

## 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 22 日現在

機関番号：17401
研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790865
研究課題名（和文） 血管内皮機能障害のシグナル解析と薬物治療法の研究
研究課題名（英文） Analyses of Signal pathway and medical strategy for vascular endothelial dysfunction
研究代表者 野崎 俊光 (NOZAKI TOSHIMITSU) 熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師 研究者番号：10583049

研究成果の概要（和文）：高血圧治療薬として使用され、冠動脈疾患ハイリスク患者の予後を改善することが証明されているテルミサルタンが、細胞内ミトコンドリア機能の亢進を介してヒト冠動脈内皮細胞を活性化させることを我々は確認した。ミトコンドリア機能の変化と血管内皮細胞の活性化との関連・機序を検討した結果、テルミサルタンはヒト冠動脈内皮細胞において、代謝をコントロールするマスターレギュレーターとして知られるAMPKを上方制御して血管内皮機能を改善させることが示唆された。動脈硬化モデルマウスであるKKAYマウスにテルミサルタンを投与することで血管内皮機能障害が改善することも確認できた。

研究成果の概要（英文）：We identified that Telmisartan, a hypertensive medicine and is effective in preventing cardiovascular events in high-risk patients, could activate human coronary artery endothelial cells (HCAECs) by modulating mitochondrial function. Telmisartan improves endothelial dysfunction through the upregulation of AMPK signaling, a key regulator of cellular energy adaptation, in HCAECs. In vivo, Telmisartan also improved endothelial dysfunction in KKAY mouse model.

## 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：内皮機能・ミトコンドリア・AMPK

## 1. 研究開始当初の背景

フラミンガム心臓研究などの疫学研究により冠動脈疾患の主要危険因子が同定され、臨床医療に広く浸透したにもかかわらず心血管疾患は依然として悪性新生物と並ぶ日本人の主要死因であり、この事実は、原点回

帰としての一次予防の重要性を強調するとともに、心血管疾患ハイリスク患者を早期に正確に同定する評価法の重要性を示している。アテローム性動脈硬化進行の第一段階は血管内皮細胞障害から始まり、また、急性冠症候群の責任病変に通じる不安定プラーク

の一型にも内皮びらんが強く関与している。最近の研究で血管内皮機能障害は動脈硬化性疾患の有用な予後指標になることが証明され、血管内皮機能の重要性が認識されるようになった。

我々は、これまで血管内皮機能障害の関与を主に動脈硬化性疾患で検討し、新しい血管内皮機能の評価法として血液マーカーである血管内皮細胞由来微小粒子 (Endothelium-derived-microparticles: EMP) の測定系を確立し、ヒト血漿 EMP 値は心血管イベント予測のサロゲートマーカーとしての役割も果たすことを証明してきた (*J Am Coll Cardiol.* 2009; ;54:601-608, *Eur J Heart Fail.* 2010;doi: 10.1093/eurjhf/hfq145)。

ミトコンドリアは細胞におけるエネルギー産生と活性酸素種の産生、細胞増殖、apoptosis などの細胞の機能に密接に関与している細胞内小器官であり、ミトコンドリア機能不全は動脈硬化性疾患に関与していることが指摘されている。血管内皮細胞障害にもミトコンドリア機能が関与していることは推測できるが、ミトコンドリアが血管内皮細胞機能に果たす役割やその増幅 (mitochondria biogenesis) と機能修飾における細胞内シグナル伝達の詳細は不明である。現在、我々はヒト冠動脈内皮細胞を用いて既存の薬剤で血管内皮細胞の機能を賦活・活性化させる薬剤をスクリーニングし、内皮細胞賦活作用を有する薬剤が及ぼす内皮ミトコンドリア形態と機能変化の検討に取り組んでいる。

## 2. 研究の目的

(1) 血管内皮機能は動脈硬化形成に深く関与しており、血管内皮機能障害と細胞内ミトコンドリアの関与に着目しミトコンドリア機能不全に至る細胞内シグナル伝達の解明を目指す。

(2) 臨床研究では動脈硬化性疾患患者において、血管内皮機能障害を治療ターゲットとする新たな戦略を提唱するために、血管内皮機能を改善させる薬剤のヒトへの効果を血管内皮機能障害マーカーである血管内皮細胞由来微小粒子 (Endothelium-derived-microparticles: EMP) と末梢血管トノメトリー (Digital Reactive Hyperemia Peripheral Arterial Tonometry: RH-PAT) を用いて評価し検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト冠動脈内皮細胞を賦活化させる薬剤

