

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06395

研究課題名(和文) ヒト型動脈硬化ブタモデルを用いたメトトレキサートの動脈硬化増悪の機序解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of methotrexate arteriosclerosis exacerbation with human atherosclerosis pig model

研究代表者

川口 博明 (Kawaguchi, Hiroaki)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：60325777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト型動脈硬化マイクロミニピッグモデルを用いて、高脂肪高コレステロール食(HFCD)に抗がん剤メトトレキサート(MTX)を加え超短期間で動脈硬化を発生する。本研究では、さらに、抗葉酸代謝拮抗剤・ロイコボリン(LV)あるいは葉酸・フォリアミン(FA)を併用投与することによりMTXの動脈硬化増悪を抑えることができるかを検討した。

HFCDにMTXを追加投与することにより、体重増加、高コレステロール血症、高ホモシステイン血症を誘発し、その結果、動脈硬化が増悪した。この動脈硬化増悪はLVあるいはFA併用投与により抑制され(LV>FA)、その抑制機序は主に葉酸代謝異常の改善によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤は心血管毒性を有することが知られており、腫瘍循環器病学が注目されている。しかしながら、動脈硬化に対する抗がん剤の影響はまだ十分に解明されていない。本研究では、ヒト型動脈硬化マイクロミニピッグモデルに抗がん剤メトトレキサートを加えることで、超短期間で動脈硬化を増悪し、この増悪を抗葉酸代謝拮抗剤・ロイコボリンあるいは葉酸・フォリアミンの併用投与により抑制できる可能性を見出した。

ブタはヒトとの類似点が多いので、本研究の抗がん剤による動脈硬化の増悪、その増悪の回避策はヒトへの外挿やhuman equivalent doseに寄与し、医療に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Using an atherosclerosis microminipig (world smallest minipig) model, the anticancer drug methotrexate (MTX) was added to a high-fat high-cholesterol diet (HFCD) to determine the occurrence of atherosclerosis in an ultra-short period of time. In this study, we elucidated the mechanism of atherosclerosis exacerbation by MTX and investigated whether the combined administration of leucovorin (LV), an antifolate antimetabolite, or folic acid-foliamine (FA) could suppress atherosclerosis exacerbation of MTX. Additional administration of MTX to HFCD induced body weight gain, hypercholesterolemia and hyperhomocysteinemia, resulting in exacerbation of atherosclerosis. This atherosclerosis exacerbation was suppressed by LV or FA administration (LV>FA), suggesting that the mechanism of suppression is mainly due to improvement of folic acid metabolism abnormalities.

研究分野：実験病理学

キーワード：ミニブタ 動脈硬化 高コレステロール血症 メタボリックシンドローム 腫瘍循環器病学 脂質代謝 葉酸代謝 抗がん剤メトトレキサート

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

従来の動脈硬化モデル動物は遺伝子改変マウスが主流であったが、医薬品開発や病態解析においては、よりヒトに近いモデル動物が望まれていた。ブタは生理学的・解剖学的にヒトとの類似点が多く、我々は性成熟体重 10 kg 以下と超小型で取扱いが容易な世界最小国産ミニブタ「マイクロミニピッグ」がヒトに近い脂質代謝を有し、高脂肪高コレステロール食を 8 週間単独給餌することで大動脈、冠状動脈や脳底部動脈を含む全身の動脈にヒトに類似した動脈硬化病変を誘発することに世界で初めて成功し、この業績が評価され 2014 年に Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 賞を受賞した。さらに、高脂肪高コレステロール食 + NOS 阻害剤 (血管内皮障害) 投与モデルでは、大動脈の動脈硬化病変面積が高脂肪高コレステロール食単独モデルと比較して約 2 倍になり、動脈硬化病変を増悪させることに成功した。

また、高脂肪高コレステロール食に NOS 阻害剤などの負荷を加えることにより、短期間で動脈硬化を発生できるのではと着想し、高脂肪高コレステロール食にアンジオテンシン II (昇圧剤) あるいは L-NAME (NOS 阻害剤) を 2 週間反復負荷することにより、動脈硬化病変を短期間で増悪し発生することを見出した (2013 ~ 2015 年科研費 C 一般「医療機器開発のための動脈硬化マイクロミニピッグの作出」)。この超短期動脈硬化誘発モデルは抗がん剤の動脈硬化に対する増悪作用をスクリーニングできるモデルになると考えた。抗がん剤の多くは心血管を傷害し、心不全や血栓塞栓症で亡くなるケースが指摘されているが、その発生機序は十分に解明されておらず、これら循環器障害の主因である動脈硬化への影響も解明されていない。よって、我々が開発した超短期動脈硬化誘発モデルを用いて代表的な抗がん剤である「メトトレキサート (MTX)」をモデル動物に投与したところ、MTX が動脈硬化病変を増悪する知見を得た (2016 ~ 2018 年科研費 C 一般「マイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用いた葉酸欠乏による梗塞促進の機序解明」)。

