配付時の所属先・職位等 （令和３年４月１日現在）	京都薬科大学 薬学部　助教
現在の所属先・職位等 （令和４年７月１日現在）	京都薬科大学 薬学部　助教
プロフィール	研究者は母校にて薬学の教育・研究に従事し、着任初期から博士（薬学）の学位取得や国際高血圧学会における受賞など活発な研究活動で成果を上げるとともに、応急手当普及員、薬理学エデュケーター、高血圧・循環器病予防療養指導士の資格を取得し、教育活動のための自己研鑽を継続している。ご給付いただいた奨励金で実施した研究は、2013年から2年間客員助教として米国ミシシッピ大学メディカルセンターにて行った細胞外マトリックス研究を発展させたものであるが、その予備実験結果は2018年の学会で女性研究者奨励賞を受賞している。長年の薬学研究・教育経験と留学経験を生かし、国内外で活躍する女性研究者として成長を続けたい。

1. 研究の概要

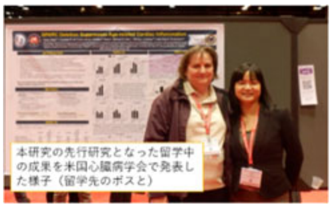
日本人の死因の 2 位を占める動脈硬化性疾患の対策は、長寿国である我が国にとって急務の課題である。本研究の特色は動脈硬化を「血管病」として捉え、血管自体をターゲットにし、臓器非依存的な包括的な動脈硬化の治療法開発に挑戦した点である。独創的な点は、元来細胞間を支持する構造的な足場と考えられていた細胞外マトリックスの病態生理学的な役割に焦点を当てたことである。現在でも循環器領域における細胞外マトリックス研究の多くは病変が進行した結果としての量的評価にとどまっており、病因としての機能的評価は殆ど検討されていない。本研究は動脈硬化の危険因子である高血圧のモデル動物と培養血管内皮細胞を用い、血管障害の発症と進展における細胞外マトリックスSPARC（secreted protein acidic and rich in cysteine）の役割を検討した。また、動脈硬化性疾患であるとともに動脈硬化の危険因子でもある腎障害における SPARC の作用についても、同モデル動物と培養腎線維芽細胞を用いて検討した。

2. 研究の動機、目的

2 年間客員助教として米国留学した際、細胞外マトリックスを専門とする研究室で心臓の老化メカニズムについて研究し、細胞外マトリックスの 1 つである SPARC が心老化を加速させること、その機序はM1 マクロファージへの分化を介した炎症反応の亢進と、心線維芽細胞からのコラーゲン産生促進であることを報告した。留学前の十余年、動脈硬化研究を行って

きた経験から、「心臓の老化」と「動脈硬化の進展」の過程が類似していることに気づいたことが、本研究を行う動機となった。

動脈硬化治療ターゲット候補としての SPARC の可能性を明らかにするとともに、SPARC 関連分子の中から新たな治療ターゲットを抽出し、今後の検討にも繋げることで、動脈硬化対策の面から日本人の平均寿命と健康寿命の延長に貢献することを目的とした。



3. 研究の結果

<u>高血圧モデルラットの血管障害、腎障害の程度とSPARC発現の関係</u>

動脈硬化の危険因子である高血圧モデルを deoxycorticosterone acetate（40mg/kg/week、皮下投与）と1%食塩水（飲料水）を片腎ラットに負荷することで作製し、1週毎に大動脈組織における血管内皮細胞機能低下、炎症反応等の動脈硬化病変と、尿蛋白出現や腎臓における線維化が経時的に悪化していく際、これらの血管障害、腎障害の程度に相関してSPARC発現が増大すること、SPARCに遅延してADAMTS1発現が誘導されるという結果から、動脈硬化の進展にSPARCとADAMTS1が重要な役割を担っていることと、SPARCの下流にADAMTS1が位置している可能性を示すことを試みた（図１）。ADAMTS1（a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif-1）はマクロファージの浸潤や組織の線維化に寄与していることが示唆されている細胞外マトリックス分解酵素であり、前駆型（110kDa）として分泌された後、酵素分解を受け活性型（87kDa、65kDa）となる。研究者は心線維芽細胞においてSPARC刺激によりADAMTS1分泌が増加することを報告している（Toba et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 310(11), E1027-1035, 2016）。

大動脈組織を用いた検討の結果を図２に

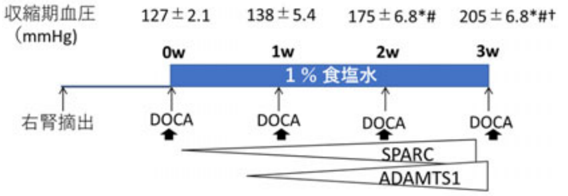


図１　高血圧モデルラット作製方法と収縮期血圧（上）、期待されるSPARCとADAMTS1の発現変化（下）
1週毎に胸部大動脈と腎臓を摘出した（⬆）。DOCA, deoxycorticosterone acetate; w, weeks. *p < 0.05 vs. 0w, #p < 0.05 vs. 1w, †p < 0.05 vs. 2w.

