

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19754

研究課題名（和文）血管ダメージによる組織機能低下が導く不定愁訴の分子基盤確立

研究課題名（英文）Establishment of the molecular mechanism for the indefinite complaint caused by tissue dysfunction caused due to vascular damage

研究代表者

豊田 雅士（Toyoda, Masashi）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：50392486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：加齢は様々な疾患のリスク因子である。不定愁訴は多岐にわたる自覚症状を呈するが、息切れや倦怠感など循環機能の低下によると思われるものが多い。しかしこのような症状は、「加齢」によってもしばしば認められ、果たして加齢に伴って自然に起こる老化なのか、それとも加齢性疾患につながる循環器機能の低下による前症状なのかを判断することは難しい。そこで不定愁訴の分子機序解明に向け、心臓組織における血管構造を調べた。加齢によって心臓組織の末梢血管構造は走行性に変化を認め、こうした変化が組織機能低下を誘引していると考えられた。また組織内血管機能を評価する実験系を確立し、血管による組織機能低下を解析する道が開かれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不定愁訴は、自覚症状があるにも関わらず診断がつかず長い間苦しむことが少なくない。COVID-19においても、感染後の後遺症として不定愁訴同様の症状が出現し、有効な治療がなく日々の生活に大きな影響が出ていることが社会的課題である。本研究では、こうした症状の要因に血管の炎症によるダメージがあると仮定し、組織機能へ影響を与える血管ダメージとは何かを検証した。本研究では「加齢」によって心臓組織の末梢血管構造は走行性に変化を認め、こうした変化が組織機能低下を誘引していると考えられた。今後さらに血管機能による組織機能低下のプロセスを解析することで、不定愁訴の機序解明へとつなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：Aging is a risk factor for a variety of diseases. Although medically unexplained symptoms can present with a wide variety of subjective symptoms, many of them, such as shortness of breath and fatigue, are thought to be due to a decline in circulatory function. However, such symptoms are often associated with "aging," and it is difficult to determine whether they are a natural consequence of aging or a pre-symptomatic manifestation of the decline in circulatory function that leads to age-related diseases. To elucidate the molecular mechanism of the medically unexplained symptoms, we investigated the vascular structure of cardiac tissue. We found that "aging" causes changes in the peripheral vascular structure of cardiac tissue, and these changes are thought to induce a decline in tissue function. We also established an experimental system to evaluate vascular function in tissues, which paved the way for analyzing tissue dysfunction caused by blood vessels.

研究分野：血管生物学

キーワード：心臓 血管構造 加齢 糖鎖 炎症

1. 研究開始当初の背景

不定愁訴（明らかな身体的原因が認められないにも関わらず、頭痛・動悸・疲労感など多岐にわたる自覚症状を持つ状態）がどのような機序でおこるかは未だ不明である。一方新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、血管炎や血栓症を伴って多臓器不全に至り重症化するが、回復後の後遺症(Long-COVID)で不定愁訴と重なる症状を呈する実態が明らかになりつつある。これは、血管の持続的炎症反応が病態の重症化・後遺症出現に関与していることと考えられた。そこで本研究では、血管の炎症による「ダメージ」が一時的な組織機能低下を誘引し、不定愁訴として現れるとの仮説を立て、組織機能を支える血管機能の制御機序の解明から不定愁訴の分子機序を明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

加齢は様々な疾患のリスク因子である。不定愁訴は多岐にわたる自覚症状を呈するが、息切れや倦怠感など循環機能の低下によると思われるものが多い。しかしこのような症状は、「加齢」によってもしばしば認められ、果たして加齢に伴って自然に起こる老化なのか、それとも加齢性疾患につながる循環器機能の低下による前症状なのかを判断することは難しい。そこには循環器における老化プロセスが十分わかっていないことがあげられる。

そこで本研究では、まず心臓の老化プロセスを明らかにし、組織機能の低下を誘引する血管の「ダメージ」とは組織内の血管のどのような変化を表し、さらにそれが組織を支える細胞機能にどう影響を及ぼしているか、そのメカニズムを解明することを目的とする。具体的には加齢に伴う心臓組織内の自然老化変化を追跡し、その過程で心臓組織内血管網の構造及び機能的な変化が、拍動心筋細胞の機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

