

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790707

研究課題名 (和文) 血管外膜および周囲組織による動脈硬化病変調節機構の解明

研究課題名 (英文) The regulatory mechanism for the control of atherosclerotic lesion formation by arterial adventitia and perivascular tissues

研究代表者

田中 君枝 (TANAKA KIMIE)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30508065

研究成果の概要 (和文)：

動脈硬化病変を持つ血管の外膜には、微小血管 (vasa vasorum, VV) が増殖しており、その外側は脂肪などの周囲組織に覆われている。しかし、これら血管外膜側の組織が動脈硬化病変の形成と拡大にどのような影響を与えているのか明らかになっていない。本研究では、高脂血症マウスを用いて、動脈硬化病変と血管外膜 VV および周囲組織との関連を検討した。微小血管を明瞭に描出する組織染色方法の開発も行った。

研究成果の概要 (英文)：

The vasa vasorum (VV) are the microvasculature present in the adventitial layer of the atherosclerotic vessel wall, which are surrounded by perivascular tissues like adipose tissues. However, it remains unclear whether these perivascular structures affect to atherosclerotic lesion formation and progression. In this study, using a hypercholesterolemic mouse model, the relationship between atherosclerotic lesions and adventitial VV and perivascular tissues were evaluated. The clear histological imaging method of microvessels was also developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：動脈硬化、血管外膜、vasa vasorum、血管周囲組織、脂肪組織、血管新生因子
動脈硬化モデルマウス、bFGF

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化の成因に関する仮説

動脈硬化病変は、Ross の仮説 (Ross R, N Eng J Med. 1999;340:115-126) において「血管の慢性炎症」であると提唱され、この仮説に従い、血管内皮細胞の障害による炎症に始まり、炎症が外側に波及して血管中膜平滑筋細胞の炎症を引き起こし、脱分化や遊走、サイトカインの発現亢進を起こし、炎症細胞や骨髄由来血管前駆細胞の誘導により病変を進展させると考えられている。この考え方に従って、動脈硬化研究は、血管内皮や新生内膜、中膜に焦点が当てられてきた。

(2) 血管外膜微小血管

一方で、動脈硬化病変の外膜に、病変の進展に伴い微小血管 (vasa vasorum ; VV) の増殖が起こることも古くから報告されている。最近の報告では、発達した動脈硬化プラーク内には増殖した VV が外膜側から侵入し、病変内へ栄養を供給すると同時に、炎症細胞や脂質が侵入する導管となり、病変をさらに拡大させ、プラーク内出血を起こすなど構造的にも脆弱化させて破綻しやすくしている可能性が示唆されている (Moulton KS, Cold Spring Hard Symp Quant Biol. 2002;67:471-82)。よって、従来考えられているように血管の内膜側から外膜方向に炎症が進展するだけでなく、外膜側から内膜側方向に、動脈硬化病変の調節が行われている可能性がある。

(3) 血管周囲組織

最近の研究では、脂肪組織は一種の内分泌器官であり、抗動脈硬化因子や、炎症性サイトカインの他、血管新生因子も分泌されている (Rehman J, Circulation.

2004;109:1292-8)。これらの因子は、全身性のインスリン抵抗性や、脂肪組織自体の炎症持続や血管新生に関与していると考えられているが、動脈は周囲脂肪組織と解剖学的に密着しており、脂肪組織から分泌される因子が血管外膜側から直接動脈硬化病変に作用している可能性もあると考えられる。

このように、血管外膜 VV および血管周囲組織は、動脈硬化病変に影響を与えている可能性があるが、どのように関わっているか明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 高脂血症により発症する動脈硬化病変における VV の増殖を経時的に観察し、動脈硬化病変の形成および拡大との関連を明らかにする。また同時に、血管周囲脂肪組織についても、脂肪細胞形態の経時変化や炎症細胞浸潤、発現する因子の経時変化を明らかにする。さらに、血管と VV、周囲脂肪組織の解剖学的関連も、経時的に観察する。

(2) 血管外膜から供給される因子による動脈硬化病変および VV 調節機構を解明する。まだ病変のない血管の外膜に、血管新生因子を投与すると病変が惹起されるのか検討する。また、進展した病変を、外膜からの血管新生抑物質投与により退縮させることができるのか明らかにする。この手法の治療法への応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 微小血管の描出手法の開発

免疫組織学的手法で血管外膜 VV を明瞭に描出するため、免疫染色手法を工夫し、内皮細胞マーカーであるトマトレクチンを、マウスから血管を採取する前に灌流した。また、蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察し、立体画像を構築した。液状プラスチックを灌

流して血管鋳型を作成し、走査電子顕微鏡を用いて微小構造を観察する手法も行った。

(2) 動脈硬化と VV、血管周囲組織の経時変化の観察

動脈硬化病変モデルである高脂血症マウス (ApoE ノックアウトマウス; ApoE^{-/-}) を長期間飼育し、経時的に、腹部大動脈の動脈硬化病変のつき方を観察した。(1) の染色法を用いて、血管外膜 VV や、血管周囲の脂肪組織の増殖を観察した。免疫染色を施行し、炎症細胞集積も観察した。

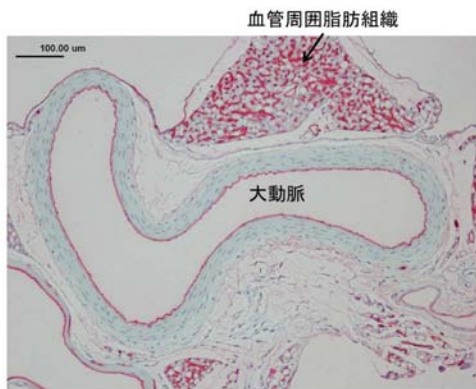
(3) 血管外膜が内膜側へ及ぼす影響

動脈硬化病変を持たない若年 ApoE^{-/-}マウスの腹部大動脈周囲に、血管新生因子 (徐放化した塩基性線維芽細胞増殖因子; bFGF) を局所に注入した。その 2、3、4 週後と 13 週後に、血管外膜の VV の増殖と炎症細胞集積、腹部大動脈の動脈硬化病変を観察した。

