

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590344

研究課題名（和文）アテローム血栓症の発症における新規骨代謝因子 OPG/RANKL システムの関与

研究課題名（英文）The role of OPG/RANKL system in the pathogenesis of atherothrombosis  
研究代表者

畠山 金太（HATAKEYAMA KINTA）

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：60325735

研究成果の概要（和文）：心筋梗塞や脳梗塞などのアテローム血栓症は、粥状動脈硬化巣（プラーク）の破綻に伴う血栓形成により発症する。本研究では、アテローム血栓症の発症における新規骨代謝因子 OPG/RANKL システムの関与について、剖検例の冠動脈と狭心症・心筋梗塞患者の冠動脈アテレクトミー標本および吸引血栓を用いて臨床病理学的検討を行う。さらに細胞培養、血栓イメージング法、動物実験により、OPG/RANKL システム発現調節機序の解明と OPG の血栓抑制作用の検討を行い、アテローム血栓症の新規治療薬としての可能性を探る。

研究成果の概要（英文）：(Purpus)Osteoprotegerin(OPG) is a decoy receptor for Receptor activator of NF- $\kappa$ B(RANKL), and act as RANK antagonist. In this study, the role of OPG/RANKL system in the pathogenesis of atherothrombosis was investigated. Using directional atherectomy(DCA) samples of angina pectoris patients(n=220), aspirated thrombi from coronary arteries of acute myocardial infarction(AMI) patients(n=100) and coronary arteries(n=60) from autopsy samples, we demonstrated that OPG/RANKL was overexpressed in the atherosclerotic lesions, and involved in the pathogenesis of atherothrombosis/acute coronary syndromes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：動脈硬化、血栓症、病理学、心筋梗塞、OPG/RANKL system

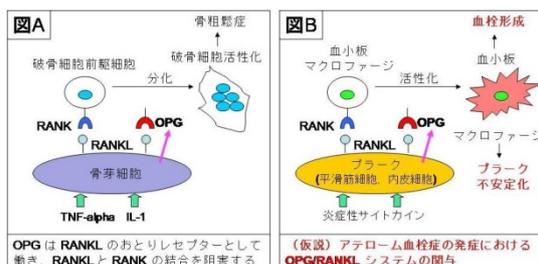
## 1. 研究開始当初の背景

アテローム血栓症は死因の上位を占め、その病態の解明と予防・治療法の確立は医学のみならず社会的にも急務の課題となってい

る。アテローム血栓症の発症における血栓形成には、血小板の活性化が重要である。我々はこれまでに、血小板の凝集阻止に作用する Ecto-ATPase/CD39 や ADAMTS-13 のプラーク

あるいは血栓内での発現を検討し、アテローム血栓症の発症・予防について研究してきた。しかし血管内腔で血小板凝集が促進し、血栓が成長していく機序についてはまだ解明されていない。

Osteoprotegerin (OPG) はヒト胎児肺線維芽細胞株の培養液から破骨細胞形成抑制因子として単離された TNF レセプタースーパーファミリーに属するサイトカインであり、Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANKL) のおとり受容体として RANKL の真の受容体である RANK と拮抗し、RANK より高い親和性で RANKL に結合することにより RANKL の活性を抑制する (図 A 参照)。これまでの研究から、骨芽細胞における OPG の産生と RANKL の発現のバランスにより、骨組織における破骨細胞の活性化が制御されていることが明らかとなり、OPG が骨粗鬆症をはじめとした骨吸収性疾患の新たな治療薬の候補として注目されている。一方、以前より動脈硬化症と骨粗鬆症の程度は相関することが知られており、動脈と骨の間には何らかのつながりが存在すると考えられていたが、その分子メカニズムは不明であった。近年、冠動脈狭窄や心不全の状態に比例して血中 OPG 濃度が増加し (Circulation 2006)、さらに心筋梗塞後の血中 OPG 濃度は予後を反映する (J Am Coll Cardiol 2004) ことが報告され、OPG/RANKL システムが骨代謝のみならず心血管系においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかし、動脈硬化症の進展およびアテローム血栓症の発症における OPG/RANKL システムの関与については不明である (図 B 参照)。