血管のダメージの指標となる分子基盤が明らかになれば、不定愁訴の新たな治療戦略が描けるだけでなく、組織機能が不可逆的に低下する疾患の予防にもつながり、心身ともに健康で過ごす健康寿命の延伸への波及効果が期待できる。

3. 研究の方法

不定愁訴の実態が不明であることから、本研究ではまず炎症による血管ダメージによる血管機能の低下が、組織への十分な栄養・酸素の補給路に障害を与え、組織機能の低下を導き、不定愁訴として現れると考えた。そこでまず炎症要因として「加齢」と「高血糖」の2つの視点から以下のような検討を行なった。

(1) 「加齢」による心臓組織内変容

心臓の老化プロセスを明らかにするため、若齢から老齢マウスの心臓を摘出し、切片を作製し、レクチンマイクロアレイ技術による糖鎖組織マッピングを行った。レクチンマイクロアレイは、スライドガラスの基板上に糖鎖と結合する能力をもつタンパク質（レクチン）を多数配置させたマイクロアレイの一種であり、細胞の種類や状態によりその構造組成（プロファイル）を簡便に調べる方法である。アレイ基盤と糖タンパク質プローブ（膜抽出物など）を反応させることで、定量的にタンパク質上の糖鎖構成を高感度検出する。この技術を応用し、組織切片からレーザーマイクロダイセクションで特定の領域を切り出し、タンパク質を抽出、蛍光ラベル化してレクチンマイクロアレイにかけることで、組織での糖鎖情報を取得した。

(2) 心臓組織内血管構造変化

心臓組織内の血管は縦横無尽に走行していることから、2次元の切片での解析では十分全体像を捉えることは難しい。そこで若齢から老齢までのマウス心臓組織に対して透明化し、ライトシート顕微鏡により3次元での組織内血管構造画像を所得した。さらにその一部をスライスし、共焦点レーザー顕微鏡で詳細な血管構造を観察し、得られた画像をもとに画像解析ソフト Imaris を用いて行い、血管長や内径などを計測した。各データを比較し、心臓内血管構造の加齢変化を解析した。

(3) 「高血糖誘導」による血管ダメージ

血管ダメージを与える炎症を惹起する要因として高血糖があげられる。そこで、ストレプトゾトシン (STZ) 投与による高血糖を誘導し、心臓組織内血管構造を明らかにした。(2)の結果と比較することで、自然老化と高血糖暴露による血管構造を比較解析した。

(4) 血管ダメージが与える血管機能への影響

加齢および高血糖暴露による血管ダメージによる血管機能への変化を追跡するため、末梢血

管での血管透過性を評価することを考えた。しかし組織内の血管透過性を評価する方法はこれまで報告がないことから、まず評価法の確立を行った。皮膚など体表面での透過性評価を参考として、蛍光デキストラン投与による蛍光物質の漏出度を評価する技術の確立を行なった。

4. 研究成果

(1) 「加齢」に伴う心臓老化プロセス

糖鎖組織マッピングによる心臓の加齢過程における組織内変化を明らかにした(図1)。心臓の左心室領域では、変動の幅はあるものの一定の方向で(図下から上へ)変化していることが示された。これを詳細に解析すると、心臓組織において領域特異的な糖鎖(シアル酸、マンノース、O結合型糖鎖)の存在とその領域に応じた経時的な変化が存在することが明らかになった。これら糖鎖の発現変化は組織形態並びにその機能になんらかの影響を及ぼしていることが示唆された。

さらに、げっ歯類の血管内皮マーカーとして知られるGSL-IB4が若齢と老齢で顕著な差があるレクチンとして検出された。これは、加齢変化に伴い組織内の血管に変化があることを示唆しており、「血管ダメージによる組織機能低下」とする仮説を支持する結果と考えられた。

(2) 加齢に伴う血管構造変化

心臓組織内の3次元血管構造を、蛍光ラベル化したGSL-IB4をマウスに投与して、血管を蛍光ラベル化して心臓を摘出、CUBICを用いた組織透明化技術を使い透明化処理をしてライトシート顕微鏡及び共焦点顕微鏡による3次元撮影し、さらに解析ソフトImarisを用いて組織内の毛細血管構造を精緻に計測した。(図2)。