一方、ヒト疫学調査により梗塞を促進する要因の 1 つとして高ホモシステイン血症が知られている。高ホモシステイン血症が血管や血管内皮に影響する動物実験の報告はあるが、血栓や血液の性状 (血小板機能や炎症性マーカー: IL-6、TNF) がより梗塞促進的に働くかなど十分には解明されていない (Fay EP, 2012)。我々は血栓形成がほとんどみられないマイクロミニピッグ動脈硬化モデルでは血中ホモシステイン濃度の上昇がみられないことを確認した。マイクロミニピッグの血中ホモシステイン濃度の正常値を確立後、ホモシステインの単回静脈内投与後の血中動態を解析し、投与後 2 時間程度で正常に戻ることで、ホモシステイン単回投与では持続的高ホモシステイン血症を誘発することは困難であることを確認した。葉酸はホモシステインの毒性を中和することが報告されており、世界 79 ヶ国で穀類への強制的葉酸添加が行われている (Chui R, 2010)。

よって、本研究では MTX が動脈硬化を増悪する機序の解明、さらに、抗葉酸代謝拮抗作用により MTX の動脈硬化増悪を抑えることができるかを検討することにより、腫瘍循環器病学の基盤研究に貢献する考えに至った。

### 2. 研究の目的

本研究ではヒト型動脈硬化モデルマイクロミニピッグを用いて、MTX が動脈硬化を増悪する機序を解明、さらに、抗葉酸代謝拮抗薬 (ロイコボリン: LV) および葉酸 (フォリアミン: FA) の投与により MTX の動脈硬化増悪を抑えることができるかを検討する。

### 3. 研究の方法

3.1. 動物: 雄マイクロミニピッグ、成獣 (6 ~ 7 か月齢)、平均体重  $10.6 \pm 0.85$  kg、12 頭 (統計処理を考慮した n 数)

#### 3.2. 実験デザイン・群編成

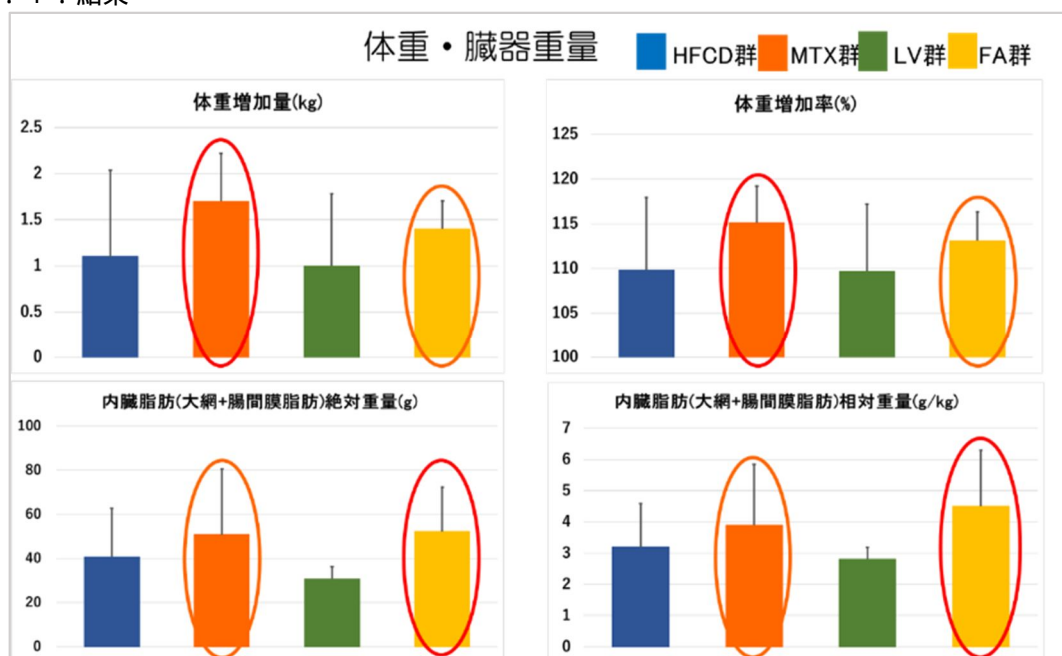
群	n	飼料*	投与・処置	試験期間
対照群	3	HFCD		2 週間
抗がん剤群	3	HFCD	MTX	2 週間
抗がん剤+抗葉酸拮抗剤群	3	HFCD	MTX+抗葉酸拮抗剤 (LV)	2 週間
抗がん剤+葉酸群	3	HFCD	MTX+葉酸 (FA)	2 週間