## 2. 研究の目的

これらの背景を踏まえ、以下の3つの目標を掲げ、本研究を遂行する。

(1) ヒトの病理組織標本を用いた解析: ヒト剖検症例冠動脈標本、狭心症患者の冠動脈アテレクトミー (DCA) 標本および心筋梗塞患者の冠動脈から採取された吸引血栓と血液を用いて、プラーク、非プラークおよび血栓における OPG/RANKL 発現とその局在を検討す

る。  
(2) 臨床データとの対比: これらの結果と臨床所見 (心筋梗塞・不安定狭心症 vs. 安定狭心症、再狭窄の有無と狭窄度) を比較検討し、心筋梗塞発症における OPG/RANKL システムの関与について検討する。心筋梗塞の危険因子 (糖尿病、高脂血症、高血圧、喫煙など) との関連性についても検討する。

(3) 培養細胞や動物実験など: プラークの構成細胞 (平滑筋細胞、内皮細胞、マクロファージ) における OPG/RANKL 発現の有無およびその発現調節についてヒト培養細胞を用いて明らかにする。また *In vitro* 血栓イメージング法 (フローチャンパー法) を用いて、血小板凝集および血栓形成に対する OPG の作用を検討する。さらに、家兔大腿動脈バルーン再傷害モデルを用いて、動脈硬化性血栓に対する OPG の作用を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 宮崎大学医学部附属病院および教育関連病院で施行される DCA 標本 220 例、心筋梗塞患者の冠動脈から採取される吸引血栓・血液サンプル 100 例およびヒト剖検症例冠動脈標本 60 例を用いて、冠動脈プラークと非プラークにおける OPG/RANKL 蛋白発現の局在を免疫組織化学的に検討し、同時に細胞レベルにおける mRNA 発現量および発現様式をリアルタイム PCR 法、マイクロディセクション法および *In situ* hybridization 法により検討し、動脈硬化巣の組織所見との関連を明らかにする。

(2) DCA 標本、吸引血栓・血液およびヒト剖検症例冠動脈標本での OPG/RANKL 蛋白/mRNA 発現および蛋白定量の結果と臨床所見 (不安定狭心症 vs. 安定狭心症、再狭窄の有無・程度との関連) を比較検討し、アテローム血栓症における OPG/RANKL システムの関与について検討する。また、糖尿病、高脂血症、高血圧、喫煙などの危険因子との関連性についても検討する。

(3) プラーク破綻後の血栓の成長における OPG/RANKL システムの関与を解明するために、*In vitro* 血栓イメージング法と家兔大腿動脈バルーン再傷害モデルを用いて血栓形成に対する OPG の作用を検討する。

病理学的検討に用いた一次抗体は抗 OPG 抗体、抗 RANKL 抗体、抗平滑筋細胞抗体 (smooth muscle actin)、抗マクロファージ抗体 (PGM-1/CD68、M2 マクロファージ抗体 CD163)、抗内皮細胞抗体 (CD34)、抗リンパ球抗体 (CD3e)。剖検例や吸引血栓では、定性的な検討を行い、DCA サンプルでは定量的検討を行い、臨床データとの比較検討も加

えた。

#### 4. 研究成果

1) 剖検例の冠動脈・大動脈硬化巣、狭心症患者の冠動脈における DCA 標本、心筋梗塞患者の冠動脈から吸引された血栓での OPG/RANKL 発現:

OPG/RANKL 発現は全ての動脈硬化巣および冠動脈血栓に存在した。OPG は平滑筋細胞、マクロファージ、内皮細胞に発現していた。硬化度が増すに従い、特に硝子化に伴いこれらの発現は減弱した。一方、RANKL は同様の細胞および間質にも陽性であった。

2) DCA 標本における OPG/RANKL 発現の定量的解析:

DCA 標本上における OPG/RANKL の陽性面積率の検討では、不安定狭心症患者において安定狭心症より優位に増加していた。プラーク内での OPG 発現の減弱と関連する危険因子は、アテローム血栓症の発症予防に大きく貢献できると期待されるが、我々の検討では、糖尿病と高脂血症が関与している可能性が示唆された。OPG/RANKL 発現はアテローム血栓症発症の予測因子の一つとなりえると期待される。

3) フローチャンバーにおける血小板血栓モデルを用いた検討では、OPG の添加の有無により血小板血栓の面積に変化は認めなかった。

4) マウス血栓モデルにおいても OPG の投与の有無により血栓形成に変化は認めなかった。

5) アンジオテンシン負荷マウスにおける心血管リモデリングを OPG が抑制した。

(結語)

このように本研究の結果は、アテローム血栓症における OPG の関与を明らかにするものであり、臨床面への応用も期待され、非常に意義のある研究と考えられる。

#### 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 15 件)

1) Nishihira K, Yamashita A, Ishikawa T, Hatakeyama K, Shibata Y, Asada Y: Composition of thrombi in late drug-eluting stent thrombosis versus de novo acute myocardial infarction. *Thromb*

*Res* 126: 254-7, 2010

2) Yano Y, Matsuda S, Hatakeyama K, Sato Y, Imamura T, Shimada K, Kodama T, Kario K, Asada Y: Plasma Pentraxin 3, but not High-sensitivity C-reactive Protein, is a Useful Inflammatory Biomarker for Predicting Cognitive Impairment in Elderly Hypertensive Patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65: 547-52, 2010

3) Ogawa T, Kawano Y, Imamura T, Kawakita K, Sagara M, Matsuo T, Kakitsubata Y, Ishikawa T, Kitamura K, Hatakeyama K, Asada Y, Kodama T: Reciprocal contribution of pentraxin 3 and c-reactive protein to obesity and metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1871-4, 2010

4) Tsuruda T, Hatakeyama K, Masuyama H, Sekita Y, Imamura T, Asada Y, Kitamura K: Pharmacological Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase Modulates Hypoxia Inducible Factor-1alpha in Rat Heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1274-80, 2009

5) Masuyama H, Tsuruda T, Sekita Y, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Stasch JP, Kitamura K: Pressure-independent effects of pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase on fibrosis in pressure-overloaded rat heart. *Hypertens Res* 32: 597-603, 2009

6) Sato Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Asada Y: Incidence of asymptomatic coronary thrombosis and plaque disruption: Comparison of non-cardiac and cardiac deaths among autopsy cases. *Thromb Res* 124: 19-23, 2009

7) Harada-Shiba M, Takamisawa I, Miyata K, Ishii T, Nishiyama N, Itaka K, Kangawa K, Yoshihara F, Asada Y, Hatakeyama K, Nagaya N, Kataoka K: Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol Ther* 17: 1180-6, 2009

8) Nishihira K, Yamashita A, Imamura T, Hatakeyama K, Sato Y, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H, Kitamura K, Asada Y: Thioredoxin in coronary culprit lesions: possible

relationship to oxidative stress and intraplaque hemorrhage. *Atherosclerosis* 201: 360-7, 2008

9) 畠山金太、浅田祐士郎：腹部・胸部大動脈瘤 病理と臨床 29: 226-31, 2011

10) 畠山金太、浅田祐士郎：動脈硬化の炎症 ヒトの病理からみた動脈硬化の進展機構についてー 血管医学 12: 41-50, 2011

11) 畠山金太、浅田祐士郎：冠動脈プラーク、血栓と PTX3 生体試料分析 33:347-54, 2010

12) 鶴田敏博、畠山金太、北村和雄：特集大動脈疾患 マスト細胞と大動脈疾患 日内会誌 99: 245-50, 2010

13) 山下 篤、佐藤勇一郎、畠山金太、浅田祐士郎、心・脳・末梢血管イベントにおけるリスクの違いを極める：解剖学的違いからみる *Vascular Medicine* 3: 99-105, 2009

14) 松田俊太郎、畠山金太、浅田祐士郎：病理学的に見た冠動脈疾患における炎症の役割について 最新医学 63: 1544-8, 2008

15) 畠山金太、浅田祐士郎：急性心筋梗塞と血栓吸引療法、病理と臨床 12: 1279-85, 2008

〔学会発表〕(計7件)

1) Hatakeyama K, Matsuura Y, Imamura T, Tsuruda T, Nishihira K, Shibata Y, Kodama T, Asada Y : PTX3 is involved in the pathogenesis of unstable plaque associated with intraplaque hemorrhage. *European Society of Cardiology Congress (Stockholm, 8/28-9/1/2010)*

2) Sakamoto S, Tsuruda T, Hatakeyama K, Sekita Y, Imamura T, Asada Y, Kitamura K : Site specificity of adventitial inflammation during the development of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *European Society of Cardiology Congress (Stockholm, 8/28-9/1/2010)*

3) Hatakeyama K, Kato Y, Kaneko MK, Ishikawa T, Nishihira K, Shibata Y, K. Inoue

S, Ozaki Y, Asada Y : Enhanced expression of podoplanin in advanced atherosclerotic plaques is involved in coronary thrombus formation in acute myocardial infarction. *14<sup>th</sup> World Congress on Heart Disease, International Academy of Cardiology Annual Scientific Sessions. (Tronto, Canada, 7/26-28/2008)*

4) Matsuura Y, Imamura T, Hatakeyama K, Tsuruda T, Nishihira K, Shibata Y, Kitamura K, Asada Y : Analysis of plaque composition in culprit lesion obtained by directional coronary atherectomy; From viewpoints of gender difference. 第73回日本循環器学会総会 (大阪、2009/3/21)

5) Yamashita A, Nishihira K, Hatakeyama K, Shibata Y, Asada Y : Composition of thrombi in late drug-eluting stent thrombosis versus de novo acute coronary thrombosis. 第56回日本病理学会秋期特別総会 (北九州、2010/11/25-26)

6) 山下 篤、西平賢作、畠山金太、松田俊太郎、柴田剛徳、浅田祐士郎：遅発性薬剤溶出ステント血栓の病理組織所見、第33回日本血栓止血学会学術集会(鹿児島、2010/4/22-24)

7) 畠山金太、浅田祐士郎：自然免疫と血栓形成、動脈硬化の進展と血栓症におけるマクロファージの関与、第32回日本血栓止血学会学術集会 SPC シンポジウム(北九州、2009/6/4-6)

〔図書〕(計3件)

1) 畠山金太、松浦祐之介、浅田祐士郎：血管糖尿病 2011 : 糖尿病性大血管合併症 冠動脈、pp31 - 7 (分担執筆) フジメディカル出版、2011年

2) 畠山金太、浅田祐士郎：新・心臓病診療プラクティス15 : 血管疾患を診る治す、pp94 - 101 (分担執筆) 文光堂、2010年

3) 畠山金太、浅田祐士郎：新・心臓病診療プラクティス14 : 心血管イベントのリスクファクターとその管理、pp58 - 63 (分担執筆) 文光堂、2009年

〔産業財産権〕

取得状況 (計1件)

名称：ペントラキシン3またはペントラキシン3変異体を含む、血小板凝集抑制剤、血栓形成剤および循環器疾患の治療薬

発明者：浅田祐士郎、畠山金太、今村卓郎、後藤清香、児玉龍彦、相良三奈

権利者：国立大学法人 宮崎大学

株式会社ベルセウスプロテオミクス

番号：特願 2008-255988

(整理番号：JP7802PPM)

出願年月日：2008/10/01

国内外の別：国内

国際特許分類 A61K 38/00

A61K 45/00

A61P 7/02

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畠山 金太 (HATAKEYAMA KINTA)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：60325735

### (2) 研究分担者

丸塚 浩助 (MARUTSUKA KOSUKE)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：00239154

佐藤 勇一郎 (SATO YUICHIRO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90347055

今村 卓郎 (IMAMURA TAKURO)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：60203329

鶴田 敏博 (TSURUDA TOSHIHIRO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10389570

### (3) 連携研究者

研究者番号：