

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790532

研究課題名（和文）動脈硬化プラーク破綻におけるレニン・アンジオテンシン系の役割に関する研究

研究課題名（英文）Role of renin-angiotensin system on atherosclerotic plaque rupture

研究代表者

鈴木 純（SUZUKI JUN）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40452693

研究成果の概要（和文）：アンジオテンシン 1 型（AT<sub>1a</sub>）受容体遺伝子欠損マウスでは、対照マウスに比し動脈硬化プラークの破綻率が有意に抑制されており、プラーク内の脂肪沈着、マクロファージ浸潤、酸化ストレス、細胞外基質分解酵素活性の低下を伴っていた。AT<sub>1a</sub> 受容体刺激は動脈硬化巣における炎症、酸化ストレス、細胞外基質分解酵素の活性化を引き起こし、動脈硬化プラークの脆弱化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。AT<sub>1a</sub> 受容体遮断によって、動脈硬化プラークの破綻を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The incidence of plaque rupture was significantly reduced in Apolipoprotein E (ApoE)/Angiotensin II type 1a receptor (AT<sub>1a</sub>R) double knockout mice compared with ApoE knockout mice. Lipid accumulation, macrophage infiltration into the plaque, superoxide anion production, and matrix metalloproteinase activity were markedly attenuated in ApoE/AT<sub>1a</sub>R knockout mice compared with ApoE knockout mice. These findings suggest that AT<sub>1a</sub>R blocking could decrease the incidence of atherosclerotic plaque rupture, and that AT<sub>1a</sub>R mediated inflammation, oxidative stress, and MMP activation may have an important role in plaque vulnerability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：分子血管病態学

## 1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患の病態解明が進み、急性冠症候群の多くが冠動脈プラークの破綻やびらんに伴う血栓形成を引き金に発症することが明らかになってきた。従って、いかにプラークの破綻を予防するかが急性心筋梗塞の発症を低下させる1つの鍵であると考えられる。病理学的には、炎症細胞浸潤を伴った大きな脂質コアと薄い線維性被膜をもつプラークが脆弱であるとされている。しかしながら、プラークの破綻を予測して捉えることは時間的にも空間的にも困難であることから、プラークの破綻を対象とした研究は十分にされていないのが現状であり、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

これまで申請者らは、マウスを用いて動脈硬化における RA 系の役割を検討してきた。結果、アンジオテンシン 1 型 ( $AT_{1a}$ ) 受容体刺激が血管傷害後の新生内膜増殖促進、2 型 ( $AT_2$ ) 受容体刺激が新生内膜増殖抑制に作用することが明らかになった。また、アポリポ蛋白 E 欠損 (ApoE KO) マウスに高脂肪食を与えることで形成される動脈硬化病変は、 $AT_2$  受容体遺伝子欠損により増大することを示した。さらに、同モデルにおける動脈硬化病変の形成には酸化ストレスや炎症が深く関与しており、これらの変化は  $AT_{1a}$  受容体遮断やアルドステロン受容体遮断によって抑制されることを明らかにした。上記の結果は、レニン・アンジオテンシン (RA) 系が酸化ストレスや炎症を介して動脈硬化の発症や進展に重要な役割を果たしており、特に  $AT_{1a}$  受容体刺激は動脈硬化促進に、 $AT_2$  受容体刺激はこれに拮抗的に作用する可能性を示唆している。マクロファージを介した炎症機構や組織傷害は、プラークの破綻に大きな役割を果たしていると考えられる。これまでの申請者らの研究成果を踏まえ、炎症反応を修飾する RA 系は動脈硬化の発症や進展のみならず、プラークの破綻にも深く関与している可能性があると考えに至った。近年、ApoE KO マウスを用いた種々のプラーク破綻モデルが報告されている。本研究では、これらのモデルを用いて RA 系 (特に  $AT_{1a}$  受容体) の役割を中心としたプラーク破綻機構の一端を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) プラーク破綻モデルマウスの作成

