

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07900

研究課題名(和文)新規血管作動性物質の動脈硬化促進機序の解明と虚血性心疾患のバイオマーカーへの応用

研究課題名(英文) Investigation of novel vasoactive agents as biomarkers for ischemic heart disease.

研究代表者

佐藤 健吾 (SATO, Kengo)

北海道大学・大学病院・臨床検査技師

研究者番号：70549930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： β -EndorphinおよびLipocalin-2はヒトマクロファージにおけるマクロファージの泡沫化、ヒト血管平滑筋細胞の遊走、ヒト単球の血管内皮細胞への接着を促進した。 β -EndorphinもしくはLipocalin-2を動脈硬化自然発症モデル動物のアポE欠損マウスへ投与すると大動脈硬化病変は有意に促進した。また、血中の β -EndorphinおよびLipocalin-2は急性冠症候群患者において増加しており、虚血性心疾患患者における動脈硬化のバイオマーカーになる可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界の死因の第1位は、動脈硬化に起因する「虚血性心疾患」である(本邦においても極めて多い)。これまで様々な対症療法が開発・施行されてきたが、本死亡数を減少させるには至っていない。本研究では、 β -EndorphinおよびLipocalin-2は動脈硬化促進作用がある事を明らかにした。また、血中の β -EndorphinおよびLipocalin-2が虚血性心疾患のバイオマーカーとなり得る可能性を見出した。故に、本研究は、虚血性心疾患の予防・治療に大いに貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)： β -Endorphin and Lipocalin-2 promoted foam-cell formation in human macrophages. The migration was stimulated by β -Endorphin and Lipocalin-2 in human vascular smooth muscle cell. β -Endorphin and Lipocalin-2 increased THP-1 monocyte adhesion to human endothelial cells. Four-week-infusion of β -Endorphin or Lipocalin-2 into apolipoprotein E-deficient mice accelerated the development of aortic atherosclerotic lesions. In acute coronary syndrome (ACS) patients, serum β -Endorphin and Lipocalin-2 levels were increased. Thus, β -Endorphin and Lipocalin-2 may become candidates for biomarker of atherosclerosis in patients with ischemic heart disease.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 血管作動性物質 虚血性心疾患 バイオマーカー 血管内皮細胞 マクロファージ 血管平滑筋細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

WHOの最新データによると、冠動脈の動脈硬化に起因する虚血性心疾患による死亡者数が世界一である。また、本邦においても虚血性心疾患による死亡が極めて多いのが現状である。これまで様々な対症療法が開発・施行されてきたが、本死亡数を減少させるには至っていない。さらに、虚血性心疾患の予測因子として炎症を反映する高感度CRPやPentraxin-3が検討されてきたが、これに勝るより信頼できるバイオマーカーの発見には未だに至っていない。

2. 研究の目的

国民の健康維持・増進のため、次世代の動脈硬化の早期診断および有効な予防・治療法の開発が強く望まれる。故に我々は本研究で、動脈硬化との関連が示唆された血管作動性物質 (-Endorphin、Lipocalin-2) の虚血性心疾患のバイオマーカーになる可能性を模索する。

3. 研究の方法

動脈硬化病変形成には、血管内皮細胞の炎症、単球接着、マクロファージの泡沫化、血管平滑筋細胞の遊走・増殖・細胞外マトリックス産生が極めて重要である。そこで、以下の(1)~(3)の方法で、-EndorphinおよびLipocalin-2の動脈硬化病変形成への制御作用および分子機構を検討した。

(1) in vitro (細胞実験)

ヒト培養血管細胞での発現およびその受容体の発現、培養ヒト血管内皮細胞の接着因子(ICAM-1、VCAM-1、E-selectin)の発現、単球-内皮接着能、酸化LDLによる培養ヒト単球由来マクロファージの泡沫化、関連遺伝子(ACAT-1、CD36、ABCA-1)発現、炎症性フェノタイプ、ヒト培養大動脈平滑筋細胞の遊走・増殖・細胞外マトリックスに対する制御作用を検討した。

(2) in vivo (動物実験)

動脈硬化モデル動物の*Apoe*欠損マウスに浸透圧ポンプを用いて -EndorphinもしくはLipocalin-2を4週間投与した。マウス大動脈の動脈硬化病変、単球/マクロファージの浸潤、血管炎症、血管平滑筋細胞の増殖、血中パラメーター等の測定を行った。

