

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10842

研究課題名（和文）慢性炎症をターゲットとした動脈硬化の機序解明と、新たな薬物治療の可能性

研究課題名（英文）Mechanism of arteriosclerosis targeting chronic inflammation and possibility of new drug treatment

研究代表者

河野 隆幸（Kawano, Takayuki）

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：50448536

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト頸動脈プラークのサンプルにおいて、Angpt12及びマクロファージのマーカーである、CD68の免疫染色を施行し、プラークにはマクロファージが浸潤していることを明らかにした。また浸潤したマクロファージにはAngpt12が多く発現していることを確認された。このため、プラーク内のAngpt12の主な分泌源はマクロファージであることが示唆された。今回の研究により、ヒト頸動脈プラークには慢性炎症をAngpt12が多く含まれており、その発現が血管炎症を惹起し頸動脈プラークの病態形成に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管における局所的なAngpt12の発現が血管炎症を惹起し、病態形成および進展に関与していると考えられる。そのため頸動脈プラークの発生、増大、破綻の病態に慢性炎症、特にAngpt12が関与していることが強く推測される。その関与が明らかにされれば、Angpt12が頸動脈プラークに対する薬物治療や、さらには急性冠症候群や閉塞性動脈硬化症などを含めた全身の動脈硬化の治療標的になる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Immunostaining of CD68, a marker for Angpt12 and macrophages, was performed in samples of human carotid plaques, and it was revealed that macrophages infiltrated the plaques. Moreover, it was confirmed that Angpt12 was highly expressed in the infiltrated macrophages. Therefore, it was suggested that macrophages are the main secretory source of Angpt12 in plaques. The present study suggests that human carotid plaque contains a large amount of chronic inflammation, Angpt12, and that its expression induces vascular inflammation and is involved in the pathogenesis of carotid plaque.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：慢性炎症 動脈硬化 Angpt12

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頸動脈狭窄症の原因のほとんどはアテローム硬化であり、動脈の粥状硬化により動脈壁の内側にプラークが形成され内腔が狭小化する。一部のものは不安定プラークに移行し、血流低下を招くか、塞栓源となることで脳梗塞の発症に至る。頸動脈プラークの増大、破綻は脳梗塞の原因として重要である。動脈硬化の発症・進展は高血圧や糖尿病をはじめとする多様な危険因子の重なりによって引き起こされることが、多くの研究成果の蓄積により証明されてきた。その要因として様々な分子の関与が挙げられているが、その全容は明らかにされていない。近年、動脈硬化の発症、進展に炎症が大きく関わっていることが報告されている。

これまで、我々は脳虚血の病態・治療の研究を行ってきた。代表研究者は脳虚血モデルで、脳に炎症を惹起するプロスタグランジン E<sub>2</sub>、EP1 受容体が神経細胞死に関与していること、虚血耐性発現にペルオキシナイトライトが関与していること等を明らかにしてきた。これらの経験をもとに慢性炎症と頸動脈プラークの病態に関する研究を着想した。

慢性炎症では、長期にわたるストレス応答のため、不可逆的な組織のリモデリングが生じる。この応答機構の変調や破綻が動脈硬化性疾患の発症や進展の原因として近年注目されている。今回我々はその慢性炎症の鍵因子としてアンジオポエチン様タンパク質 2 (angiotensin-like protein 2; Angptl2) に着目し研究を立案した。

Angptl ファミリーは、血管新生因子アンジオポエチンの構造上の特徴であるコイルドコイルドメインとフィブリノゲン様ドメインをもつ分泌タンパク質である。Angptl ファミリー分子はヒトで 8 種類同定されており、生物学的機能としてはその多くが血管新生制御に何らかの作用を示すことが明らかとなっている。近年我々は Angptl2 が慢性炎症に関与する重要な因子のひとつであることを明らかにした。