生後9週齢の ApoE KO、ApoE/ $AT_{1a}$  double KO マウスに麻酔を行った後、総頸動脈の分岐部直下を結紮した。4週後に結紮した総頸動脈の近位部に内径 0.58 mm、長さ 2 mm のポリエチレンカフを留置した (図1)。

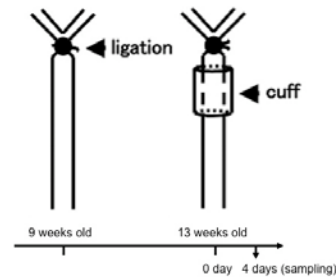


図1 動脈硬化プラーク破綻モデル

### (2) プラークの組織学的検討

カフ留置直前、カフ留置4日後の ApoE KO、ApoE/ $AT_{1a}$  double KO マウスに麻酔を行った後、4%パラホルムアルデヒドで還流固定した。摘出した総頸動脈を用いて以下の項目を評価し、両群間で比較検討を行った。

A. プラーク破綻、脂肪沈着: HE 染色、Oil red O 染色により、プラーク破綻率、脂肪沈着の程度を評価した。

B. 酸化ストレス: 酸化ストレスの指標として、組織内の  $O_2^-$  の産生をジヒドロエチジウム染色により評価した。

C. 炎症性サイトカイン、ケモカインの発現: 摘出した総頸動脈から mRNA を抽出し、炎症性サイトカイン、ケモカインの発現をそれぞれ real-time PCR によって検出、定量評価した。

D. 免疫組織化学染色による評価: プラーク内におけるマクロファージは、F4/80 抗体を用いて同定した。また、炎症性サイトカインの局在は特異抗体を用いて評価した。

E. 細胞外基質分解酵素 (MMP) 活性: 組織内の MMP 活性は、DQ-gelatin を用いた in situ zymography で評価した。

### (3) マウス腹腔マクロファージの採取

生後9週齢の ApoE KO、ApoE/ $AT_{1a}$  DKO マウスの腹腔内常在マクロファージを生理食塩水で回収し、遠心後に 10%ウシ胎児血清入り



スカベンジャー受容体、炎症性サイトカイン、MMPの発現を real-time PCR で検討した。ApoE KO マウスでは、LPS 刺激によってスカベンジャー受容体 A、LOX-1、TNF- $\alpha$ 、MMP-2 の mRNA 発現が著明に亢進していたのに対し、ApoE/AT<sub>1a</sub> double KO マウスではこれらの発現が抑制されていた。マクロファージの遊走能、貪食能については現在解析中である。

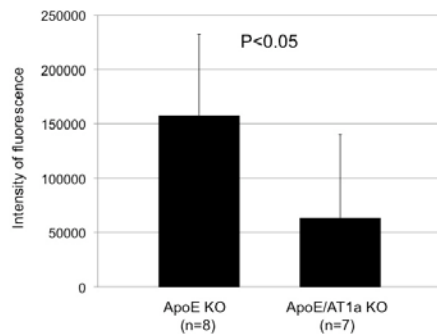


図6 プラーク組織内のMMP活性

以上の結果により、AT<sub>1a</sub> 受容体刺激は動脈硬化薬における炎症、酸化ストレス、細胞外基質分解酵素の活性化を引き起こし、動脈硬化プラークの脆弱化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。AT<sub>1a</sub> 受容体遮断によって、動脈硬化プラークの破綻を抑制できる可能性が示唆された。

#### 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0件)

[学会発表](計1件)

青野 潤、鈴木 純、他  
 Angiotensin II Type 1a Receptor  
 Deficiency Attenuates Atherosclerotic  
 Plaque Rupture  
 23rd Scientific Meeting of the  
 International Society of Hypertension  
 2010年9月29日,バンクーバー カナダ  
 発表確定

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 純 (SUZUKI JUN)  
 愛媛大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号: 40452693