

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590867

研究課題名（和文）抗炎症分子を利用した血管病変の画期的な治療法と新規遺伝子デリバリーシステムの開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapeutics for vascular diseases by anti-inflammatory molecules and a new gene-delivery system

研究代表者

市来 俊弘 (ICHIKI TOSHIHIRO)

九州大学・大学院医学研究院・客員准教授

研究者番号：80311843

研究成果の概要：

- (1) プロスタサイクリンの誘導体であるベラプロストは inducible cAMP early repressor (ICER) の発現を誘導し、ICER の過剰発現は血管平滑筋細胞の増殖とバルーン傷害後の新生内膜形成を抑制した。
- (2) レスベラトロールおよびレスベラトロールが活性化する長寿遺伝子 SIRT1 の過剰発現は血管平滑筋細胞におけるアンジオテンシン II 受容体の発現を抑制した。レスベラトロールはアンジオテンシン II による血圧上昇や冠動脈周囲の線維化を抑制した。

ICER やレスベラトロールが血管における炎症を抑制し、動脈硬化の治療に有用であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ベラプロスト、inducible cAMP early repressor、レスベラトロール、SIRT1、アンジオテンシン II 受容体

1. 研究開始当初の背景

HMGCoA 還元酵素阻害薬(スタチン)やアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬が心血管病を有するハイリスク患者の予後を改善することが多く報告されているが、残念ながらその効果は十分とは言えない。また、ステントによる冠動脈形成術が安全で標準的な冠動脈硬化症の治療として確立してきた。問題であった再狭窄もシロリムスなどの薬物溶出ステント(Drug eluting stent: DES)の使用により著しく減少した。しかし、溶出する薬剤が、再狭窄の主な原因である平滑筋細胞の増殖のみならず、植え込み部の再内皮化をも抑制するために長期間あるいは半永久的な抗血小板薬の服用を余儀なく

されている。さらに最近の報告ではDESを含むステント治療は虚血性心臓病患者の予後(心筋梗塞発症や死亡)を改善しないと報告されている(Stone G et al, N Engl J Med 2004;350:221など)。急性心筋梗塞の多くがステントの植え込みの対象とならない狭窄度 50%以下の病変から生じる(Falk, E. et al. Circulation 1995;92:657-671)ことから、動脈硬化に起因する心血管イベントを減少させるためには、動脈硬化の進展を予防し、そして安定化させる新たな治療標的因子の同定や、新たな治療方法の開発が重要と考えられる。

動脈硬化は血管壁における慢性的炎症・増

殖反応であり、コレステロールの蓄積とともに、単球やマクロファージなどの炎症細胞の浸潤と平滑筋細胞の内膜への遊走・増殖が重要な役割を果たす。内膜へ浸潤した細胞は炎症性サイトカインやケモカインを産生することによりさらに炎症を促進し、またマトリックスメタプロテアーゼなどの産生により線維性被膜が菲薄化しプラークが不安定化すると考えられている(Ross R. N Engl J Med. 1999;340:115)。また最近の研究によれば、動脈硬化や糖尿病発症につながる重要な病態であるメタボリック症候群においても炎症反応が重要な役割を果たすと考えられている。特に、マウスの肥満モデルにおいてマクロファージ浸潤を伴う脂肪組織の炎症がインスリン抵抗性の原因の一つとして重要であることが示されている(Xu H et al. J Clin Invest 2003;112:1821)。

アンジオテンシン II は、動脈硬化の進展や心筋梗塞後の心筋リモデリングなどにおいて重要な役割を果たす。我々はこれまで、平滑筋細胞においてアンジオテンシン II による炎症性サイトカインやケモカインの産生とその産生に関与する転写因子の解析を行って来た。しかし、生体内ではこれらの炎症性物質の産生はアンジオテンシン II によってのみ誘導されるわけではない。そこで、これまでの我々の研究成果を基に、本研究では**抗炎症性経路の活性化による動脈硬化の画期的治療方法の開発を試みる**。また、抗炎症性サイトカインや転写抑制因子をマクロファージやステントから血管病変部へ投与・導入する新規治療法の開発を試みる。

