

機関番号：13802

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700447

研究課題名 (和文) 実験動物モデルを用いたプラーク破綻のメカニズム解明  
-カテプシンの関与-

研究課題名 (英文) The mechanism of atherosclerotic plaque disruption in experimental animal model. The concept of the involvement of cathepsins.

研究代表者

佐々木健 (SASAKI TAKESHI)

浜松医科大学 技術部 技術専門職員

研究者番号：20397433

研究成果の概要 (和文)：本研究では、心筋梗塞等の引き金となる動脈硬化巣(プラーク)破綻のメカニズムを解明することを目的とし、疾患動物モデルを用いてそのプラーク破綻におけるカテプシンの関与を検討した。その結果、プラーク破綻や脆弱化には、プラークに集簇するマクロファージにおいて発現されるカテプシンSの関与が強く示唆された。さらに、このマクロファージにおけるカテプシンSの発現にはレニン-アンギオテンシン系の関与が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Although it has been suggested that the renin-angiotensin (RA) system and cathepsins contribute to the development and vulnerability of atherosclerotic plaque, the interaction of the RA system and cathepsins is unclear. Thus, we investigated the effects of an angiotensin II type 1 receptor (AT1) antagonist, olmesartan, on the levels of cathepsins in brachiocephalic atherosclerotic plaque and plaque stabilization in apolipoprotein E (apoE)-deficient mice receiving a high-fat diet. Under a high fat diet, treatment with olmesartan (3 mg/kg per day) maintained collagen and elastin at high levels and attenuated the plaque development and cathepsin S (Cat S) level in the atherosclerotic plaque of apoE-deficient mice. The administration of olmesartan suppressed the accumulation of macrophages in plaque. Immunoreactivities of Cat S and AT1 were observed in macrophages. The amount of Cat S mRNA and the macrophage-mediated collagenolytic and elastolytic activities in cultured macrophages were increased by exposure to angiotensin II (Ang II), and these effects were diminished by olmesartan and the NADPH-oxidase inhibitor apocynin. These results suggested that Cat S derived from macrophages is involved in the mechanisms of atherosclerotic plaque vulnerability, and AT1 blocker maintained the plaque stabilization alongside the suppression of Cat S and macrophage activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：プラーク破綻、カテプシン、アンギオテンシン1型受容体、細胞外マトリックス、マクロファージ、動脈硬化症

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化巣の不安定プラークの破綻による閉塞性血栓の形成は、心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な疾患の引き金となることが知られているが、このプラーク破綻のメカニズムは依然として不明な部分が多い。その一因として、プラーク破綻に関する研究を行なう上での有効な疾患モデル動物が知られていないことがあった。しかしながら、最近、申請者や他の研究グループが、新規のプラーク破綻動物モデルを作成・発表した (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006、Circulation 2005)。

これらの動物モデルを用い、プラーク破綻のメカニズムに関する研究が行われつつあり、申請者らもプラーク破綻にはマクロファージや好中球をはじめとする炎症細胞と、それらの細胞由来のプロテアーゼ (MMP) が関与することを示した。

しかしながら、現在までにプラーク破綻とカテプシンとの関連性については、殆んど研究がなされていない。特に、カテプシン群のカテプシン S (Cat S) やカテプシン K (Cat K) に関する報告は数少ない。さらに、これらカテプシンの発現とレニン-アンジオテンシン (RA) 系の関連も不明である。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、本研究では実験動物モデルを用い、プラーク破綻のメカニズムにおけるカテプシンの関与を検討し、さらにカテプシンと RA 系との関連性についても調べるものとする。

### 3. 研究の方法

【実験 1】ApoE 欠損マウスを用い、図 1 に示すように腕頭動脈におけるプラーク脆弱化・破綻モデルを作成した (8 週間の高脂肪食:21%ラード+0.15%コレステロール)。