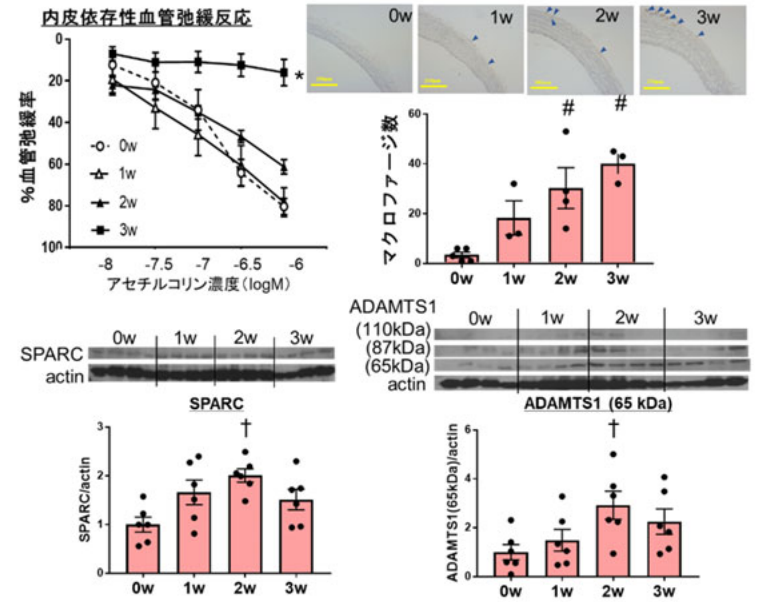


図２　高血圧モデルラットの血管における内皮機能低下、炎症とSPARC、ADAMTS1の発現
*p < 0.05 vs. others, #p < 0.05 vs. 0w, †p < 0.05 vs. 2w, †p < 0.05 vs. 0w.

	0w	1w	2w	3w
尿蛋白 (mg/day)	2.6±0.3	42±13	361±51*#	250±39*#
CCr (mL/min)	1.47±0.27	1.32±0.13	0.79±0.10	0.70±0.15*

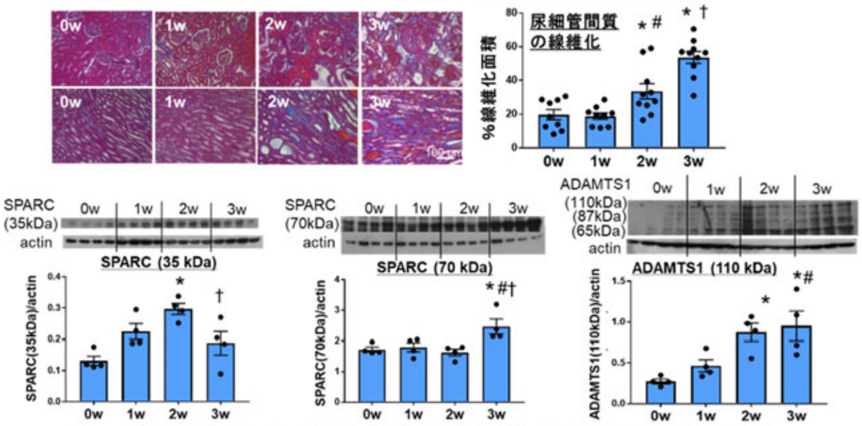


図３　高血圧モデルラットの腎機能、腎臓における線維化とSPARC、ADAMTS1の発現
CCr, クレアチニンクリアランス、*p < 0.05 vs. 0w, #p < 0.05 vs. 1w, †p < 0.05 vs. 2w.

