

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790834

研究課題名（和文） 血管の外膜側から内膜側へ向かう動脈硬化病変調節機構の解明

研究課題名（英文） The outside-in regulatory mechanisms of atherosclerosis

研究代表者

田中 君枝 (TANAKA KIMIE)

東京大学・保健・健康推進本部・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では外膜微小血管の増殖を認めるが、局所への薬剤投与により外膜微小血管増殖を調節することが、動脈硬化病変自体にも影響するかどうかは明らかでない。本研究では、血管周囲局所に血管新生抑制作用を持つ薬剤を投与することにより、外膜微小血管増殖および動脈硬化病変の進展が抑制される可能性が、高齢高脂血症マウスの大腿動脈を使用した実験により示された。

研究成果の概要（英文）：

Exaggerate formation of vasa vasorum plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. However, it remains unclear whether locally applied angiogenesis inhibitor decreases vasa vasorum formation and atherosclerotic lesion progression. In this study, an experiment using femoral arteries of old hypercholesterolemic mice showed that local administration of a growth factor inhibitor in adventitia inhibited adventitial angiogenesis and atherosclerotic lesion progression under hypercholesterolemia without mechanical vascular injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：循環器・高血圧、動脈硬化、血管外膜、vasa vasorum、血管周囲組織

## 1. 研究開始当初の背景

Ross の仮説 (Ross R, N Eng J Med. 1999;340:115-126) において、動脈の粥状硬化病変形成は「血管の慢性炎症」の結果であることが提唱され、広く受け入れられている。この仮説に従い、動脈硬化病変の成因は、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

症を惹起し、平滑筋細胞の脱分化や遊走、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。一方で、動脈硬化病変の外膜側に、病変の進展に伴い外膜微小血管 (vasa vasorum) の増殖が起こることも古くから報告されている (Barger AC, New Engl J Med. 1984;310(3)175-177)。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外膜微小血管が外膜側から侵入し、病変内へ栄養とともに炎症細胞や脂質を供給する導管の役割をして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あると報告されている(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波及するだけではなく、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。

研究代表者はこれまでの研究で、動脈硬化を発症する高脂血症モデルマウス(アポリポ蛋白質 E 欠損(ApoE 欠損)マウス)を用い、まず、血管外膜微小血管を組織学的に明瞭に描出するため、ビオチン付きトマトレクチンを用いた組織灌流染色法を工夫し、径が数マイクロメートルの微小血管を明視野顕微鏡下で明瞭に描出することを可能とした。次に、若年 ApoE 欠損マウスの腹部大動脈周囲に、徐放化した血管新生因子 bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子)を留置する実験により、機械的血管傷害モデルを用いない、高脂血症下で自然発症する動脈硬化病変においても、血管周囲への血管新生因子局所投与により、外膜微小血管の増殖と、動脈硬化病変の形成を認め、外膜微小血管増殖は、動脈硬化病変形成に先立って認められることを報告した。(Tanaka K, Atherosclerosis. 2011;215:366-373)。

外膜微小血管増殖を強制的に生じさせると、動脈硬化病変も形成されることがわかった。これとは反対に、外膜微小血管増殖を抑制した場合は、過去の報告では、高脂血症マウスに血管新生抑制薬(アンジオスタチン、TNP-470、エンドスタチン)を全身投与する

と、外膜微小血管増殖を抑制し、病変の拡大と炎症細胞集積も抑制すると報告されている(Moulton KS, PNAS. 2003;100(8):4736-4741)。また機械的血管傷害モデルを用いた報告では、血管新生抑制作用を持つ薬剤スラミンを、マウス血管グラフトモデルの血管吻合部に局所投与すると、移植後動脈硬化病変の形成が抑制されたと報告されている(Hu Y, Circulation. 1999;100:861-868)。このように、血管新生抑制作用を持つ薬剤を全身投与する方法や、機械的血管傷害モデルを用いて局所投与する方法は検討されているが、高脂血症下で自然発症する動脈硬化病変に局所投与して検討した研究は報告されていない。

## 2. 研究の目的

動脈硬化病変を持つ血管の外膜側から内膜側に向かう動脈硬化調節機構を検討するため、血管外膜局所に薬剤を投与して微小血管増殖を調節することにより、動脈硬化病変自体も影響を受けるかを観察し、その機序を考察する。またこの実験を遂行するための、最適なマウスモデルを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ApoE 欠損マウスに若年から高脂食を投与し飼育する。研究代表者が過去に報告した、マウス腹部大動脈周囲に bFGF を留置する手法と同様の手術法(開腹し、後腹膜下の腹部大動脈周囲に、注射針を用いて薬剤を注入する方法)を用いて、腹部大動脈周囲に、血管新生抑制薬(スラミン)を留置し、2-3ヶ月後にビオチン付きトマトレクチン灌流染色により微小血管を染色した後、血管を周囲組織と一塊にして採取して組織標本を作製する。血管外膜の脆弱な構造を保持するため、組織標本はパラフィン包埋標本を作製する。