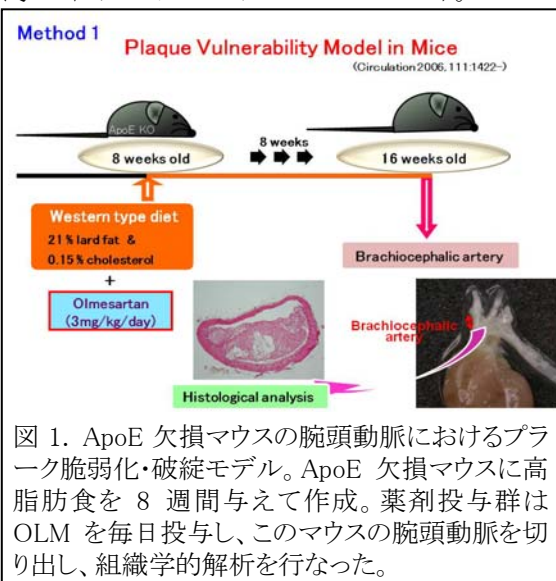


図 1. ApoE 欠損マウスの腕頭動脈におけるプラーク脆弱化・破綻モデル。ApoE 欠損マウスに高脂肪食を 8 週間与えて作成。薬剤投与群は OLM を毎日投与し、このマウスの腕頭動脈を切り出し、組織学的解析を行なった。

なお、薬剤投与群として olmesartan (OLM, 3mg/kg) を毎日投与した。これにより、得られた腕頭動脈から常法によりパラフィン切片を作成し、各種組織学的解析を行なった。

【実験 2】ApoE 欠損マウスの末梢血より単球を単離培養しマクロファージ化させ、これにアンジオテンシン II (AngII, 1 $\mu$ mol/L) を作用させた。同時に、OLM、Apocynin (APO)、LHVS を投与し、そのマクロファージにおける Cat S mRNA や ECM (コラーゲン、エラスチン) 分解活性を調べた (図 2)。

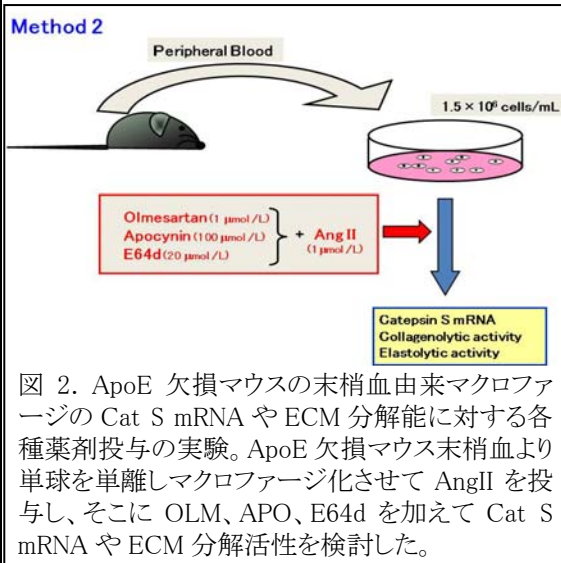


図 2. ApoE 欠損マウスの末梢血由来マクロファージの Cat S mRNA や ECM 分解能に対する各種薬剤投与の実験。ApoE 欠損マウス末梢血より単球を単離しマクロファージ化させて AngII を投与し、そこに OLM、APO、E64d を加えて Cat S mRNA や ECM 分解活性を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 実験 1 において、コントロール群と薬剤 (OLM) 投与群の間には有意な血圧変化は見られなかった。

(2) 一方、腕頭動脈の動脈硬化巣の内膜肥厚面積は、OLM 投与により有意に抑制され、肥厚内膜内の ECM (コラーゲン、エラスチン) の染色面積は有意に高い値が保たれた (図 3)。

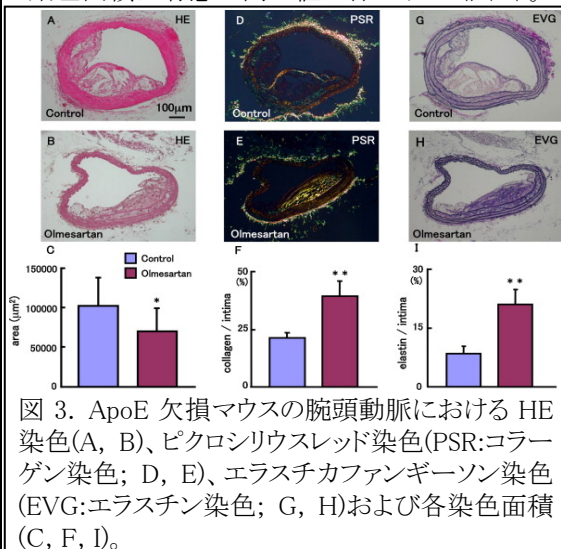


図 3. ApoE 欠損マウスの腕頭動脈における HE 染色 (A, B)、ピクロシウスレッド染色 (PSR: コラーゲン染色; D, E)、エラスチカファンギーソン染色 (EVG: エラスチン染色; G, H) および各染色面積 (C, F, I)。