2. 研究の目的

(1) 生体がもつ抗炎症作用を増強することによって動脈硬化の進展や血管病変形成を抑制できないかを検討する。

細胞内 cAMP の増加によって活性化される遺伝子発現は主に cAMP response element binding protein (CREB)ファミリーの転写因子によって制御されている。我々は CREB がアンジオテンシン II やトロンビンによって活性化され血管平滑筋細胞の増殖と肥大に重要な働きをすること、内皮細胞において TNF- α による接着因子の発現を誘導することなどを報告している。この CREB ファミリーの転写因子のうち inducible cAMP early repressor (ICER) は CRE 依存性の遺伝子発現を抑制する転写因子として作用することが報告されているので、アンジオテンシン II などの作用を阻害し、抗炎症的効果を持つことが期待される。そこで、血管における ICER の発現と ICER が血管病変形成に及ぼす影響を解析するとともに、血管病変の治療に応用できないかを検討する。

(2) マクロファージ特異的プロモーターを用いた抗炎症性サイトカインの発現誘導による動脈硬化の細胞治療の試み。

マクロファージは動脈硬化病変形成のみならず、肥満モデルマウスの脂肪組織にも浸潤しインスリン抵抗性に係わっていると報告されている。そこで、マクロファージ特異的に発現する CD68 のプロモーター (Lang R et al. J Immunol. 2002;168:3402)を用いてマクロファージ選択的に抗炎症性のサイトカイン等を発現させ、動脈硬化や血管病変あるいはメタボリック症候群の治療ができないかを検討する。導入を試みる遺伝子としては、代表的な抗炎症性サイトカインであるインターロイキン-10(IL-10)の他に、血管拡張作用と伴に抗酸化作用のあるアドレノメデュリンの効果を検討する。単球に遺伝子導入を行った後、病変部でマクロファージへ分化後に遺伝子発現が誘導できないかを検討する。

(3) 細胞特異的遺伝子発現プラスミド溶出ステント作成の試み。

現在の薬剤溶出ステントの問題点は溶出薬剤による再内皮化の阻害とそれに伴う遅発性血栓症である。特に抗血小板薬中止後に晩期血栓閉塞が報告されている(Joner M et al J Am Coll Cardiol 2006;48:193)。したがってステント内再狭窄の主な原因である平滑筋細胞の増殖を抑制しながらも、内皮の再生を阻害しないあるいは促進する因子をステントより溶出することができれば晩期血栓閉塞を回避できるはずである。

現在の薬剤ではこのような細胞特異的な作用は期待できないため、この理論が臨床応用可能かどうかを検討するために、平滑筋細胞に特異的な SM22 遺伝子プロモーターの制御下に転写抑制因子(ICER, SOCS3)やアポトーシスを誘導する細胞内因子 (Mst1など)を発現するプラスミド DNA を構築し、その効果を検討する。そしてその DNA を溶出するステントの作成を試みる。DNA の導入効率を高めるために、生体吸収性高分子ポリマー(PLGA)製ナノ粒子にプラスミド DNA を封入しステントへコーティングする。そしてステント植え込み後に、再狭窄予防効果とともに再内皮化に対する影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) ICERの発現・誘導・血管病変形成における役割に関する検討

①培養平滑筋細胞および内皮細胞などにおける ICER の発現誘導をノーザンおよびウエスタンブロット法にて検討する。

② ICER を発現するアデノウイルス(AdICER)を作成する。AdICERを感染させた血管平滑筋細胞

において、血小板由来増殖因子による増殖反応がどのように変化するかを $[^3\text{H}]$ チミジン、 $[^3\text{H}]$ ロイシンのとりこみにより検討する。

siRNAの導入により内因性ICERの発現を抑制し、上記と同様の検討を行う。

③ラット頸動脈をバルーン傷害しその後にAdICERを感染させる。

新生内膜の形成の程度を組織学的に定量する(内膜/中膜比)

BrdUの取り込みにより平滑筋増殖の程度を検討する。

TUNEL法によりアポトーシスの程度を検討する。

(2) 組織特異的プロモーターを用いた抗炎症性サイトカインの発現誘導による動脈硬化の治療

①CD68プロモーターの制御下にインターロイキン(IL)-10を発現するアデノウイルスベクターを作成する(dCD68IL-10)。

②AdCD68IL-10などをマウス末梢血単核球に感染させ、PMAで刺激後にIL-10の発現が誘導されるかを検討する。

③AdCD68IL-10をアポリポ蛋白E欠損マウスに経静脈的に投与する。動脈硬化病変の形成、アポトーシス、平滑筋増殖の程度を検討する。

(3) 研究計画申請の段階では予定していなかったが、赤ワインなどに含まれるポリフェノールの一種であるレスベラトロールがアンジオテンシンIIの作用を抑制することを見だし、研究を行った。