血管の表面積、長さ、本数は、加齢に伴って増加傾向が認められた一方、直径はほぼ一定の値であった。また血管の直線性を示す真直度は加齢に伴って有意に減少していた。これは加齢に伴って走行性が乱れた血管が増加していることを示していると考えられた。

(3) 血管内皮細胞間接着因子の発現の加齢変化

加齢した心臓において毛細血管の蛇行が増加することが明らかとなった。心臓は複数の細胞集団から形成されており、個々の細胞は細胞接着を介して結合している。血管の蛇行が増加した要因として、心筋細胞間の接着や内皮細胞間の接着、心筋細胞・内皮細胞間の接着が加齢によって減少したことで間隙が広がり、血管の動作範囲が広がったことが蛇行の原因ではないかと考えられた。これを示すため、1細胞解析のデータベースを活用した再解析を実施した。解析は、心筋細胞・血管内皮細胞で発現している細胞接着因子であるCdh2(N-Cadherin)、Gjal(Connexin43,Cx43)、Ocln(Occludin)、Cldu5(Claudin5)について調べた。解析の結果、左心室の心筋細胞・血管内皮細胞で高い発現が認められたCx43とClaudin5が加齢に伴ってその発現レベルが低下することが示された。この結果を検証するため、現在免疫染色による発現を解析中である。

(4) 「高血糖」誘導に伴う組織内血管構造の変化

2ヶ月齢のマウスにSTZ単回投与し、高血糖を誘導した。概ね投与4日後より血糖値が「高血糖」の目安である300mg/dL以上(通常は180-200)に上昇を確認した。本実験では、投与後7日目に血管構造を(2)と同様にして計測した。その結果、コントロール対照群(生理食塩水投与)及び通常2ヶ月齢と比較して、高血糖誘導群における血管構造における顕著な変化は認められなかった。

(5) 組織内血管機能評価系の確立

組織末梢での血管の役割を考える上で構造に加え、機能の評価することが求められる。特に細胞に栄養・酸素を供給し、老廃物を回収する物質交換を行う透過性機能の評価することは重要である。しかし組織内の血管の透過機能の評価する実験系はない。血管透過性評価については、血管が表層に出て観察しやすい皮膚や動物に皮下移植した癌細胞での実験が行われている。また近年ではマイクロ流体デバイスを用いたin vitroモデルによる評価系が開発されているが、現段階で組織内血管の評価系は確立していない。本実験では、マウス心臓での透過性を計測、評価する方法を検討した。その結果、皮膚などでおこなわれている手法を参考

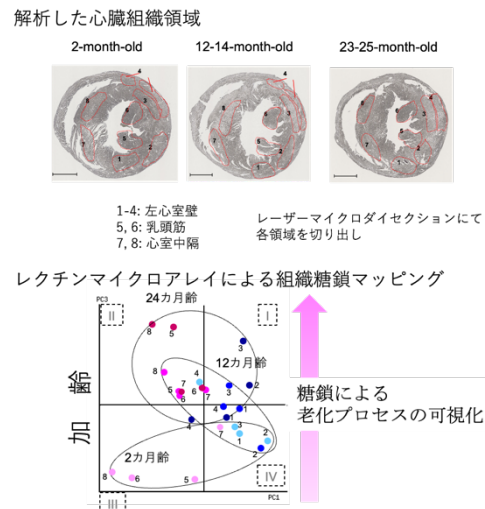


図1 マウス心臓組織における糖鎖マッピングの加齢変化

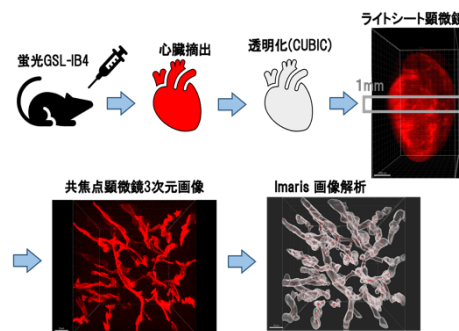


図2 マウス心臓組織内血管構造変化

にして、蛍光デキストラン投与一定時間後に組織を摘出し、凍結切片を作製、観察するまでの工程を工夫することで、血管から漏出する蛍光物質を捉えることが可能となった。現在漏出蛍光量を定量化するための解析法を検討している。観察法、解析法が確立した折に、加齢・炎症（高血糖暴露）における組織内血管の透過性を評価する予定である。