示す。フェニレフリン前収縮下のアセチルコリンによる弛緩反応から血管内皮機能を測定したところ、2週モデルで減弱しはじめ、3週では弛緩反応が消失した。炎症の中心的な役割を担うマクロファージは1週目より経時的な増加傾向を認め、2週以降で有意に増加した。これらの血管障害に相関して、SPARCとADAMTS1の発現が増大したが、ともに2週でピークに達した。

図３は高血圧モデルラットの腎障害とSPARCの関係について検討した結果である。尿蛋白が2週以降で増加し、腎機能を示すクレアチニンクリアランスは3週で有意な低下を認めた。マッソントリクローム染色にて観察した尿細管間質の線維性変化は2週以降で経時的に悪化した。腎臓におけるSPARC発現は、単量体（35ｋDa）は１週から増加傾向を認め、2週で有意な増加、２量体（70ｋDa）は3週で増加した。ADAMTS1発現は0週に比べ2週以降有意に増加し、3週では1週モデルとも有意差を認めた。

これらの結果から、SPARCとADAMTS1の発現は、血管障害の早期の段階で増加することと、腎障害に相関して発現が増加することが明らかとなった。

<u>血管障害と腎障害の原因としてのSPARCの役割</u>

SPARCの発現変化が障害の副次的な結果ではなく、血管内皮細胞障害、腎線維化の原因となっていることを証明すべく、培養ラット大動脈内皮細胞と培養ラット腎線維芽細胞を用いて検討を行った（図４）。

血管内皮細胞にSPARCリコンビナントプロテイン（100nmol/L、24時間）を負荷すると、単球走化性因子MCP-1（monocyte chemoattractant protein-1）の発現が増大し、SPARCが血管において炎症を惹起することが明らかとなった。

腎線維芽細胞においては、small interfering RNAを用いてSPARC遺伝子を90%以上ノックダウンすると、コラーゲン産生が減少した。この結果はSPARCが腎線維化の原因であることを示している。

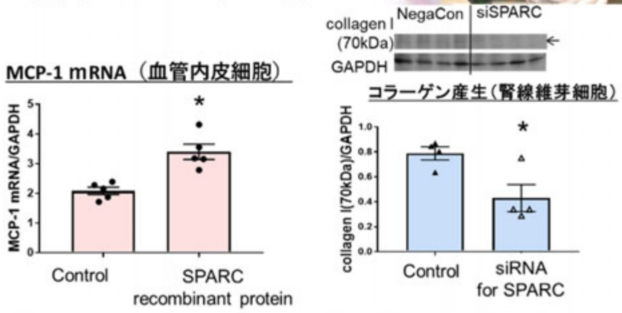


図４　培養血管内皮細胞にSPARCリコンビナントプロテインを負荷した時の炎症反応（左）と培養腎線維芽細胞でSPARC遺伝子をノックダウンしたときのコラーゲン産生（右）*p < 0.05 vs. Control.

<u>SPARCの調節機序と、SPARCによる臓器障害機序</u>

血管障害や腎障害の中心的な役割を担っていることが報告されている組織内レニン・アンジオテンシン系とSPARCの関係を検討するため、培養血管内皮細胞と腎線維芽細胞にangiotensin II（血管内皮細胞：10^{-7}mol/L、腎線維芽細胞：10^{-6}mol/L）を負荷した。血管内皮細胞では負荷3時間から、腎線維芽細胞では24時間でSPARC発現が増大し、組織レニン・アンジオテンシン系亢進がSPARC発現増大を引き起こすことが明らかになった（図５）。Angiotensin IIタイプ１受容体拮抗薬を投与すると、高血圧モデルラットの腎臓におけるSPARC発現増大が消失することを確認しており（Toba et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 914: 174681, 2022）、この結果も組織レニン・アンジオテンシン系がSPARC誘導の上流に位置しているという仮説を支持している。

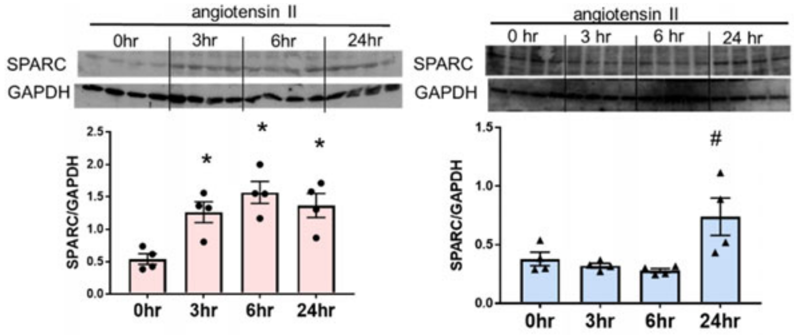


図５　Angiotensin II血管内皮細胞（左）と腎線維芽細胞（右）におけるSPARC発現
*p < 0.05 vs. 0hr. #p < 0.05 vs. others.