①レスベラトロールがアンジオテンシンIIタイプ1受容体(AT1R)の発現に及ぼす影響をノーザンブロット法などで検討した。

②レスベラトロールがAT1Rのシグナルに及ぼす影響を検討した。

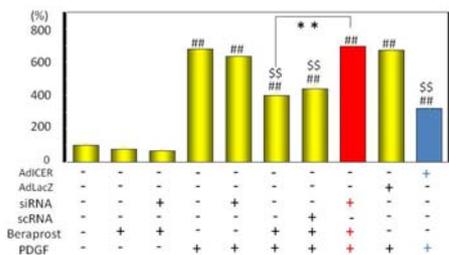
4. 研究成果

(1) ICERに関する研究。

①プロスタサイクリンの誘導体であるベラプロストによる平滑筋細胞の増殖抑制効果にはICERの誘導が必要である。(図1、赤)

②ICERの過剰発現は血小板増殖因子による平滑筋細胞の増殖を抑制する。(図1、青)

図1: ICERに対するsiRNAはベラプロストによる増殖抑制効果を消去する

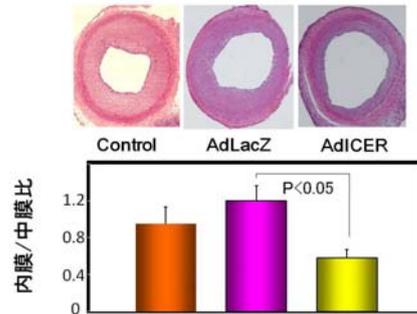


##: p<0.01 versus control, \$\$: p<0.01 versus PDGF, ** : p<0.01 versus beraprost+siRNA-ICER

③ラット頸動脈をバルーン傷害後にアデノ

ウイルスを用いて ICER を過剰発現させると新生内膜の形成が抑制される。(図2、黄色)

図2: ICERの過剰発現はラットの頸動脈のBalloon 傷後の新生内膜の形成を抑制する

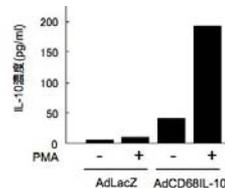


(2) マクロファージ選択的遺伝子発現系の構築に関する研究。

①CD68 遺伝子プロモーターで制御されるIL-10 発現アデノウイルスを作成した。(AdCD68-IL10)。

②このアデノウイルスを単球細胞株であるTHP-1 に導入し、ホルボールエステル (PMA) によりマクロファージに分化させると培養上清中の IL-10 の濃度が有意に上昇した。

図3: ホルボールエステルによる IL-10 産生の誘導

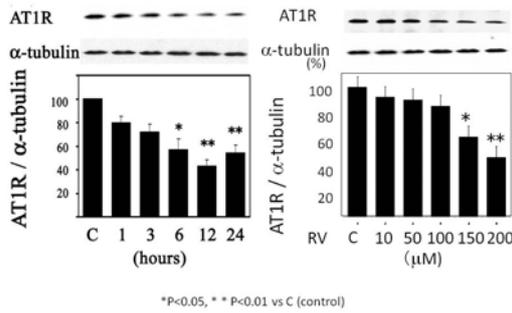


③しかし PMA で分化させなくとも長期に培養を続けると IL-10 が産生されることがわかった。このプロモータ活性では、十分にマクロファージ選択的ではないと考え、本研究は中止した。

(3) レスベラトロールの抗アンジオテンシンII および抗炎症作用に関する研究。

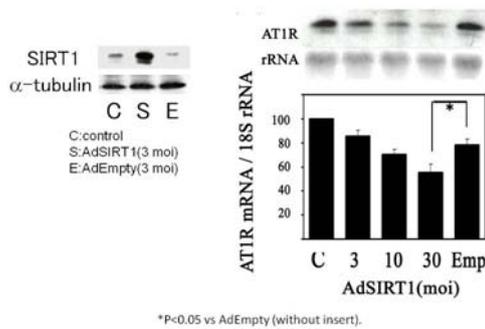
①レスベラトロールは培養平滑筋細胞およびマウス大動脈において AT1R の発現を抑制した (図4、図6a)。

図4: レスベラトロールはAT1Rの発現を抑制する(ウエスタンブロット法)