4. 研究成果

(1)

高脂血症マウスの血管外膜 VV の免疫染色は、非特異的な反応が出やすく困難であったが、トマトレクチンを用いた灌流染色により、明瞭に描出することが出来た。この手法では、血管周囲脂肪組織の微小血管も明瞭に描出可能であった。(図)



共焦点顕微鏡を用いた観察では、VV が血管外

膜側から動脈硬化病変内に侵入している様子が立体像で観察できた。また、プラスチック血管鋳型と電子顕微鏡を用いた観察では、VV の立体構造を明瞭に描出することが出来た。これらの成果は、発表論文に含めた。

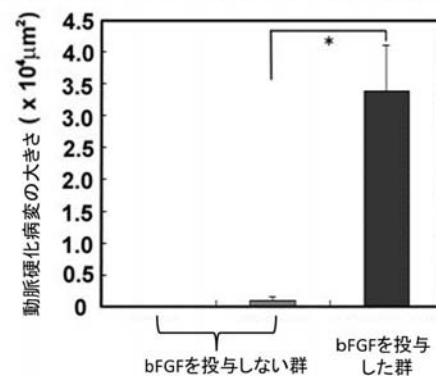
(2)

高脂血症マウスの腹部大動脈を、経時的 (7 週令から 94 週令) に詳細に観察することにより、高脂血症下に自然発症する動脈硬化病変では、軽度の病変では VV 増殖を認めず、週令が進んで (67 週令以上) 拡大した病変を持つ血管にのみ VV 増殖を認めた。

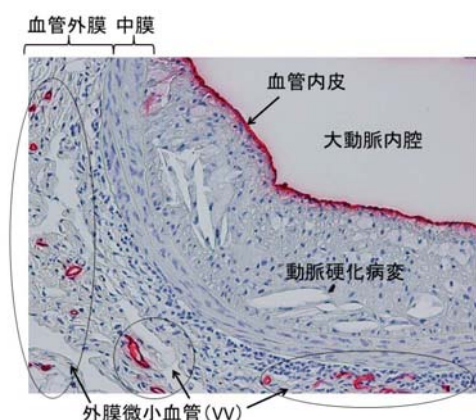
(3)

血管新生因子 (bFGF) は酸性ゼラチンと混合して徐放化剤を作成した。この物質は粘性があり、後腹膜と大動脈の間に注入すると、その場に留まることができる。

若年高脂血症マウスの腹部大動脈周囲に血管新生因子を局所に注入すると、動脈硬化病変が形成されるより前に、血管外膜での VV の増殖を認め、その周囲には炎症細胞 (マクロファージ) の集積が認められた。通常の状態では高脂血症マウスの大動脈に動脈硬化病変が自然発症する週令より以前に、動脈硬化病変の形成を認めた。手術後 13 週に観察した結果、病変の大きさは、比較群 (リン酸緩衝液のみ投与する群、および、徐放化に用いる酸性ゼラチンのみ投与した群) と比べ、明らかに拡大していた。(グラフ)



b FGF 投与群では、腹部大動脈の、動脈硬化病変のある側の外膜に VV 増殖を認めた。(図)



血管にワイヤーを通して機械的障害を与え、その後の病変形成を見るモデルを用いた実験では、血管外膜から投与した血管新生因子が病変形成を増大させるという報告は過去に認めるが、高脂血症化で自然発症する動脈硬化病変での VV 増殖の影響の観察はこの研究が初めてである。この成果は論文にまとめ国際誌に発表した。

この研究では血管外膜での VV 増殖と炎症細胞集積が動脈硬化を形成させることを観察できたが、そのメカニズムはまだ明らかになっていない。今後、血管のどのような変化により病変形成が増強されるのかを検討していく予定である。また、同様の実験方法を用いて血管新生抑制薬を投与した場合、病変の拡大を抑制できるかどうか、今後継続して研究を行う。

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 2 件)

- ① Tanaka K, Nagata D, Hirata Y, Tabata Y, Ryoza N, Sata M. Augmented angiogenesis in adventitia promotes growth of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2011;215:366-373. 査読

有

- ② 田中君枝, 佐田政隆. 血管新生と動脈硬化. *循環器専門医* 2009;17(1):3-9. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tanaka K. Enhanced angiogenesis in adventitia promotes plaque formation in abdominal aorta of apolipoprotein E-deficient mice. American Heart Association Scientific Session 2010, 2010 年 11 月 17 日, Chicago, USA.
- ② Tanaka K. Augmented angiogenesis in adventitia promotes plaque formation in abdominal aorta of apolipoprotein E-deficient mice, 78th European Atherosclerosis Society Congress, 2010 年 6 月 20 日, Humburg, Germany.
- ③ Tanaka K. Forced Angiogenesis in Adventitia Promotes Plaque Formation in Abdominal Aorta of Apolipoprotein E-deficient Mice. 第 74 回日本循環器学会, 2010 年 3 月 6 日, 京都.
- ④ Tanaka K. Forced angiogenesis in adventitia promotes plaque formation in abdominal aorta of apolipoprotein E-deficient mice. American Heart Association Scientific Session 2009. 2009 年 11 月 16 日, Orlando, USA.

[図書] (計 1 件)

- ① 田中君枝, フジメディカル出版, 血管糖
尿病 2011, 48-53.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 君枝 (TANAKA KIMIE)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 30508065

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし