

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790530

研究課題名（和文）血管内皮-単球の相互作用の制御による新規抗動脈硬化療法の検討

研究課題名（英文）To discover a novel therapy for preventing atherosclerosis by modulating the interaction between endothelial cell s- monocytes

研究代表者

安田 知行 (YASUDA TOMOYUKI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20457047

研究成果の概要（和文）：動脈硬化発症における血管内皮特異的接着因子(ESAM)の役割を検証した。ESAM/ apoE double KO(DKO)マウスを作成し、対照群である apoE KO マウスと動脈硬化進展の比較検討を行い、細胞実験にて、ESAM 発現抑制による炎症細胞の浸潤を検討した。DKO マウスにて有意に動脈硬化病変は減少し、ESAM の発現低下により炎症細胞の侵入の低下を認めた。我々は ESAM 抑制療法が、新規の抗動脈硬化療法になりうることを動物モデルにおいて証明した。

研究成果の概要（英文）：Our aim is to analyze the effect of ESAM on the progression of atherosclerosis. We generated ESAM / apoE double knockout mice and analyzed atherosclerosis lesion size. We also generated ESAM expression reduced endothelial cell by SiRNA method. We found that ESAM inhibition reduced the invasion of monocytes through endothelial cells and ESAM deficiency reduced atherosclerosis in apoE knockout mice. ESAM inhibition might be a novel therapy for preventing atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：循環器・高血圧、細胞・組織、内科

1. 研究開始当初の背景

近年我々は、血管内皮細胞が管腔を形成

する際に発現が変化する遺伝子を解析する過程において、新規の免疫グロブリン様接着分子をクローニングし、血管内皮特異的接着分子 (endothelial cell-selective adhesion molecule; ESAM) と名付けた。ESAM は現在知られている全ての分子の中で最も血管内皮細胞に特異的に発現している接着分子であり、成熟した内皮細胞の特異的マーカーであるとも言える。

ESAM の主な機能は、内皮細胞の接着と遊走、単球との接着、および血管透過性を制御することであり、この機序を介して血管新生や炎症の成因病態に深く関与している。ESAM を過剰発現させた血管内皮細胞は管腔形成が促進されるのに対して、ESAM を欠失させた血管内皮細胞は管腔形成が抑制される。一方、ESAM は血管内皮細胞と白血球との間の接着因子としても機能している。ESAM を細胞に過剰発現させると、培養単球/マクロファージとの接着が亢進し、反対に ESAM を阻害すると細胞接着は抑制される。このことは白血球に ESAM と heterophilic に結合するリガンドが存在することを示唆している。

さらに我々は、ESAM ノックアウトマウスを作製した。ESAM をノックアウトしても生理的な胎生期の脈管新生/血管新生は障害されない。しかし、ESAM ノックアウトマウスは、生後に生じる病的な血管新生が抑制されるという極めてユニークな特徴を示す。すなわち、人工的に接種した腫瘍内の血管増生が抑制され、腫瘍の成長が抑制される。この機序は、ESAM の欠損により血管内皮細胞の遊走・増殖が阻害され腫瘍血管新生が抑制されたことによるものであった。また、ESAM ノックアウトマウ

スでは炎症部位での好中球や単球/マクロファージの浸潤が抑制される。

このように ESAM は血管新生、血管透過性、炎症細胞の血管外への浸潤に深く関与している。これらの現象は動脈硬化や急性冠症候群の成因における重要な過程であることから、ESAM は動脈硬化の進展に重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに、ESAM 発現を制御して血管内皮細胞の動態や炎症細胞浸潤を選択的に制御することができれば、ESAM は動脈硬化性疾患に対する有用な分子標的のひとつになると期待される。そこで、本研究では ESAM を分子標的とした動脈硬化の成因と、ESAM 阻害による動脈硬化抑制効果の可能性を検討することを目的とする。

2. 研究の目的

高脂血症・動脈硬化モデルである apoE ノックアウトマウスと我々の作製した ESAM ノックアウトマウスを交差交配し、ESAM/apoE ダブルノックアウトマウスを作製し、大動脈粥状硬化病変の程度を比較検討する。また、動脈硬化病巣におけるマクロファージの含有量を比較検討する。

3. 研究の方法

(1) ESAM/apoE ダブルノックアウトマウスを用いた動脈硬化病巣の解析

高脂血症・動脈硬化モデルである apoE ノックアウトマウスと ESAM ノックアウトマウスを交差交配し、ESAM/apoE ダブルノックアウトマウスを作製する。得られたマウスを正常食または高脂肪食で 16 週間飼育した後、大動脈粥状硬化病変の程度を SudanIII 染色にて比較検討する。また、動脈硬化病巣にお

けるマクロファージの含有量を比較検討するとともに、動脈硬化病巣の構成成分について詳細な組織学的観察を行う。

(2) SiRNA の手法を用いた ESAM 発現抑制による炎症細胞浸潤の検討

元来 ESAM を発現している血管内皮細胞に SiRNA の手法を用い、ESAM の発現量を特異的に低下させ、THP-1 細胞を加えて、血管内皮細胞間の THP-1 細胞の移動量を測定した。