ヒト血中 Angptl2 濃度は、肥満指数や炎症の指標となる C-reactive protein 値と正の相関を示し、Angptl2 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて、脂肪組織へのマクロファージの浸潤や IL-6 や TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの発現量が減少していることが報告されている。逆に、Angptl2 を持続的に高発現するトランスジェニックマウスでは、通常肥満病態でみられる脂肪組織におけるマクロファージの浸潤や、血管壁に接着した白血球の増加、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 などの炎症性サイトカインの発現の上昇が認められ、慢性炎症が惹起されている。Angptl2 による慢性炎症誘導の分子メカニズムとしては、Angptl2 が血管内皮細胞に作用し、Rac を活性化することで細胞の遊走を促進すること、NF- $\kappa$ B のサブユニットの核内移行を促進することで炎症経路を活性化させること、単球細胞の遊走能を促進することなどが明らかにされている。また、我々は ApoE と Angptl2 のダブルノックアウトマウスを用いた実験で、血管内皮細胞由来の Angptl2 が炎症経路を活性化させ、マクロファージの遊走を促し、内皮細胞機能不全と動脈硬化の進展に関与していることを示した。また、血清 Angptl2 値が高値であることが、2 型糖尿病や急性冠症候群の危険因子であることが示されており、Angptl2 はこれらの動脈硬化性疾患のカギとなる因子であることが示唆されている。

以上のように血管における局所的な Angptl2 の発現が血管炎症を惹起し、病態形成および進展に関与していると考えられる。そのため頸動脈プラークの発生、増大、破綻の病態に慢性炎症、特に Angptl2 が関与していることが強く推測される。その関与が明らかにされれば、Angptl2 が頸動脈プラークに対する薬物治療や、さらには急性冠症候群や閉塞性動脈硬化症などを含めた全身の動脈硬化の治療標的になる可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

研究の最終的な目標は、動脈硬化の発症、進展を予防する薬剤の開発である。本研究の具体的な目標は、脳神経外科領域で扱う頸動脈プラークの発生、増大、破綻の分子メカニズムを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

1) 臨床サンプルを用いて頸動脈プラークに Angptl2 の存在を確認する。

免疫染色の手法を用いて Angptl2 の発現、局在の検討を行う。

マクロファージのマーカー等との二重染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察し、Angptl2 の局在を明らかにする。

安定プラーク、不安定プラークにより発現量や局在に相違があるのか同様に検討する。

また、ウエスタンブロット法を用いて Angptl2 の発現量の違いも検討する。

quantitative RT-PCR の手法を用い、Angptl2、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 などの発現を確認する。

2) マウス頸動脈プラークモデルを作成し、Angptl2 の存在を確認する。

ApoE ノックアウトマウス (ApoE<sup>-/-</sup>) を用いて、実験的頸動脈プラークを作成する。

上記(1)と同様の免疫染色、ウエスタンブロット、RT-PCR を行い、ヒト頸動脈プラークと比較し、モデルの正当性を確認する。

3) ApoE、Angptl2 ダブルノックアウトマウス (ApoE<sup>-/-</sup>/Angptl2<sup>-/-</sup>) を用いて、マウス頸動脈プラークモデルを作成する。

ApoE<sup>-/-</sup>、ApoE<sup>-/-</sup>/Angptl2<sup>-/-</sup>を用いて、頸動脈プラークモデルを作成する。

プラークサンプルにおいて、Angpt12、TNF、IL-1、IL-6などの発現を免疫染色、RT-PCRの手法を用いて比較検討する。

なお ApoE<sup>-/-</sup>、ApoE<sup>-/-</sup>/Angpt12<sup>-/-</sup>は我々の研究組織で管理し、日常的に実験に供している。

4) Angpt12 と頸動脈プラークの病態の関連を明らかにする。

ApoE<sup>-/-</sup>及び ApoE<sup>-/-</sup>/Angpt12<sup>-/-</sup>で頸動脈プラークモデルを作成しプラークの発生・増大・破綻の病態に両群で違いがあるのかを検討する。