## のスクリーニングと血管内皮細胞の賦活化現象の検討

培養ヒト冠動脈内皮細胞に serum 除去,  $H_2O_2$ , TNF- $\alpha$ , PMA, LPS, angiotensin-II などのストレスをかけると内皮細胞に形態変化や apoptosis, necrosis が惹起されるが、ストレスの前処置として薬剤を添加しこの内皮細胞障害を減弱させる効果を有する薬剤をスクリーニングする。血管内皮細胞の活動性を細胞内 NADH<sup>+</sup> レベルで評価する。また、実測の apoptosis/necrosis 細胞測定には ANNEXIN V-FITC kit (Beckman Coulter) を用い、Annexin のみを発現した apoptosis 内皮細胞と核染色である PI も同時に発現した necrosis 内皮細胞の割合を flowcytometry で測定する。スクリーニングした薬剤を用いて血管内皮細胞の angiogenesis への効果、培養内皮細胞の継代を繰り返して作成する老化内皮細胞出現への影響を検討する。内皮細胞の angiogenesis assay は Matrigel® (BD Biosciences) を用いて tube length を LuminaVision® (MITANI Corp.) で定量評価する。老化内皮細胞実験は内皮細胞賦活薬とその vehicle それぞれを添加した培養液で冠動脈内皮細胞を培養し、48 時間毎に継代を重ね内皮細胞の形態や senescence associated  $\beta$ -galactosidase で染色し評価する。

## (2) 血管内皮細胞の賦活化とミトコンドリア機能の変化の関連とその機序の検討

上記(1)で同定した薬剤が内皮細胞ミトコンドリアの数と機能の変化に与える影響を検討する。RNA・蛋白レベルを測定し可能性のあるシグナル伝達経路を検索する。ミトコンドリア数は MitoTracker Green (Molecular Probes) にて蛍光染色し flowcytometry でカウントし、ミトコンドリア機能は細胞内 NADH<sup>+</sup> レベルで評価する。薬剤刺激による RNA・蛋白レベルへの影響は定量 RT-PCR・ウェスタンブロット法で評価する。特定のシグナル伝達経路の関与を証明するために、siRNA や拮抗薬による loss of function、アデノウイルスベクターや薬剤による gain of function の検討を適宜行う。

## (3) マウス大動脈における血管内皮細胞賦活薬の効果の検討

In vitro でスクリーニングした内皮細胞ミトコンドリア機能を賦活させる薬剤とその vehicle をそれぞれ KKAY マウスに投与し、内皮依存性の動脈の弛緩実験や RNA・蛋白発現レベルの変化を検討する。薬剤投与方法は経口投与とし、培養冠動脈内皮細胞実験で有意な効果を示した薬物濃度を計算し 1 週間以上投与する。マウスは動脈硬化モデルマウスである KKAY マウスで検討する。In vitro と

同様に、マウス大動脈の内皮細胞のミトコンドリアの形態評価も試みる。方法は薬剤投与後のマウスに MitoTracker Green を注入し、その後大動脈を取り出して観察する。

#### (4)心疾患患者における薬剤による血管内皮機能障害の治療効果の検討

心疾患患者の血管内皮機能障害を評価し、*in vitro* の実験結果を踏まえて血管内皮細胞の賦活作用を有する薬剤を用いて血管内皮機能障害の改善効果を検討する。対象は心精査目的で入院した20歳から80歳までの患者で、紙面と口頭による説明で理解と同意が得られた患者とする。薬物療法群と対照群に無作為に割り付け、試験登録時の身体所見と血液検査、血管内皮機能を測定する。血管内皮機能は RH-PAT を用いて評価する。入院中は早朝の朝食前に採血と RH-PAT を測定し、外来では午前中に朝食抜きで来院して頂き同様に検査施行する。薬物療法開始前・開始後3ヵ月・6ヵ月の3ポイントで血管内皮機能を測定し治療効果を判定する。薬物療法は標的薬剤が属する作用機序別分類（例えば Ca 拮抗薬、β遮断薬など）を内服していない患者に新規に内服追加するプロトコールと、標的薬剤が属する作用機序別分類の別の薬剤から切り替えて開始するプロトコールで検討する。得られた血管内皮機能のデータを血圧・体重・腎機能・心機能などの臨床パラメータで補正し、薬剤投与による血管内皮機能の変化を統計ソフトにて解析する。

#### (5)独自のヒト抗 CD144 抗体作成と ELISA システム構築の研究

大量に培養したヒト冠動脈内皮細胞から市販されている抗 CD144 ポリクローナル抗体を利用して免疫アフィニティーカラムクロマトグラフィー法で CD144 抗原を抽出する。抽出した抗 CD144 抗原はモノクローナル抗体作製サービスを利用するために専門の民間抗体作成研究所に委託し、マウスを利用して免疫する。得られた抗体を利用して、まず flowcytometry 測定法で CD144-EMP レベルを冠動脈疾患患者で測定し、従来使用していた市販の抗 CD144 抗体を使用して測定した値との相関性を検討する。相関性が確認出来れば作成した独自の抗 CD144 抗体を使用したサンドイッチ ELISA キットの作成を考慮する。CD144 抗原の細胞表面に露出した部位で抗体認識に適した部位の検討とマウス免疫による抗体作成などの専門性が高い技術に関しては民間抗体作成研究所に委託する。

## 4. 研究成果

(1)ヒト冠動脈内皮細胞を賦活化させる薬剤のスクリーニングの結果、アンジオテンシン II受容体拮抗薬であるテルミサルタンが血管内皮細胞を活性化することを確認した。血管内皮細胞の賦活化現象としては、テルミサルタンがミトコンドリア機能を変化させ、細胞内NADH<sup>+</sup>レベルを上昇させた。テルミサルタンは、ヒト冠動脈内皮細胞において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>ストレス負荷に対するapoptosis/necrosisの減少、angiogenesisの増強、Senescence associated β Galactosidase活性によって評価される細胞老化の抑制など血管内皮機能の改善効果を有することが明らかとなった。