(3) 腕頭動脈の肥厚内膜において、Cat S および Cat K の発現が認められ、Cat S については OLM の投与により有意にその発現が抑えられた。また、これらの発現はマクロファージの局在と一致する部分が見られた(図 4)。

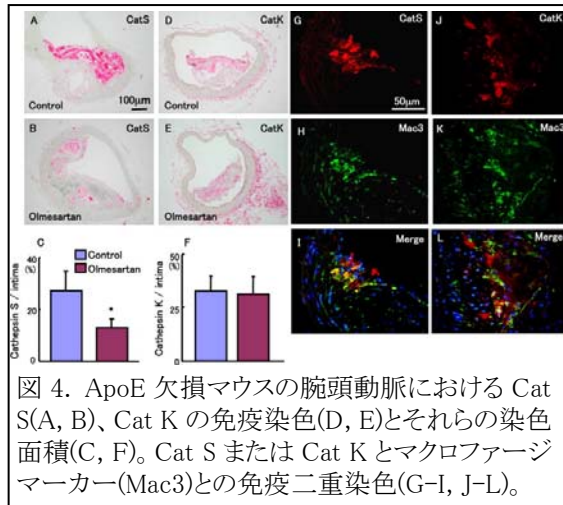


図 4. ApoE 欠損マウスの腕頭動脈における Cat S(A, B)、Cat K の免疫染色(D, E)とそれらの染色面積(C, F)。Cat S または Cat K とマクロファージマーカー(Mac3)との免疫二重染色(G-I, J-L)。

(4) さらに、肥厚内膜内のマクロファージの集属は OLM 投与に有意に抑制されたが、平滑筋細胞の染色面積については有意な変化は認められなかった(図 5)。

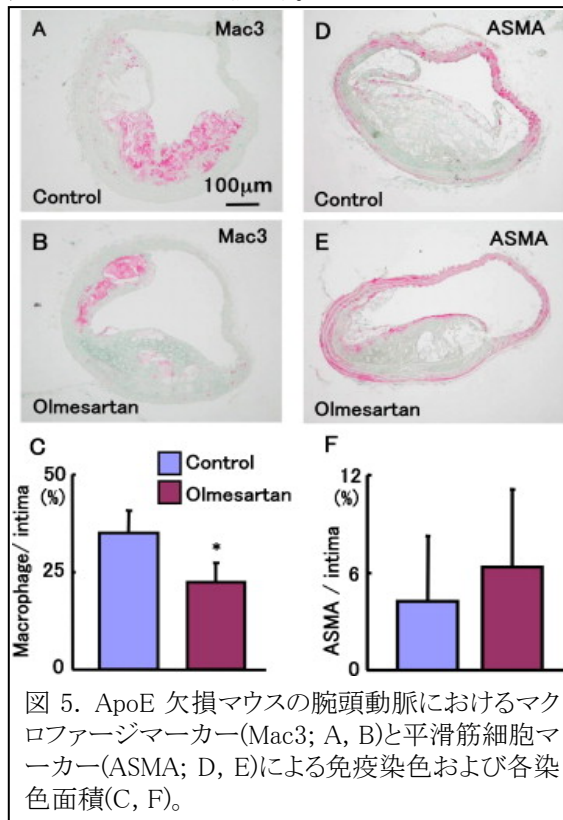


図 5. ApoE 欠損マウスの腕頭動脈におけるマクロファージマーカー(Mac3; A, B)と平滑筋細胞マーカー(ASMA; D, E)による免疫染色および各染色面積(C, F)。