(3) 臨床研究

虚血性心疾患におけるバイオマーカーとしての有用性を検討するため、健常者10名および急性冠症候群(急性心筋梗塞および不安定狭心症)患者20名において、-EndorphinおよびLipocalin-2の血中濃度をELISAで比較した。

4. 研究成果

(1) in vitro (細胞実験)

ヒト培養細胞における内因性および受容体の発現

-Endorphin受容体、Lipocalin-2、Lipocalin-2受容体は、THP-1(単球)、THP-1由来マクロファージ、ヒト大動脈平滑筋細胞(HASMC)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に発現していた。-Endorphin受容体においては、ヒト大動脈内皮細胞にも発現を確認した。

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)への作用

-EndorphinおよびLipocalin-2は、HUVECにおいてTNF-誘導性の*ICAM1*、*VCAM1*、*SELE*(E-selectin遺伝子)mRNAおよびタンパク質発現を促進し、それにはnuclear factor- κ B(NF- κ B)とp38のリン酸化促進が関与していた。また、実際にHUVECへのTHP-1細胞(単球)の接着を促進した。HUVECの増殖は、-Endorphinでは促進し、一方Lipocalin-2では抑制されたが、どちらもアポトーシスには影響していなかった。

培養ヒトTHP-1細胞およびTHP-1細胞由来マクロファージへの作用

-EndorphinおよびLipocalin-2は、泡沫促進性分子であるCD36、ACAT-1の発現促進(ABCA-1の発現には影響しなかった)を介して、THP-1細胞由来マクロファージの泡沫化を促進した。また、動脈硬化病変形成にはマクロファージの炎症性フェノタイプも関与することから、THP-1細胞由来マクロファージの炎症性フェノタイプを検討したところ、両物質共に、マクロファージの分化自体に影響はないが、炎症性フェノタイプを炎症促進性のM1(MARCO発現を促進、Arginase-1発現を抑制)にシフトした。それにはNF- κ Bのリン酸化促進が関与していた。また、

PPAR- γ 発現は β -Endorphinでは変化がなかったが、Lipocalin-2では有意に減少した。

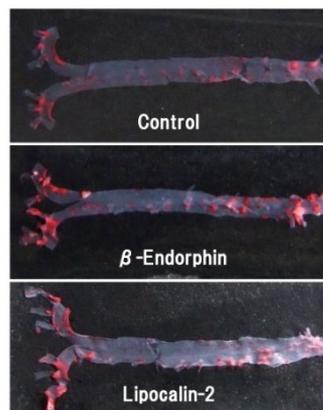
培養ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC) への作用

β -Endorphinは、HASMCの遊走・増殖を促進するが、それにはextracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、Aktのリン酸化、Bcl2発現を抑制、一方、c-jun N-terminal kinase (JNK)、p38、NF- κ Bのリン酸化、BaxおよびCaspase3の発現促進が関与しており、アポトーシスも誘導していた。Lipocalin-2は、HASMCの遊走を促進し、増殖に作用しなかったが、ERK1/2、Akt、JNK、NF- κ Bのリン酸化、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の発現を促進、一方、p38のリン酸化には影響しなかった。また、Lipocalin-2は、細胞外マトリックスであるFibronectin、collagen-3の発現には影響しなかったが、collagen-1発現を促進した。

(2) in vivoでの作用

動脈硬化自然発症モデル動物のApoE欠損マウスへの β -EndorphinもしくはLipocalin-2を4週間持続投与すると、食餌量、体重、収縮期血圧、拡張期血圧、血漿中のグルコースおよび総コレステロール値、中性脂肪、遊離脂肪酸、インスリン、HOMA-IR (インスリン抵抗性) に有意な違いは認めなかったが、 β -EndorphinもしくはLipocalin-2投与により大動脈硬化病変は有意に促進し (図1)、どちらも大動脈弁輪部の単球/マクロファージの浸潤、血管壁の炎症、プラークの不安定化も有意に促進していた。また、 β -Endorphin投与では血管平滑筋細胞 (VSMC) 含有量は抑制され、Lipocalin-2投与ではVSMC含有量およびCollagen-1発現が促進した。