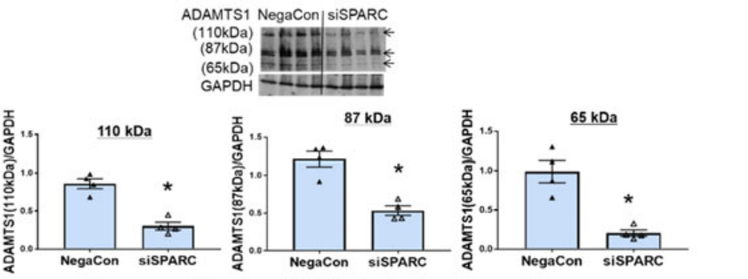


図６　SPARC遺伝子ノックダウン時の腎線維芽細胞におけるADAMTS1発現　*p < 0.05 vs. NegaCon.

次に、SPARCが血管障害、腎障害を引き起こす機序に

ADAMTS1を介しているという仮説について検討するため、腎線維芽細胞のSPARC遺伝子をノックダウンしたところ、前駆型（110kDa）、活性型（87kDa、65kDa）ともにADAMTS1発現が低下していた。これはSPARCがADAMTS1産生の誘導因子であることを示している。引き続き検討を行い、血管内皮細胞においてもSPARCがADAMTS1産生を引き起こすのか、SPARCによる血管炎症や腎臓におけるコラーゲン産生がADAMTS1を介しているのかを明らかにしていく必要がある。さらに、SPARCがADAMTS1を誘導する機序についても今後解明していく予定である。

結果のまとめ

本研究により、高血圧の病態時に増加するSPARCは血管内皮細胞障害を引き起こし、動脈硬化の原因となることが明らかとなった。慢性腎臓病は動脈硬化性疾患であるとともに、動脈硬化の危険因子でもあるが、SPARCは不可逆的な機能低下につながる腎線維化を増悪させること、その機序はADAMTS1の産生増大を介していることを示すことができた。これらの結果は包括的な動脈硬化治療ターゲットとしてのSPARCの可能性を提示している（図７）。今後は、SPARC中和抗体やsmall interfering RNAによるSPARC遺伝子ノックダウンが実際に動脈硬化治療薬として機能することを確認していくことで、この仮説を強固なものにしていく予定である。さらに、SPARCやADAMTS1に関連がある細胞外マトリックスやマトリックス分解酵素を中心に研究対象を広げていくことで、新たな動脈硬化治療ターゲット発見に繋げていく展望であり、本研究のさらなる発展を目指していく展望である。

図７　動脈硬化性疾患の治療ターゲットとしてのSPARCの役割（仮説を含む）

4. 研究者としてのこれからの展望

女性研究者として私自身が活躍しロールモデルとなることで、次世代の研究者とくに女性研究者育成に貢献することが最大の夢です。留学経験を生かした国際共同研究、活発な学会活動による国内研究者とのコネクションの拡大により、当該研究を含め現在行っている研究をさらに発展させ、継続した外部資金の獲得と論文発表を実現できる研究者を目指します。それらの業績をもって近い将来、プロモーションの実現とPrincipal Investigator (PI) として研究室をオーガナイズできる立場となれるよう努力を続けていく所存です。大学院では国内留学、2013年からは米国留学で学んだ経験から、それぞれのPIの良い所を参考にし、研究室員を上手く纏めることができ、研究者としても人としても尊敬されるよう、自ら率先して学ぶ姿勢を見せ、協調性を重んじるPIとなることを目標としています。特に米国留学時に、non-MDの女性研究者として医療系研究を行い、多国籍の研究員をチームとして纏めるボスの姿を目の当たりにした経験は、上記の夢実現の大きな糧となると確信しています。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

European Journal of Pharmacology

Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS1) increments by the renin-angiotensin system induce renal fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats

Hiroe Toba, Mitsushi J. Ikemoto, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata

ARTICLE INFO

ABSTRACT

本研究の遂行によりpublishできた論文の表紙

本研究の一部は日本私立学校振興・共済事業団　女性研究者奨励金のご給付によるものです。ご支援いただきましたことを、ここに厚く御礼申し上げます。

奨励金の獲得そのものが、研究者としての大きな業績であるとともに、本奨励金で遂行できました研究成果は、右の通り論文として発表することができ、将来のプロモーションへの大きな後押しとなりました。また、本研究中に他施設との新たなコネクション樹立と共同研究の実現、さらにSPARCリコンビナントプロテイン提供と作製技術習得の機会を得ることができ、今後の研究の発展に繋げることができました。とりわけ、女性研究者として皆様から応援していただいているという自信となりましたことを、心より感謝申し上げます。

動脈硬化性疾患は日本人の死因2位であるとともに、脳梗塞を含めた脳卒中が寝たきりの原因であることを考慮しますと、本研究は将来、平均寿命だけでなく健康寿命の延長と社会問題である我が国の医療費削減に貢献するものと考えております。

今回のご支援を糧に、次世代の女性研究者の育成と医療の発展に貢献致します。