\*HFCD: ラード投与量 3.6 g/kg/日、コレステロール 0.15 g/kg/日、これらを普通食と混合し、全体が 300 g/body/日になるようミキサーを用いて攪拌混合、調整した。

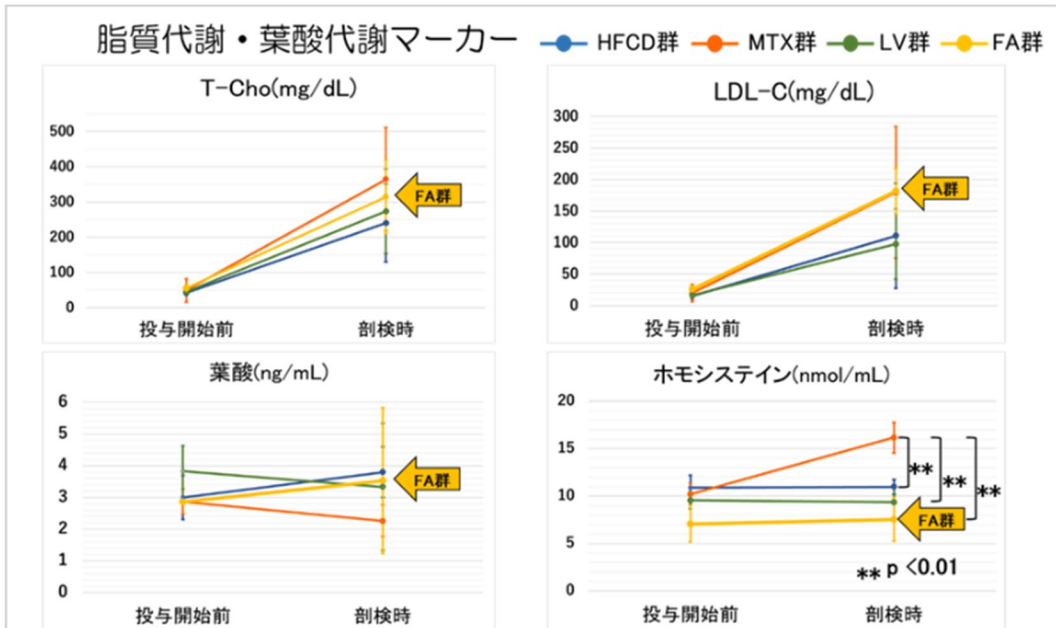
- 3.3. MTX 投与：医薬品インタビューフォームのヒト白血病における用法および用量（成人 5～10 mg を週 3～6 回経口投与する）に準拠して、0.2 mg/kg 体重/回に相当する投与量で毎日経口（混餌）投与する。
- 3.4. 葉酸投与：フォリアミン（FA）を成人の投与量 15 mg（MTX 診療ガイドラインより）を目安に MTX 投与前に毎日筋注投与する。
- 3.5. 抗葉酸拮抗剤投与：ロイコボリン（LV）を MTX 投与量の最低 3 倍量（メトトレキサート・ロイコボリン救援療法および MTX 診療ガイドラインより）を目安に MTX 投与前に毎日筋注投与する。
- 3.6. 検査項目
- ◆ 一般状態観察：毎日、一般状態を観察。
  - ◆ 体重測定：毎週、給餌前に測定。
  - ◆ 採血：毎週に頸静脈より採血する。採血量は 4.8 ml 以下/kg 体重。
  - ◆ 血液ヘマトロジー検査：貧血、血小板数などの評価、測定項目：赤血球数、白血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCV（平均赤血球体積）、MCH（平均赤血球ヘモグロビン量）、MCHC（平均赤血球ヘモグロビン濃度）、血小板数
  - ◆ 血液凝固系：PT（プロトロンビン時間）、APTT（活性化部分トロンボプラスチン時間）、T-TAS（total thrombus-formation analysis system）
  - ◆ 血液生化学検査：MTX 血中濃度、葉酸代謝マーカーの評価（ホモシステイン値、葉酸値）、脂質代謝マーカー（総コレステロール値、低比重リポ蛋白コレステロール、高比重リポ蛋白コレステロール、中性脂肪）、血中酸化ストレスの評価（d-ROMs テスト：酸化度、BAP テスト：抗酸化力）、炎症マーカー〔porcine C 反応性蛋白（CRP）、サイトカイン IL-6〕、血液凝固機能の評価（PT、APTT、T-TAS）、一般生化学（肝毒性：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\gamma$ -GTP、腎毒性：尿素窒素、クレアチニン、心筋毒性：クレアチンキナーゼ、乳酸脱水素酵素）。
  - ◆ 病理解剖：実験終了後は麻酔下放血による安楽死後、病理解剖を実施する。
  - ◆ 病理学的検査〔谷本〕：Oil red O 染色による大動脈における動脈硬化病変面積比の定量評価、全身組織の毒性病理評価（ヘマトキシリン・エオジン染色）、必要に応じて組織化学染色（アザン染色：膠原線維、エラスチカ・マッソン染色：弾性線維）、免疫組織化学染色（-SMA：平滑筋、Iba-1、Lysozyme：マクロファージ）。