(2) 作成した組織標本を用いて、一般染色により動脈硬化病変の大きさを計測し、ビオチン付きレクチンをアビジン-ビオチン法およびアルカリフォスファターゼ法により発色させて外膜微小血管数を観察し、薬剤を投与しない群と比較する。マクロファージなどの炎症細胞に対する抗体を用いて免疫染色を行い、外膜微小血管周辺に集積する細胞や、新生内膜を構成する細胞を同定する。bFGF やその他の成長因子に対する抗体を用いた免疫染色も行い、外膜微小血管と動脈硬化病変の変化に関連する物質を検討する。スラミンはポリ乳酸に含有して徐放化したものを用いる。

#### 4. 研究成果

(1) ApoE 欠損マウスの腹部大動脈の動脈硬化病変の自然経過を観察したところ、初期の小さな動脈硬化病変には外膜微小血管を認めず、脂質コアを持つような病変に進展してから（普通食投与で飼育した場合は 70 週令程度）外膜に増殖した外膜微小血管を認めた。このことから、成長因子阻害薬による外膜微小血管抑制と動脈硬化病変への影響を検討するためには、動脈硬化病変がある程度形成された高齢のマウスを用いる必要があると考えた。実験開始当初は、腹部大動脈周囲に薬剤を投与する方法を用いる予定であったが、高齢のマウスでは手術侵襲が大きいと考えられたため、別の部位の血管を用いることを検討した。7 週令から高脂食を投与した 50 週令の ApoE 欠損マウスの大腿動脈を、ビオチン付きトマトレクチン灌流による微小血管染色を施行した後に採取し組織標本を作製して観察したところ、大腿動脈にも、動脈硬化病変の形成と外膜微小血管増殖が自然発症していることがわかった。高脂血症マウスの大腿動脈周囲の外膜微小血管の存在は過去に報告されておらず、新しい知見で

ある。

(2) 上記により、大腿動脈を用いて実験を行うこととした。7 週令から高脂食を投与した 40 週令 ApoE 欠損マウスの右大腿動脈周囲に、ポリ乳酸に含有した徐放化スラミンを非イオン性ゲルに混ぜて粘性を持たせ、注射針で大腿動脈に隣接して注入し留置した。左大腿動脈は対照としてゲルのみを留置した。10 週後にビオチン付きトマトレクチン灌流微小血管染色を施行後、両側大腿動脈を採取して組織標本を作製し、病変面積および外膜微小血管数を計数したところ、スラミン投与側で病変の進展が抑制されていた。病変を持つ大腿動脈では、新生内膜の厚さと外膜微小血管数の間に正の相関を認めた。外膜微小血管周囲には、マクロファージや T リンパ球など炎症細胞の集積を認めた。同様に、7 週令から高脂食を投与した 40 週令 ApoE 欠損マウスの右大腿動脈に、スラミンを含有しないポリ乳酸をゲルに混合して留置し、10 週後に左側と比較したところ、病変の大きさの左右差は認められなかった。

(3) スラミンは血管新生抑制作用を持つ増殖因子抑制薬であるが、血管新生に関連する bFGF や VEGF(血管内皮増殖因子)だけでなく、PDGF(血小板由来増殖因子)やプリン受容体の作用も抑制し、血管平滑筋細胞増殖やマクロファージによる炎症にも抑制作用を持つといわれている。40 週令 ApoE 欠損マウスの大腿動脈をビオチン付きトマトレクチン灌流染色後に採取して組織標本を作製し、抗 PDGF 抗体や抗プリン受容体(P2Y6)抗体を用いて免疫染色を行って観察したこと、主に動脈硬化プラーク部位でこれらの発現を認めた。本研究では、スラミンの血管周囲局所投与により、外膜微小血管および動脈硬化病変の進展抑制を認めた。しかし、スラミンの血管平滑筋細胞や炎症細胞への多様な作

用の影響が否定できない。今後、同様の実験手法により、血管新生を特異的に抑制する薬剤を用いて評価する予定である。

#### 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田中君枝、佐田政隆、インスリン抵抗性と動脈硬化：炎症の関与、循環器内科、査読無、71 巻 5 号、2012、401-405

②田中君枝、佐田政隆、基礎研究面から：大血管：末梢血管を中心に、日本内科学会雑誌、査読無、201 巻、2012、305-312

[学会発表] (計 3 件)

①田中君枝、Locally applied suramin inhibits angiogenesis in adventitia and arterial lesion progression in apolipoprotein E-deficient mice、American Heart Association Scientific Session 2012、2012年11月4日、Los Angeles Convention Center

(アメリカ・ロスアンゼルス)

②田中君枝、Angiogenesis in Atherosclerosis、第 20 回日本血管生物医学会学術集会、2012 年 12 月 5 日、あわぎんホール (徳島県)

③田中君枝、Local administration of suramin inhibits angiogenesis in adventitia and arterial lesion progression in apolipoprotein E-deficient mice、第 77 回日本循環器学会学術集会、2013 年 3 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 2 件)

①田中君枝、佐田政隆、メディカルレビュー社、動脈硬化症の新しい診断・治療標的、2012、75-82

②田中君枝、佐田政隆、中外医学社、Annual Review 循環器、2012、34-40

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 君枝 (TANAKA KIMIE)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：30508065

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者 なし