(5) アンギオテンシン 1 型受容体(AT1)の阻害剤である OLM の投与により、肥厚内膜における AT1 自体の免疫染色領域に有意な差は認め

られなかった。また、この AT1 の発現はマクロファージや平滑筋細胞の局在と一致する部分が見られた(図 6)。

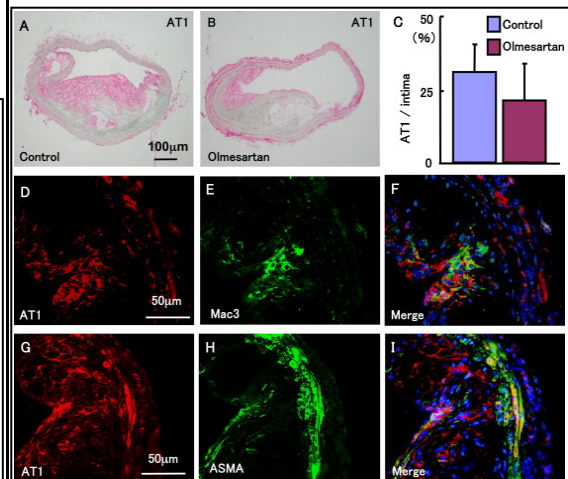


図 6. ApoE 欠損マウスの腕頭動脈における AT1 の免疫染色(A, B)とその染色面積(C)。AT1 と Mac3(マクロファージ)または ASMA(平滑筋細胞)との免疫二重染色(D-F, G-I)。

(6) 実験 2 において、ApoE 欠損マウスより単離培養したマクロファージは、AngII の投与により Cat S mRNA と ECM(コラーゲン、エラスチン)分解能の有意な上昇が見られた。これらの上昇は AT1 阻害剤の OLM や活性酸素種生成阻害剤の APO の同時投与により、有意に抑えられた。さらに、ECM 分解能はカテプシンの特異的阻害剤である LHVS の投与によっても有意に抑制された(図 7)。

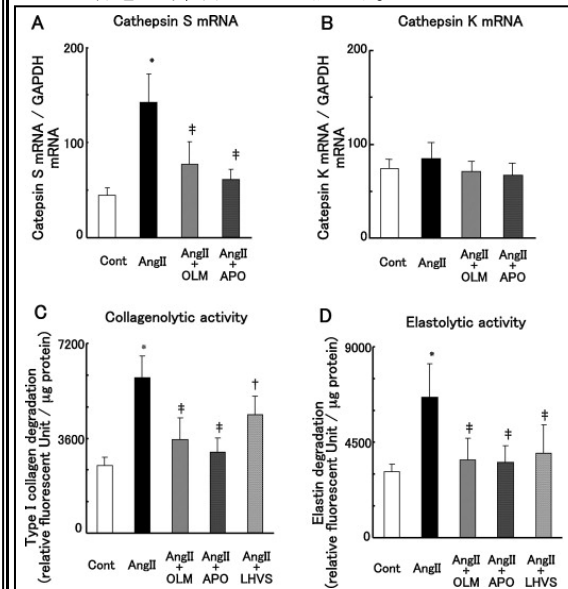


図 7. ApoE 欠損マウスより単離培養したマクロファージの Cat S と Cat K の mRNA に対する AngII、OLM、APO の影響(A, B)。また、このマクロファージの ECM 分解活性に対する AngII、OLM、APO、LHVS の影響(C, D)。

(7)以上の研究結果をまとめると、本モデルにおけるプラークの脆弱化・破綻の機序として以下のようなことが考えられた。

①粥状動脈硬化巣の進展・脆弱化・破綻にはRA系の関与が示唆された。

②この粥状動脈硬化巣の脆弱化は、肥厚内膜内のECM減少を伴っており、この減少にRA系が関与することが示唆された。

③粥状動脈硬化巣の脆弱化をきたすECMの減少は、Cat SをはじめとするプロテアーゼによるECMの分解が考えられ、このCat Sの発現調節にRA系が関与することが考えられた。

④ECMの分解を引き起こすと思われるCat Sはマクロファージから分泌されることが示唆された。また、同時にマクロファージにはAT1の発現が認められたため、マクロファージにおいてRA系がCat Sの発現・分泌を調節していることも示唆された。これらのことは、マクロファージの培養実験の結果もから示唆された。