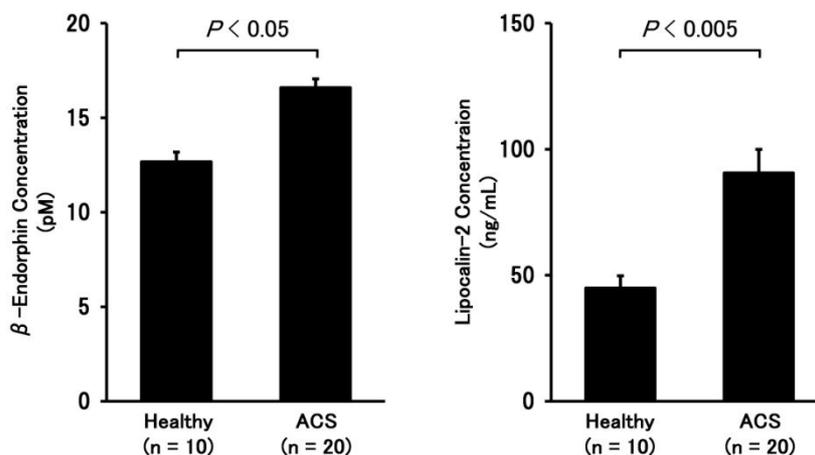
図1. β -EndorphinおよびLipocalin-2のApoE欠損マウスの動脈硬化病変促進作用



(3) 臨床研究 (虚血性心疾患患者における血中濃度)

β -Endorphin血中濃度は、健常者に比較して虚血性心疾患 (急性冠症候群) 患者では有意に増加していた ($P < 0.05$) (図2)。また、Lipocalin-2の血中濃度も同様に、健常者に比較して虚血性心疾患患者 (急性冠症候群) では有意に増加していた ($P < 0.005$) (図2)。よって、 β -EndorphinおよびLipocalin-2は虚血性心疾患の新しいバイオマーカーになる可能性が示唆された。

図2. 健常者 (Healthy) および急性冠症候群 (ACS) 患者における血中 β -EndorphinおよびLipocalin-2濃度の比較



以上、本研究では、新規血管作動性物質の β -EndorphinおよびLipocalin-2には動脈硬化に対する促進作用がある事を明らかにした。また、血中の β -EndorphinおよびLipocalin-2は動脈硬化のバイオマーカーとして臨床応用出来る可能性や、動脈硬化性疾患の治療薬へ発展出来る可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okano T, Sato K, Shirai R, Seki T, Shibata K, Koide A, Yamashita T, Hitomi T, Mori Y, Hirano T, Watanabe T.	4. 巻 2020
2. 論文標題 -Endorphin mediates the development and instability of atherosclerotic plaques.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 4139093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/4139093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shibata K, Sato K, Shirai R, Okano T, Seki T, Yamashita T, Ayaka A, Mutaumi M, Mori Y, Hirano T, Watanabe T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Lipocalin-2 exerts pro-atherosclerotic effects as evidenced by in vitro and in vivo experiments.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heart Vessels.	6. 最初と最後の頁 1012-1024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-020-01556-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe T, Sato K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Roles of the kisspeptin/GPR54 system in pathomechanisms of atherosclerosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutr Metab Cardiovasc Dis.	6. 最初と最後の頁 889-895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.numecd.2020.02.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ozawa N, Sato Y, Mori Y, Masuda H, Yamane M, Yamamoto Y, Shirai R, Watanabe R, Sato K, Mori Y, Hirano T, Watanabe T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Legumain Promotes Atherosclerotic Vascular Remodeling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20092195.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Yoshizawa H, Seki T, Shirai R, Yamashita T, Okano T, Shibata K, Wakamatsu MJ, Mori Y, Morita T, Matsuyama TA, Ishibashi-Ueda H, Hirano T, Watanabe T.	4. 巻 133
2. 論文標題 Chemerin-9, a potent agonist of chemerin receptor (ChemR23), prevents atherogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Sci (Lond).	6. 最初と最後の頁 1779-1796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/CS20190336.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiromura M, Mori Y, Saito T, Kushima H, Terasaki M, Kohashi K, Koshibu M, Sato K, Shirai R, Ohara M, Fukui T, Watanabe T, Hirano T.
2. 発表標題 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide ameliorates cardiac hypertrophy and fibrosis in diabetic db/db mice.
3. 学会等名 European Association for the Study of Diabetes (EASD) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	木庭 新治 (Koba Shinji) (20276546)	昭和大学・医学部・教授 (32622)	
研究分担者	渡部 琢也 (WATANABE Takuya) (30297014)	東京薬科大学・生命科学部・教授 (32659)	削除：2019年8月23日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------