まず、両群での発生率の差を検討する。発生率に変化がない場合は、その増大率、破綻率を検討する。

5) 頸動脈プラークモデルで、浸潤したマクロファージと Angpt12 の関与を証明する。

ApoE<sup>-/-</sup>及び ApoE<sup>-/-</sup>/Angpt12<sup>-/-</sup>に対し放射線照射を行うことにより、血液幹細胞を死滅させ、その照射マウスに対して ApoE<sup>-/-</sup>または ApoE<sup>-/-</sup>/Angpt12<sup>-/-</sup>から抽出した骨髄を投与して骨髄移植マウスを作成する。これらのマウスを用いて、頸動脈プラークを作成する。

	ドナー	骨髄移植	レシピエント
I	Apo E <sup>-/-</sup>		Apo E <sup>-/-</sup>
II	Apo E <sup>-/-</sup> /Angpt12 <sup>-/-</sup>		Apo E <sup>-/-</sup>
III	Apo E <sup>-/-</sup>		Apo E <sup>-/-</sup> /Angpt12 <sup>-/-</sup>
IV	Apo E <sup>-/-</sup> /Angpt12 <sup>-/-</sup>		Apo E <sup>-/-</sup> /Angpt12 <sup>-/-</sup>

これらの4群で頸動脈プラークの発生、増大率等を検討し、頸動脈プラークに浸潤したマクロファージと Angpt12 の関与を検討する。

6) Angpt12 活性と頸動脈プラークの関係を臨床検体で検討する。

末梢血液中の Angpt12 を定量的に測定するキットが現在すでに発売されている。また当科には外来で経過観察を行っている内頸動脈狭窄症の患者が多数存在する。これらの患者のプラークの性状やサイズの変化と、血中 Angpt12 値の関係を検討する。

7) 最終判断

上記実験結果、および臨床追跡調査の結果を総合的に検討し、Angpt12 が頸動脈プラークの病態に関与しているのかを判断する。病態に関与していると判断された場合、さらに臨床応用に向けた実験を計画する。

#### 4. 研究成果

##### 1) 免疫染色

熊本大学医学部附属病院で行われた内頸動脈内膜剥離術にて、頸動脈プラークが摘出された後、液体窒素で凍結させ-80度で保存。それらの組織をマクロファージのマーカーである、抗 CD68 抗体を用いて免疫染色を行った(図1)。プラーク内にCD68陽性細胞を認めた。このことにより、プラークにはマクロファージが存在していることが証明された。

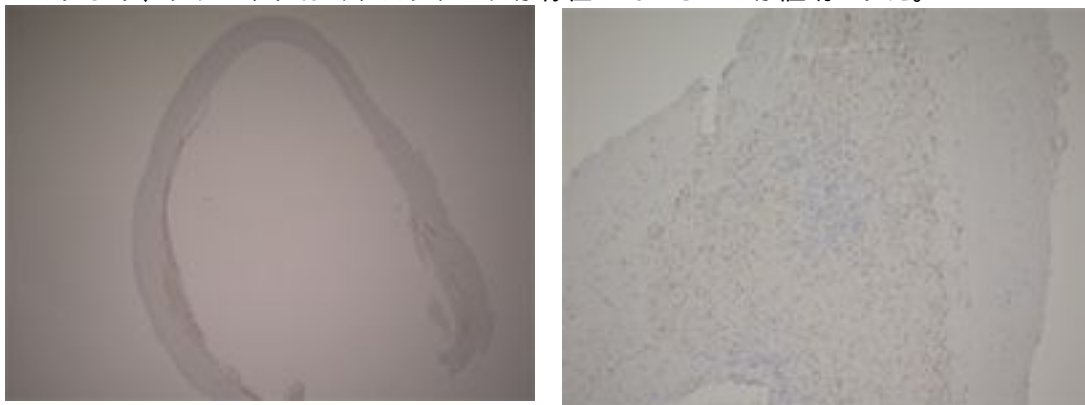


図1

次に angpt1-2 に対する抗体で上記の連続切片を染色すると、前述の CD68 と同様の染色を示し CD68 陽性細胞に Angpt12 の染色が認められた(図2)。以上の結果により頸動脈プラークには Angpt12 が存在しており、マクロファージが Angpt12 の主な分泌細胞となっていることが示された。