(2)血管内皮細胞の賦活化とミトコンドリア機能の変化との関連・機序を検討した結果、テルミサルタンは培養ヒト冠動脈内皮細胞のAMPKを上方制御してミトコンドリア機能を増強している知見が得られた。また、冠動脈内皮細胞における、テルミサルタンによる細胞内NADH<sup>+</sup>レベルの上昇や細胞老化の抑制などの効果に関しては、AMPKの薬理的/遺伝子的な阻害により打ち消されることが明らかとなり、テルミサルタンはAMPKシグナリングを介して血管内皮機能を改善させることが示唆された。

(3)*in vivo*での血管内皮機能について、メタボリックシンドロームモデルであるKKAYマウスの大動脈を用いて検証を行った。内皮依存性の血管弛緩反応で評価した血管内皮機能は、標準食群に比較して高脂肪食群で有意に増悪したが、高脂肪食+テルミサルタン投与群では高脂肪食単独群に比較して有意に内皮機能が改善していた。このテルミサルタン投与による血管内皮機能改善の機序に関して、マウスの大動脈から抽出したタンパクを用いて、現在eNOS/AMPKなどの活性化について検討中である。

(4)心疾患ハイリスク患者を対象としてテルミサルタンが血管内皮機能に及ぼす影響を検討した結果、平均5ヵ月間のテルミサルタン投与により有意にRH-PATの値が改善し、血管内皮機能が賦活化されていることが示唆された。しかし、この結果は途中解析であり十分な被験者数に達していないため、最終的な解析結果が出るまで判断を待つ必要がある。

(5)独自のヒト抗CD144抗体作成とELISAシステム構築に関しては、CD144抗原に対する抗体の至適認識部位を民間抗体作成研究所に依頼して解析した結果、CD144自体が細胞表面に露出している部位が少ないためモノクローナル抗体作成に適した抗原部位をほとんど見出せなかった。可能性のある認識部位でのモノクローナル抗体作成の成功率が50%未満であり、

高額な投資に対してはハイリスクと判断し抗体作成は断念した。

(6)総括

我々の研究により、テルミサルタンが血管保護作用を有することが確認でき、そのメカニズムとしてアンジオテンシンII受容体拮抗作用やPPAR $\gamma$ 活性化作用ではなく、AMPK賦活化を介したミトコンドリア機能の亢進が示唆された。この結果は初めての報告となる。血管内皮機能に着目した抗動脈硬化療法を提唱する礎になると期待される。

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6件)

- ①小西正明、杉山正悟、菅村公一、野崎俊光(他12名)、Basal and Ischemia-Induced Transcardiac Troponin Release into the Coronary Circulation in Patients with Suspected Coronary Artery Disease. 査読有、PLoS ONE、April 2013、Volume 8、Issue 4、e60163、doi:10.1371/journal.pone.0060163
- ②秋山英一、杉山正悟(他18名、4番目)、Incremental Prognostic Significance of Peripheral Endothelial Dysfunction in Patients with Heart Failure with Normal Left Ventricular Ejection Fraction、査読有、J Am Coll Cardiol 2012;60:1778-86
- ③大庭圭介、杉山正悟、角田等、野崎俊光(他20名)、Microvascular Coronary Artery Spasm Presents Distinctive Clinical Features With Endothelial Dysfunction as Nonobstructive Coronary Artery Disease、査読有、J Am Heart Assoc. 2012;1:e002485、doi:10.1161/JAHA.112.002485
- ④小西正明、杉山正悟、菅村公一、野崎俊光(他8名)、Accumulation of pericardial fat correlates with left ventricular diastolic dysfunction in patients with normal ejection fraction、査読有、J Cardiol、2012 May;59(3):344-51. doi:10.1016/j.jjcc.2012.01.006. Epub 2012 Feb 24.
- ⑤松原純一、杉山正悟(他17名、6番目)、A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice、査読有、J Am Coll Cardiol 2012;59:265-76
- ⑥小西正明、杉山正悟、菅村公一、野崎俊光(他

11名)、Total coronary artery plaque burden measured by cardiac computed tomography is associated with metabolic syndrome、査読有、J Atheroscler Thromb、2011;18(11):939-45

[学会発表] (計1件)

①野崎俊光、心血管疾患予防のための新しいバイオマーカー、第75回日本循環器学会総会・学術集会、2011年8月4日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書] (計2件)

- ①野崎俊光、他、メジカルビュー社、循環器専門医：血管内皮細胞由来マイクロパーティクル (endothelium-derived-microparticles; EMP)、2012、210-214
- ②野崎俊光、他、南江堂、Heart View：血中血管内皮機能マーカー(血管内皮細胞由来微小粒子)を用いた心血管疾患の病態評価、2012、78-86

6. 研究組織

(1)研究代表者

野崎 俊光 (NOZAKI TOSHIMITSU)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：10583049