② レスベラトロールが活性化する長寿遺伝子である SIRT1 の過剰発現 AdSIRT1 も同様に AT1R の発現を抑制した (図 5)。

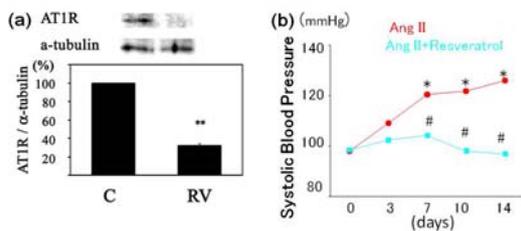
図5: SIRT1の過剰発現はAT1Rの発現を抑制する



③ レスベラトロールはアンジオテンシン II による転写因子の活性化 (NF-κB および CREB) の活性化を抑制した。

④ レスベラトロールの投与はアンジオテンシン II による血圧上昇を抑制した (図 6)。また、微小冠動脈周囲の線維化を抑制した。

図6: レスベラトロールは大動脈のAT1Rの発現(a)とアンジオテンシンIIによる血圧上昇(b)を抑制する。



Resveratrol (RV) was orally administered (10mg/kg/day) and angiotensin (Ang II) was infused with an osmotic minipump (490 ng/kg/min). *P<0.05 vs C, #P<0.05vs Ang II.

(4) 細胞特異的遺伝子発現プラスミド溶出ステント作成については十分な成果を得られなかった。

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 Gan L, Matsuura H, Ichiki T, Yin X, Miyazaki R, Hashimoto T, Juan C, Takeda K, Sunagawa K. Improvement of Neovascularization Capacity of Bone Marrow Mononuclear Cells from Diabetic Mice by ex vivo Pretreatment with Resveratrol. *Hypertension Research* 2009 In Press. 査読有り
- ② Inanaga K, Ichiki T, Matsuura H, Miyazaki R, Hashimoto T, Takeda K Sunagawa K. Resveratrol attenuates angiotensin II-induced interleukin-6 expression and perivascular fibrosis, *Hypertension Research* 2009 In press 査読有り
- ③ Tian Q, Miyazaki R, Ichiki T, Imayama I, Inanaga K, Ohtsubo H, Yano K, Takeda K Sunagawa K, Inhibition of TNF α-Induced Interleukin-6 Expression by Telmisartan through Crosstalk of PPAR-γ with NF-κB and C/EBPβ. *Hypertension* 53:798-804
- ④ Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, Sunagawa K. SIRT1, a Longevity Gene, Downregulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1263-1269. 査読有り
- ⑤ Imayama I, Ichiki T, Patton D, Inanaga K, Miyazaki R, Ohtsubo H, Tian Q, Yano K, Sunagawa K. Liver X Receptor Activator Downregulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression through Dephosphorylation of Sp1. *Hypertension* 2008; 51: 1631-1636. 査読有り
- ⑥ Ohtsubo H, Ichiki T, Imayama I, Ono H, Fukuyama K, Hashiguchi Y, Sadoshima J, Sunagawa K. Involvement of Mst1 in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367:474-80. 査読有り
- ⑦ Chen M, Ichiki T, Ohtsubo H, Imayama I, Inanaga K, Miyazaki M, Sunagawa K. Inhibition of Balloon Injury-Induced Neointimal Formation by Olmesartan and Pravastatin in Rats with Insulin Resistance. *Hypertens Res.* 2007;30:971-978 査読有り
- ⑧ Ohtsubo H, Ichiki T, Miyazaki R, Inanaga K, Imayama I, Hashiguchi Y, Sadoshima J, Sunagawa K. Inducible cAMP Early Repressor Inhibits Growth of

Vascular Smooth Muscle Cell.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:
1549-1555 査読有り

[学会発表] (計 19 件)