5. 考察

加齢は種々の疾患リスクを高めるが、明確な「疾患」と診断される前に不定愁訴が現れることが少なくない。その中で息切れや倦怠感など循環機能の低下によると思われるものが多い。こうした症状が果たして加齢に伴って自然に起こる老化なのか、疾患につながる前症状なのかを判断することは難しい。これはまさに不定愁訴の実態が未だ明確ではないことを意味する。そうした中、COVID-19の流行が起こった。COVID-19における病態・後遺症出現の世界的な疫学的データ・研究報告がいち早く公開され、Long-COVIDと呼ばれる後遺症症状が不定愁訴と重なっている実態が明らかになってきた。そこで本研究では、不定愁訴が血管、特に組織内血管機能の低下を要因として引き起こされるとの仮説をたて、炎症による血管ダメージが与える組織機能への影響について検討した。

加齢に伴う血管構造では、血管密度の増加と血管蛇行の増加が認められた。この変化がどのような血管機能に影響し、さらに心臓組織の機能を支える心筋細胞の機能にどのように影響しているかを現在調べている。

近年重篤な疾患の前兆として多岐にわたる自覚症状の背景に、組織内微小血管の機能異常があることが指摘され (*Eur Heart J*, ehab282, 2021)、注目されている。さらに組織微小血管の機能維持が個体寿命を制御するとの報告もされた (*Science*, 373(6554):eabc8479, 2021)。しかし組織内の細い血管をとらえることは臨床的に難しく、その異常を正確に捉え診断することはできておらず、多くの患者が長期にわたって苦しんでいる現状がある。こうした実態の一部は、不定愁訴と関連性があると考えられるが、未だ確かめられていない。

本研究で心臓組織内血管は加齢で構造変化していることが明らかになったが、機能への影響についてはまだ不明なままである。特に末梢血管における物質交換を担う透過性機能の評価できる技術を本研究課題ではほぼ確立できたことによって、今後不定愁訴の本態となる組織機能低下の機序解明の基盤を得られると考えられる。不定愁訴の分子機序の解明の突破口となるべく研究を進めていきたい。また本実験で用いた高血糖暴露実験からは、糖尿病の要因となる高血糖が血管に与える影響を評価することも可能となり、高血糖から糖尿病発症の機序にも一石を投じることになるかも知れない。

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 豊田雅士	4. 巻 10
2. 論文標題 血管の老化と慢性炎症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 別冊 B10 Clinica	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Itakura Y, Hasegawa Y, Kikkawa Y, Murakami Y, Sugiura K, Nagai-Okatani C, Sasaki N, Umemura M, Takahashi Y, Kimura T, Kuno A, Ishiwata T, Toyoda M	4. 巻 22
2. 論文標題 Spatiotemporal changes of tissue glycans depending on localization in cardiac aging.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 68-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.12.009	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 Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M	4. 巻 22
2. 論文標題 Glycan characteristics of human heart constituent cells maintaining organ function: relatively stable glycan profiles in cellular senescence.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biogerontology	6. 最初と最後の頁 623-637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10522-021-09940-z	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 板倉陽子、佐々木紀彦、豊田雅士
2. 発表標題 レクチンマイクロアレイ法を用いたマウス心臓の加齢に伴う糖鎖変化と局在に関する比較解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板倉陽子、佐々木紀彦、豊田雅士
2. 発表標題 心臓構成細胞における細胞老化と糖鎖特異性に関する基礎的解析
3. 学会等名 日本血管生物医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M,
2. 発表標題 Aging and sialylation changes in fibroblasts derived from various tissues
3. 学会等名 Sialoglyco2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉陽子、佐々木紀彦、豊田雅士
2. 発表標題 Comparative analysis of age-related glycan changes and localization in the mouse heart with lectin microarray
3. 学会等名 日本基礎老化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉陽子、吉川友里香、杉浦巧祐、岡谷千晶、佐々木紀彦、木村透、久野敦、豊田雅士.
2. 発表標題 レクチンマイクロアレイを用いたマウス心臓糖鎖における局在と加齢変化
3. 学会等名 日本糖質学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	松田 明生 (Akio Matsuda) (10359705)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・室長 (82612)	

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