⑤マクロファージの培養実験におけるAPO(活性酸素種の生成阻害剤)投与の結果から、RA系によるCat Sの調節には、活性酸素種が関与していることが予測された。

(8)本研究結果は、主に次項に記載するような学術雑誌や学会発表等で公表された。特に、Atherosclerosis 誌(2010)における発表が最も大きな成果である。さらに、本研究内容は、第5回名古屋Metabolic Syndrome研究会の研究奨励賞を受賞するに至った。

## 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13件)

1). Nobuhiro Zaima, Takeshi Sasaki, Hiroki Tanaka, Xian Wu Cheng, Kenji Onoue, Takahiro Hayasaka, Naoko Goto-Inoue, Hirofumi Enomoto, Naoki Unno, Masafumi Kuzuya, Mitsutoshi Setou

Imaging mass spectrometry-based histopathologic examination of atherosclerotic lesions.

Atherosclerosis (2011) in press [査読有]

2). 佐々木健\*、葛谷雅文、成憲武、中村香江、鈴木直美、川端弥生、佐藤康二 (\* Correspondence author)

マウス粥状動脈硬化病変における脂肪染色 en face 解析後のパラフィン切片作成と組織学的解析 -本法による動脈硬化病変形成におけるMMP-2の関与の検討-

生物学技術研究会報告 (2011) in press [査読無]

3). 川端弥生、佐々木健\*、鈴木直美、小島俊男 (\* Correspondence author)

薄切した保存標本におけるD2-40抗体を用いた免疫染色性の変化

生物学技術研究会報告 (2011) in press [査読無]

4). Xian Wu Cheng, Haizhen Song, Takeshi Sasaki, Lina Hu, Aiko Inoue, Yasuko Kureishi-Bando, Guo-Ping Shi, Masafumi Kuzuya, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara. Angiotensin type 1 receptor blocker reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein e-deficient mice.

Hypertension 57(5), 981-989 (2011) [査読有]

5). Tomohiko Setoguchi, Hirotohi Kikuchi, Masayoshi Yamamoto, Megumi Baba, Manabu Ohta, Kinji Kamiya, Tatsuo Tanaka, Satoshi Baba, Naoko Goto-Inoue, Mitsutoshi Setou, Takeshi Sasaki, Hiroki Mori, Haruhiko Sugimura and Hiroyuki Konno.

Microarray Analysis Identifies Versican and CD9 as Potent Prognostic Markers in Gastric Gastrointestinal Stromal Tumors. Cancer Science 102(4), 883-889 (2011) [査読有]

6). Xian Wu Cheng, Masafumi Kuzuya, Takeshi Sasaki, Aiko Inoue, Lina Hu, Haizhen Song, Zhe Huang, Ping Li, Kyosuke Takeshita, Akihiro Hirashiki, Kohji Sato, Guo-Ping Shi, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara

Inhibition of Mineralocorticoid Receptor is a Renoprotective Effect of an HMG CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin.

Journal of Hypertension 29(3), 542-552 (2011) [査読有]

7). Takeshi Sasaki, Masafumi Kuzuya, Kae Nakamura, Xian Wu Cheng, Taiju Hayashi, Haizhen Song, Lina Hu, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara, Akihisa Iguchi, Kohji Sato

AT1 blockade attenuates atherosclerotic plaque destabilization accompanied by the suppression of cathepsin S activity in apoE-deficient mice.

Atherosclerosis 210(2), 430-437 (2010) [査読有]

8). Hiroki Tanaka, Nobuhiro Zaima, Naoto Yamamoto, Daisuke Sagara, Minoru Suzuki,

Motohiro Nishiyama, Yuuki Mano, Masanori Sano, Takahiro Hayasaka, Naoko Goto-Inoue, Takeshi Sasaki, Hiroyuki Konno, Naoki Unno, Mitsutoshi Setou.

Imaging Mass Spectrometry Reveals Unique Lipid Distribution in Primary Varicose Veins.

European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 40(5), 657-663 (2010) [査読有]

9). Xian Wu Cheng, Masafumi Kuzuya, Weon Kim, Haizhen Song, Lina Hu, Aiko Inoue, Qun Di, Kae Nakamura, Takeshi Sasaki, Guo-Ping Shi, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara.