図 2

## 2) ヒト頸動脈プラークの RNA 測定

頸動脈プラークサンプルを破砕機を用いて十分に破砕した。1ml TRIzol RNA Isolation Reagents (Thermo Fisher)を用いて細胞を可溶化した後、室温にて 15min 静置した。クロロホルム 200  $\mu$ l を加えて転倒攪拌後、室温にて 1 min 静置した。4  $^{\circ}$ C, 15000 rpm 15 min で遠心を行い、上澄み液 350  $\mu$ l を新しい Eppendorf tube に取り(赤いフェノクロ層が混じらないように十分注意した)、350  $\mu$ l イソプロパノールを加えて 10 分間静置した。4  $^{\circ}$ C, 15000 rpm, 10 min 遠心を行い。上澄み液を捨て、乾燥を 5 分間行った。その後 RNase free water 20  $\mu$ l にて溶解した。

吸光度計で RNA 純度を測定すると、A260/280:1.8-2.0, A260/230: 1 前後と、純度が低かった。手技に問題が認められないが純度が低い理由を検討するため、Agilent 2100 バイオアナライザを用いて RIN (RNA Integrity Number)を測定した。全てのサンプルで RIN 3 以下であり、RNA がほとんど分解されている状態であることがわかった。rtPCR を行ったが、Angpt12 のみならず GAPDH, ACTB といった Housekeeping genes までもが測定感度以下であり、RIN が低いという結果と合致していた。

## 3) ヒト頸動脈プラークの Angpt1-2 タンパク定量

ヒト頸動脈プラークサンプルを用いて、抗 Angpt12 抗体を用いて western blotting を施行した(図 3)

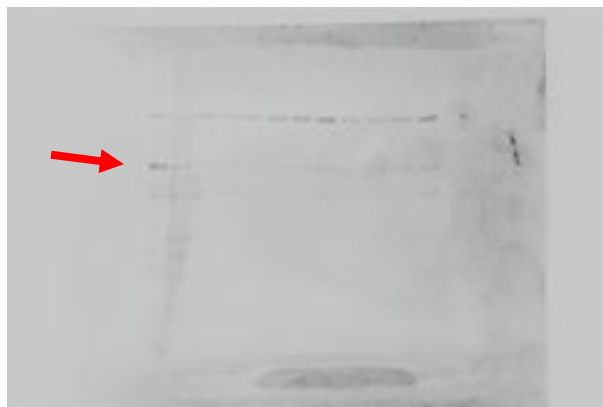


図 3

Angpt12 western blotting 用の抗体は品質が悪く、これまでの他の実験でもうまく検出できないでいた。分子量から考えると赤線の位置が Angpt12 であるが、非特異的な結合による他の何らかの分子の方が濃いバンドとして描出されている。Angpt12 のバンドは濃度を比較する実験に耐えられるようなものではなかった。本抗体を用いたタンパク定量は困難であると考えられた。

4) 以上の結果により、ヒト頸動脈プラークにおいて Angpt12 が発現しておりその主な分泌細胞としてはマクロファージが同定された。一方 RNA やたんぱくの測定は大変困難なものであった。また頸動脈プラークモデルの再現性にも問題があり今後の課題と考えられた。血管における局所的な Angpt12 の発現が血管炎症を惹起し、頸動脈プラークの病態形成および進展に関与していると考えられる。上記結果は現在国際誌に投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮田 敬士  (Miyata Keishi)  (50398228)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任准教授    (17401)	
研究分担者	大森 雄樹  (Ohmori Yuki)  (60599116)	熊本大学・病院・助教    (17401)	