#### 4. 研究成果

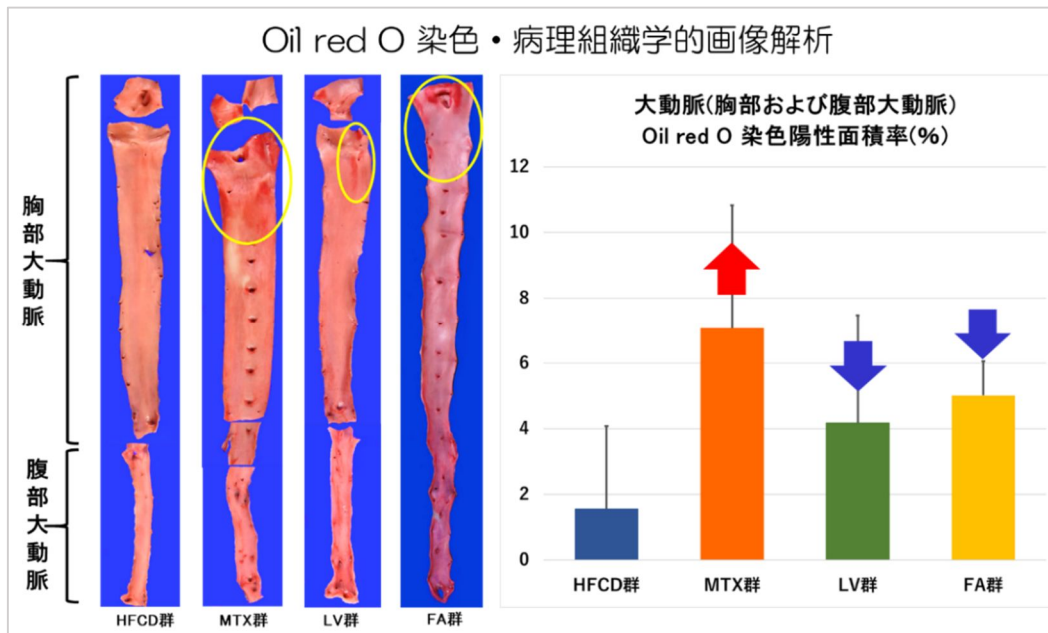
##### 4.1. 結果



MTX 投与では肥満、メタボリックシンドロームが増悪、LV 併用投与では、これらの増悪を抑制するが、FA 併用投与では抑制できない。



MTX 投与では高コレステロール血症・高ホモシステイン血症を増悪、LV 併用投与では、これらの増悪を抑制するが、FA 併用投与では高ホモシステイン血症増悪のみを抑制