Exercise Training Stimulates Ischemia-induced Neovascularization via PI3K/Akt-dependent HIF-1 $\alpha$  Reactivation in Mice of Advanced Age.

Circulation 122(7), 707-716 (2010) [査読有]

10). Takeo Nishizawa, Xian Wu Cheng, Koji Obata, Kazuo Nagata, Takashi Yamada, Hideo Izawa, Takeshi Sasaki, Akihiro Hirashiki, Akiko Noda, Kyosuke Takeshita, Guo-Ping Shi, Masafumi Kuzuya, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara.

Ca<sup>2+</sup> channel blocker benedipine promotes coronary angiogenesis and reduces both left ventricular diastolic stiffness and mortality in hypertensive rats.

Journal of Hypertension 28(7), 1515-1526 (2010) [査読有]

11). Sho Kobayashi, Takeshi Sasaki, Taiichi Katayama, Tomohiko Hasegawa, Akira Nagano, Kohji Sato

Temporal-spatial expression of presenilin 1 and the production of amyloid-beta after acute spinal cord injury in adult rat.

Neurochemistry International 56(3), 387-393 (2010) [査読有]

12). Kae Nakamura, Takeshi Sasaki, Xian Wu Cheng, Akihisa Iguchi, Kohji Sato, Masafumi Kuzuya

Statin prevents plaque disruption in apoE-knockout mouse model through pleiotropic effect on acute inflammation. Atherosclerosis 206(2), 355-361 (2009) [査読有]

13). Kae Nakamura, Takeshi Sasaki, Xian Wu Cheng, Masafumi Kuzuya

A response to the letter regarding the pleiotropic effects of fluvastatin on

acute inflammatory response and the role of MMP-9 in plaque destabilization and intraplaque hemorrhage.

Atherosclerosis 206(2), 351-352 (2009) [査読有]

[学会発表] (計 16 件)

1). 佐々木健、鈴木直美、川端弥生、古田直美、谷口千津子、金山尚裕、佐藤康二  
二種類のホルマリן色素除去法(アンモニア法及び水酸化カリウム法)の比較検討  
平成 22 年度浜松医科大学・技術発表会 (浜松) 2011 年、3 月 11 日

2). 川端弥生、佐々木健、鈴木直美、小島俊男  
薄切した保存標本における D2-40 抗体を用いた免疫染色性の変化とその防止法  
平成 22 年度浜松医科大学・技術発表会 (浜松) 2011 年、3 月 11 日

3). 貴田覚、武田清明、佐々木健、佐藤康二  
高血圧ラットの腎臓における DNA methyltransferase (Dnmt) 3a の発現  
The Hamamatsu Symposium on Medical Science, III (浜松) 2011 年、2 月 25 日

4). 佐々木健、葛谷雅文、成憲武、中村香江、鈴木直美、川端弥生、佐藤康二  
マウス粥状動脈硬化病変における脂肪染色 en face 解析後のパラフィン切片作成と組織学的解析  
第 22 回生物学技術研究会・第 33 回生理学技術研究会 (岡崎) 2011 年、2 月 17-18 日

5). 川端弥生、佐々木健、鈴木直美、小島俊男  
薄切した保存標本における D2-40 抗体を用いた免疫染色性の変化  
第 22 回生物学技術研究会・第 33 回生理学技術研究会 (岡崎) 2011 年、2 月 17-18 日

6). 佐々木健  
組織切片の染色とその半定量的解析方法  
— 膠原線維染色、弾性線維染色、免疫染色の画像解析 —  
平成 22 年度第 1 回浜松医科大学技術部セミナー (浜松) 2010 年、7 月 22 日

7). Xian Wu Cheng, Masafumi Kuzuya, Kae Nakamura, Aiko Inoue, Lina Hu, Haizhen Song, Takeshi Sasaki, Weon Kim, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara  
Statin Prevents Oxidative Stress-induced Apoptosis in Atherogenic Plaque via Enhancement of IAP-2 Associated with

Activation of eNOs: Implication for Plaque Stability.