- ① 第 55 回日本心臓病学会(2007 年 9 月 10 日)
市来俊弘、砂川賢二。テルミサルタンは PPAR γ を介して血管平滑筋細胞のアンジオテンシン II タイプ 1 受容体の発現を抑制する
- ② 第 48 回日本脈管学会 (2007 年 10 月 25 日)
市来 俊弘。アンジオテンシン II は血管における炎症反応を促進する。
- ③ 第 30 回日本高血圧学会 (2007 年 10 月 25 日)
 - ・宮崎良平、市来俊弘、砂川賢二。レスベラトロールによるアンジオテンシン II タイプ 1 受容体の発現抑制に関する検討
 - ・市来俊弘、砂川賢二。オルメサルタンは血管平滑筋細胞において高グルコース刺激による MCP-1 の発現を抑制する
- ④ 第 11 回日本心血管内分泌代謝学会(2007 年 11 月 16 日)
宮崎良平、市来俊弘、砂川賢二。レスベラトロールによるアンジオテンシン II タイプ 1 受容体の発現抑制に関する検討。
- ⑤ 61th Annual High Blood Pressure Research Conference (September 26-29,2007, USA)
Miyazaki R, Ichik T, Inanaga K, Imayama I, Sunagawa K
Resveratrol downregulates angiotensin II type 1 receptor through activation of SIRT1
- ⑥ AHA Scientific Sessions 2007 (November 4-7, 2007, USA)
Ohtsubo H, Ichiki T, Sadoshima J, Sunagawa K. Inducible cAMP early repressor inhibits growth of vascular smooth muscle cells.
- ⑦ 22nd International Society of Hypertension Meeting (2008 年 6 月 16 日-19 日、ベルリン)
 - ・ Ichiki T, Tian Q, Imayama I, Sunagawa K. Telmisartan Inhibits Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-6 expression through PPAR γ . *J Hypertens* 2008;26:S314
 - ・ Miyazaki R, Ichiki T, Sunagawa K. SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression . *J Hypertens* 2008;26:S521
- ⑧ AHA Scientific Sessions 2008 (2009 年 11 月 9 日-11 日、ニューオーリンズ)
Ichiki T, Tian Q, Imayama I, Sunagawa K. Telmisartan Manifests Powerful Anti-inflammatory Effects Beyond Class Effects of Angiotensin II Type 1 Blocker by Inhibiting Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Interleukin 6 Expressions through Peroxisome Proliferator Activated Receptor Activation. *Circulation* 2008;118; S513
- ⑨ 第 72 回日本循環器学会 (2008 年 3 月 28-30 福岡)
市来俊弘、今山郁代、砂川賢二
Telmisartan inhibits TNFalpha-induced interleukin-6 expression in vascular smooth muscle cells.
- ⑩ 第 40 回日本動脈硬化学会 (2008 年 7 月 10 日-11 日、筑波) シンポジウム
市来俊弘 : Role and regulation of cAMP response element binding protein in the formation of vascular lesion
- ⑪ 第 31 回日本高血圧学会総会(2008 年 10 月 9 日-11 日、札幌)
 - ・市来俊弘、砂川賢二:テルミサルタンは peroxisome proliferators activated receptor gamma の活性化により腫瘍壊死因子によるインターロイキン 6 の発現を抑制する。
 - ・稲永慶太、市来俊弘、砂川賢二:レスベラトロールはアンジオテンシン II によるインターロイキン 6 の発現を抑制する。
- ⑫ 第 73 回日本循環器学会 (2009 年 3 月 20 -22 日、大阪)
 - ・ Miyazaki R, Ichiki T, Takeda K, Inanaga K, Hashimoto T, Matsuura H, Sunagawa K. SIRT1, a Longevity Gene, Downregulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression. *Circ J* 2009; 73:392
 - ・ Inanaga K, Ichiki T, Takeda K, Miyazaki R, Hashimoto T, Matsuura H, Sunagawa K. A novel anti-inflammatory effect of resveratrol through suppression of AngiotensinII-induced Hypertension and Interleukin-6 production. *Circ J* 2009; 73:392
 - ・ Takeda K, Ichiki T, Inanaga K, Hashimoto T, Matsuura H, Miyazaki R, Sunagawa K. Prolyl hydroxylase inhibitors attenuated acute inflammatory responses hypoxia-inducible factor independent

manner. Circ J 2009; 73:218

- Myazaki R, Ichiki T, Takeda K, Inanaga K, Hashimoto T, Matsuura H, Sunagawa K. Cholinergic Stimulation by Donepezil is a Novel Antiangiogenic approach. Circ J 2009; 73:627
- Inanaga K, Ichiki T, Takeda K, Myazaki R, Hashimoto T, Matsuura H, Sunagawa K. Cholinergic stimulation by donepezil as a novel antiatherosclerotic treatment. Circ J 2009; 73:715

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市来 俊弘 (ICHIKI TOSHIHIRO)
九州大学・医学研究院・客員准教授
研究者番号：80311843

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

江頭 健輔 (EGASHIRA KENSUKE)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：60260379