MTX 投与では動脈硬化面積を増加、LV および FA の併用投与では動脈硬化面積を減少

結果のまとめの表	体重増加 高コレステロール血症	高ホモシステイン血症	動脈硬化病変
高脂肪高コレステロール食	誘発	誘発なし	誘発
高脂肪高コレステロール食 + メトトレキサート	増悪 ↑	誘発 ↑	増悪 ↑
高脂肪高コレステロール食 + メトトレキサート + ロイコボリン	抑制 ↓	誘発なし ↓	抑制 ↓
高脂肪高コレステロール食 + メトトレキサート + 葉酸(フォリアミン)	増悪 —	誘発なし ↓	抑制 ↓

- 葉酸投与でも、メトトレキサートによる動脈硬化増悪を抑制 (LV > FA)
- その機序は主に葉酸代謝異常の改善

## 4. 2. 研究成果のまとめ

HFCD 給餌により体重増加(内臓脂肪増加、メタボリックシンドローム)および高コレステロール(Cho)血症が誘発できたが、**群(MTX 投与)**が最も増悪し、葉酸代謝では葉酸値は低値傾向で高ホモシステイン(Hcy)血症を誘発し、大動脈の動脈硬化病変についても Oil red O 染色・組織ともに最も増悪した。これらに対して、**群(LV 投与)**では高 Cho 血症、高 Hcy 血症、体重増加および動脈硬化の増悪の抑制効果が最も高くみられ、**群(FA 投与)**では高 Hcy 血症および動脈硬化の増悪の抑制効果がみられた。

以上のことから、MMPig に HFCD に加え MTX を追加投与することにより、肥満、メタボリックシンドローム、高 Cho 血症、高 Hcy 血症を誘発し、その結果、動脈硬化が増悪した。この動脈硬化増悪は LV および FA 併用投与により抑制される(LV > FA)ことが示唆され、その抑制機序は主に葉酸代謝異常の改善であった。

### 【その他の研究成果】

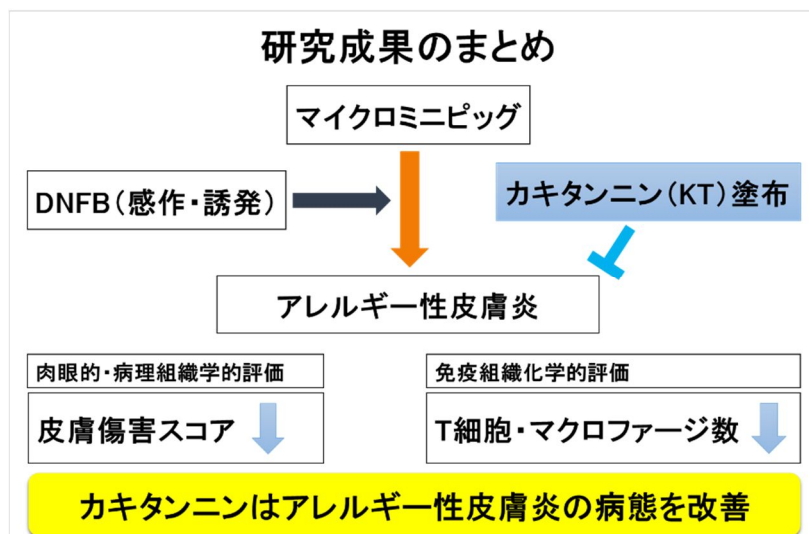
#### 1. マイクロミニピッグ DNFB アレルギー性皮膚炎モデルを用いた天然由来被験物質 KT の効能検討

近年、柿から抽出されたタンニンであるカキタンニン(以下:KT)が様々な生理活性を有することが示されている。しかしながら、皮膚炎に対する KT の効能に関する研究は少ない。そこで本実験では、マイクロミニピッグ DNFB (Dinitrofluorobenzene; ジニトロフルオロベンゼン)アレルギー性皮膚炎モデルを用いて KT の皮膚炎に対する効能を検討した。

4 頭の雄 MMPig (約 12 ヶ月齢)に対して、10%DNFB で左右耳介及び臀部の計 4 ヶ所に感作を行い、その 2 週間後に背側体幹の陰性対照を除いた試験部位(6×2cm 大)に対して 1%DNFB で皮膚炎を誘発した。試験部位は、陽性対照、~ KT 投与(KT 濃度は、0.02%、0.2%、2% w/w を設定)、陰性対照(非誘発)を左右体幹の 10 ヶ所に施行し、KT 塗布投与は誘発後 0.5h、24h、48h の 3 回行った。皮膚炎の評価は誘発前、誘発後 24h、48h、72h、96h、120h、144h、168h の肉眼による Draize (1944 年)の皮膚炎スコア(紅斑/痂痂形成、浮腫; Score 0~4 点)および誘発 48 時間後にパンチ生検で採取した組織の病理組織学的および免疫組織化学的評価(CD3 および Iba1)を行った。