第74回日本循環器学会学術集会(京都)2010年、3月5-7日

8). Xian Wu Cheng, Takeshi Sasaki, Aiko Inoue, Akihiro Hirashiki, Ping Li, Kyosuke Takeshita, Masafumi Kuzuya, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara  
Superoxide-Dependent Cathepsin Activation System Is Associated with Hypertensive Renal Remodeling and Dysfunction and Represents a Target for Statin.

第74回日本循環器学会学術集会(京都)2010年、3月5-7日

9). Xian Wu Cheng, Masafumi Kuzuya, Kae Nakamura, Aiko Inoue, Lina Hu, Haizhen Song, Takeshi Sasaki, Weon Kim, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara  
Statin Prevents Oxidative Stress-induced Apoptosis in Atherogenic Plaque via Enhancement of IAP-2 Associated with Activation of eNOs: Implication for Plaque Stability.

第5回抗加齢医学研究会(名古屋)2010年、1月9日

10). Xian Wu Cheng, Kenji Okumura, Takeshi Sasaki, Hideo Izawa, Akihiro Hirashiki, Kohzo Nagata, Masafumi Kuzuya, Toyoaki Murohara  
Superoxide-Dependent Cathepsin Activation System Is Associated with Hypertensive Renal Remodeling and Represents a Target for Statin.

American Heart Association, Scientific Sections 2009. [Florida, USA] 2009, 11/14-11/18

12). Xian Wu Cheng, Masafumi Kuzuya, Lina Hu, Haizhen Song, Aiko Inoue, Kae Nakamura, Takeshi Sasaki, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara  
Exercise Training Stimulates Neovascularization in Response to Ischemia via HIF-1 $\alpha$ -VEGF-mediated Activation of MMP-2 in Advanced Age.

American Heart Association, Scientific Sections 2009. [Florida, USA] 2009, 11/14-11/18

13). 佐々木健、笹田久美子、岡田聡、中村香江、成憲武、鈴木亨、井口昭久、葛谷雅文、佐藤康二

血管の石灰化における Matrix

metalloproteinase (MMP)-2の関与  
日本解剖学会第69回中部支部学術集会(浜松)2009年、10月10-11日

14). 成憲武、葛谷雅文、宋海珍、胡莉ナ、佐々木健、井上愛子、中村香江、奥村健二、室原豊明

Statin Prevents Apoptosis in Response to Oxidative Stress and Inflammation in Atherogenic Plaque via Enhancement of Antiapoptotic Protein IAP-2 and Bcl-2 Associated with Activation of eNOs: Implication for Plaque Stability.

第17回日本血管生物医学学会学術集会(東京)2009年、10月8-9日

15). Takeshi Sasaki, Masafumi Kuzuya, Kae Nakamura, Xian Wu Cheng, Taiju Hayashi, Yoko Masuda, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara, Akihisa Iguchi, Kohji Sato  
AT1 Blockade Attenuates Atherosclerotic Plaque Destabilization Through the Suppression of Cathepsin S Activity in ApoE-Deficient Mice.

The 9th Kyungpoo-Hamamastu Joint Medical Symposium, [Taegu, Korea], 2009, 9/24-26

16). 成憲武、奥村健二、佐々木健、井上愛子、葛谷雅文、室原豊明  
ピタバスタチンによる高血圧性心不全期における腎保護作用機序

第43回中部循環器研究会(名古屋)2009年、8月29日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○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：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.hama-med.ac.jp/uni\\_education\\_igakubu\\_igaku\\_kaibou.html](http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_kaibou.html)

[http://www.hama-med.ac.jp/uni\\_research\\_kenkyu.html](http://www.hama-med.ac.jp/uni_research_kenkyu.html)

[http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL\\_ID=200901097957904310&t=1&d=1&q=%28205%29%3D5000080806](http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=200901097957904310&t=1&d=1&q=%28205%29%3D5000080806)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 健 (SASAKI TAKESHI)  
浜松医科大学・技術部・技術専門職員  
研究者番号：20397433

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

葛谷 雅文 (KUZUYA MASAFUMI)  
名古屋大学大学院・医学系研究科・教授  
研究者番号：10283441

成 憲武 (CHENG XIAN WU)  
名古屋大学・医学部・講師  
研究者番号：30378228

中村 香江 (NAKAMURA KAE)  
ミシガン大学・Cardiovasc center・研究員