4. 研究成果

ESAM/ApoE double knockout (DKO) マウスを作成し、動脈硬化病巣面積・病変における炎症細胞の割合・接着分子の発現を比較した。DKO マウスでは、対照群の ApoE KO マウスと比べて、血漿コレステロール値が高値にも関わらず、動脈硬化病巣の進展が有意に抑制されていた。さらに、DKO マウスの動脈硬化病巣ではマクロファージ含有量が有意に減少していた。

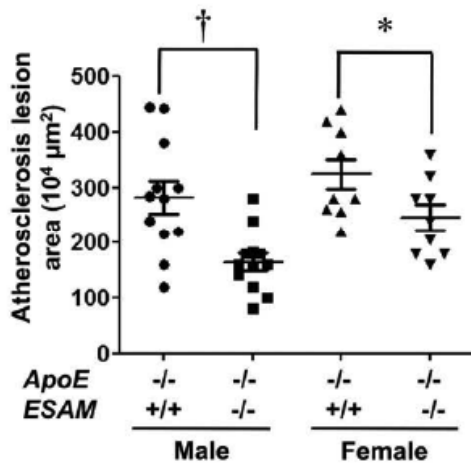


図1 マウス大動脈弁部位の動脈硬化面積 ESAM 欠損において、性別に関係なく、apoE 欠損マウスの動脈硬化進展を抑制した。

また、動脈硬化病変における既知の接着分子の発現は両群間で差を認めなかった。次に、ESAM の炎症細胞浸潤における役割を検証するため、炎症刺激後の腹腔マクロファージ浸潤量を測定した。さらに、培養血管内皮細胞にて ESAM を siRNA の手法を用いて発現抑制し、培養単球細胞の接着及び遊走を対照群である ESAM 正常発現内皮細胞と比較した。ESAM KO マウスでは炎症刺激後の腹腔マクロファージ浸潤が減少し、ESAM を発現抑制した内皮細胞は単球細胞との接着・遊走が減少していた。

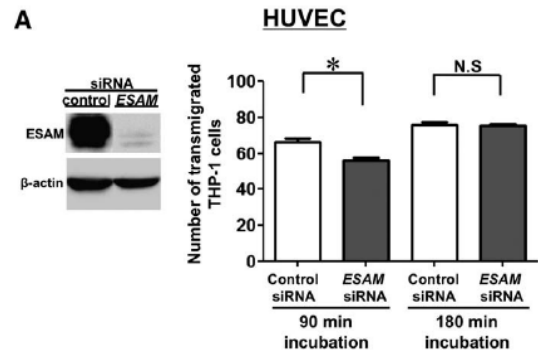


図2 THP-1 細胞(単球細胞)の遊走 SiRNA による HUVEC(血管内皮細胞)の ESAM 発現抑制において、THP-1 細胞の遊走が減少した。

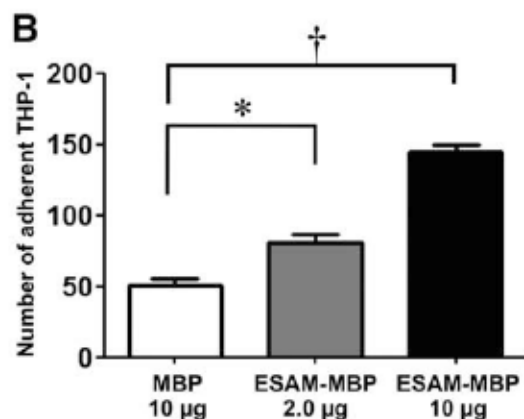


図3 THP-1 細胞(単球細胞)の接着 ESAM 蛋白を付着させた培養ディッシュに THP-1 細胞を加えて、接着した THP-1 細胞量を測定した。ESAM 量依存性に THP-1 の接着が増加した。

これらの結果から、ESAM は血管内皮同士の接着のみならず、単球/マクロファージの接着・遊走を制御していることが明らかになった。我々は ESAM の発現低下により炎症細胞の侵入、さらに ESAM 欠損により動脈硬化の進展が抑制されることを発見した。

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 1 件)

Inoue M, Ishida T, Yasuda T, Toh R, Hara T, Cangara HM, Rikitake Y, Taira K, Sun L, Kundu RK, Quertermous T, Hirata KI. Endothelial cell-selective adhesion molecule modulates atherosclerosis through plaque angiogenesis and monocyte-endothelial interaction. *Microvasc Res.* 2010 Apr 18. [Epub ahead of print] 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

Inoue M, et al. Role of endothelial cell-selective adhesion molecule in the progression of atherosclerosis. American Heart Association Scientific Sessions 2008 2008.11.10 New Orleans, LA

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 知行 (YASUDA TOMOYUKI)
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号：20457047

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

石田 達郎 (ISHIDA TATSURO)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00379413