その結果、KT 投与群では陽性対照群と比較して、Draize 総合スコア、皮膚病理組織学的総合評価スコア、皮膚傷害スコアが有意な低値あるいは低値傾向を示した。また各濃度の中でも最も各スコアが低かったのは、0.02% KT 投与群だった。このことから、肉眼的および病理組織学的に KT には皮膚炎に対しての抗炎症作用があることが明らかとなった。また、免疫組織化学的検査について、KT 投与群では陽性対照群と比較して CD3 陽性 T 細胞数、IBA1 陽性マクロファージ数の減少がみられたことから、KT は T 細胞およびマクロファージに影響し、炎症性変化を抑制することが示唆された。

結論として、本研究では KT が T 細胞およびマクロファージに作用し、結果的にアレルギー性皮膚炎の病態を改善したと考えられた。また、KT の作用機序としては、皮膚を通過した KT の有効成分が直接あるいは間接的に T 細胞およびマクロファージに作用する可能性や保護膜を形成することで皮膚バリア機能を改善し、炎症反応を抑制することが推察された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Masayoshi Otake, Hiroaki Kawaguchi, Satoko Enya, Akihisa Kangawa, Tadashi Koga, Kei Matsuo, Yamada Sohshuke, Md. Mahfuzur Rahman, Naoki Miura, Masatoshi Shibata, Akihide Tanimoto	4. 巻 35
2. 論文標題 High Pathological Reproducibility of Diet-induced Atherosclerosis in Microminipigs via Cloning Technology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2025-2033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12471	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 IJIRI MOE, LAI YU-CHANG, KAWAGUCHI HIROAKI, FUJIMOTO YOSHIKAZU, MIURA NAOKI, MATSUO TOMOHIDE, TANIMOTO AKIHIDE	4. 巻 35
2. 論文標題 NR6A1 Allelic Frequencies as an Index for both Miniaturizing and Increasing Pig Body Size	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 163-167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12244	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 Moe Ijiri, Kazuhiro Yoshinaga, Hiroaki Kawaguchi, Naoto Miyazaki, Maiko Kawaguchi, Yoshikazu Fujimoto, Tomohide Matsuo and Ikuro Maruyama.	4. 巻 37
2. 論文標題 In Vivo Metabolism of 1,5-Anhydro-D-fructose to 1,5-Anhydro-D-glucitol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1022-1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.13176	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田十喜子, 佐藤麗間, 田代秀樹, 安藤 亮, 岩井聡美, 朴 天鎬, 川口博明
2. 発表標題 ヒト型動脈硬化マイクロミニピッグを用いたメトトレキサートの動脈硬化増悪の機序解明
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口博明, 井尻萌, 松尾恵, 藤本佳万, 松尾智英
2. 発表標題 マイクロミニピッグDNFBアレルギー性皮膚炎モデルの開発
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井尻萌, Yu-Chang Lai, 三浦直樹, 藤本佳万, 松尾智英, 川口博明
2. 発表標題 ブタの大きさの指標としての多脊椎数関連遺伝子NR6A1の有用性
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口博明, 井尻萌, 松尾恵, 藤本佳万, 松尾智英
2. 発表標題 マイクロミニピッグDNFBアレルギー性皮膚炎モデルの確立
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤麗聞, 和田十喜子, 安藤 亮, 井尻萌, 松尾恵, 藤本佳万, 松尾智英, 岩井聡美, 朴 天編, 川口博明
2. 発表標題 マイクロミニピッグDNFBアレルギー性皮膚炎モデルを用いた天然由来被験物質KTの効能検討
3. 学会等名 第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 皮内鍼	発明者 川口博明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-011553	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ブタの初乳作出法	発明者 野口倫子、伊東正 吾、川口博明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6692037号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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	谷本 昭英  (Ttanimoto Akihide)  (10217151)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	
研究分担者	三浦 直樹  (Miura Naoki)  (80508036)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授    (17701)	
研究分担者	岩井 聡美  (Iwai Satomi)  (30566542)	北里大学・獣医学部・准教授    (32607)	
研究分担者	三好 和睦  (Miyoshi Kazuchika)  (70363611)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授    (17701)	

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
---------	---------