

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462163

研究課題名(和文) 大動脈周囲脂肪組織のアンジオテンシン 受容体サブタイプが大動脈瘤発症に与える影響

研究課題名(英文) Effect of angiotensin II type 1 receptor in perivascular adipose tissue on abdominal aortic aneurysm.

研究代表者

鈴木 純 (Suzuki, Jun)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40452693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大動脈瘤モデルを用いて大動脈瘤発症におけるAT1a受容体の役割、大動脈周囲脂肪組織のAT1a受容体が大動脈瘤の形成・進展に及ぼす影響を検討した。血管周囲脂肪組織におけるAT1a受容体刺激は、オステオポンチンの発現を介して炎症性サイトカインの発現や炎症性(M1)マクロファージの浸潤を促し、MMPの発現増強および活性化から腹部大動脈瘤の発症や進展に重要な役割を果たしていることが示された。更に、血管周囲脂肪組織におけるAT1a受容体は、腹部大動脈瘤発症予防の治療戦略における新たなターゲットとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of PVAT in the progression of abdominal aortic aneurysm (AAA) and hypothesized that deletion of angiotensin II (Ang II) type 1a (AT1a) receptor in PVAT could attenuate AAA in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice. ApoE^{-/-}-AT1a^{-/-} PVAT transplantation significantly attenuated AAA in ApoE^{-/-} recipient mice compared to ApoE^{-/-} PVAT transplanted ApoE^{-/-} recipient mice. On the other hand, ApoE^{-/-} PVAT transplantation significantly exaggerated AAA in ApoE^{-/-}-AT1a^{-/-} recipient mice compared to ApoE^{-/-}-AT1a^{-/-} transplanted ApoE^{-/-}-AT1a^{-/-} recipient mice. Accumulation of macrophage and expression of inflammatory cytokines was attenuated in ApoE^{-/-}-AT1a^{-/-} donor PVAT compared to ApoE^{-/-} donor PVAT. Moreover, expression of osteopontin and activity of matrix metalloprotease (MMP)-2, 9 were largely attenuated in ApoE^{-/-}-AT1a^{-/-} donor PVAT compared to ApoE^{-/-} donor PVAT.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腹部大動脈瘤 血管周囲脂肪 アンジオテンシンII マクロファージ 細胞外基質分解酵素 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

高齢化と生活習慣の欧米化が進み、冠動脈疾患、脳卒中とともに動脈硬化疾患の一つである大動脈疾患の罹患率も増加の一途を辿っている。大動脈瘤破裂、大動脈解離は致死率が非常に高く、近年これら緊急性の高い状態は“急性大動脈症候群”と称され、診断・治療において様々な研究がなされている。しかしながら、大動脈瘤の『手術適応前の治療』は動脈硬化の危険因子の是正とβ遮断薬を主体とした血圧コントロールなどに限られているのが現状である。このような背景から、現在では分子生物学的治療を用いた新たな治療法の開発による瘤の拡大抑制や縮小を目指した研究が世界各国で進められている。大動脈瘤は組織学的に外膜および一部中膜におけるリンパ球、マクロファージの炎症細胞浸潤と細胞外マトリックス構造の消失であり、なかでもマクロファージはマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) をはじめとする蛋白分解酵素および炎症性メディエーターの産生細胞として、大動脈瘤発症の病態において中心的な役割を担っていると考えられている。

また、近年動脈硬化性疾患の危険因子としてメタボリック症候群の関与が注目されている。メタボリック症候群は内臓脂肪の蓄積を特徴とする病態であるが、脂肪細胞における慢性炎症が鍵となり、脂肪細胞から放出される炎症性サイトカイン (TNF-α、MCP-1 など) の増加 (Yudkin JS. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999)、抗炎症性サイトカイン (アディポネクチン) の減少 (Arita Y. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999) が、動脈硬化を含む心血管合併症を増加させる原因の一端を担っていると考えられている。また最近では、血管周囲脂肪の性質の違いが血管リモデリングに影響を与える可能性が報告されている (Takaoka M. *Circ Res.* 2009)。これらのことから、大動脈周囲の脂肪組織の質、性状も動脈硬化性疾患の代表的疾患である大動脈瘤の発症に影響を与える可能性があると考えられるが、その研究は十分になされておらず、詳細なメカニズムも明らかではない。さらに、血管周囲脂肪組織の Ang II 1 型 (AT_{1a}) 受容体が大動脈瘤の発症・進展に与える影響を検討した報告はない。

申請者らは Apolipoprotein E 受容体遺伝子欠損 (ApoE^{-/-}) マウス、ApoE^{-/-}AT_{1a}^{-/-}マウスのプラーク破綻モデルを用いた実験により、AT_{1a} 受容体刺激がプラークの破綻を促進し、その機序にはマクロファージなどの炎症細胞浸潤と MMP をはじめとする蛋白分解酵素の活性増加が関与していることを明らかにした。動脈硬化病変の代表疾患である大動脈瘤発症もプラーク破綻と同様にマクロファージの浸潤、

MMP 発現、炎症性サイトカインなどが深く関与していることが示唆されていることより、AT_{1a} 受容体が大動脈瘤の形成・進展に深く関与している可能性が高いのではないかと考えられる。また、最近の報告で血管周囲脂肪が単なる血管支持組織ではなく動脈硬化病変形成に直接的に働いている可能性が臨床研究でも報告されていることなどより (例 冠動脈周囲脂肪組織の性状と冠動脈病変の有無の関係など)、大動脈周囲の脂肪組織の AT_{1a} 受容体も大動脈瘤の発症・進展に深く関与しているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

上記の研究背景およびこれまでの研究成果や研究手法をもとに、本研究では、①大動脈瘤モデルを用いて大動脈瘤発症における AT_{1a} 受容体の役割を明らかにすること、②大動脈周囲脂肪組織の AT_{1a} 受容体が大動脈瘤の形成・進展に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腹部大動脈瘤モデルマウスの作成

生後 8 週齢の ApoE^{-/-}、ApoE^{-/-}AT_{1a}^{-/-}マウスに高脂肪 (1.25% コレステロール) 食を負荷し、9 週齢より osmotic minipump で生理食塩水と Ang II (1000 ng/kg/min) を 28 日間投与することにより腹部大動脈瘤モデルマウスを作成した。このモデルでは ApoE^{-/-}マウスにおいて腎動脈上の腹部大動脈に 67% の動脈瘤の形成が報告されている (Lisa A. Cassis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007)。13 週齢で腹部大動脈をサンプリングし動脈瘤発生率、動脈瘤の最大血管径、動脈瘤の形態の検討した。

(2) 大動脈瘤モデルマウスへの脂肪移植

生後 8 週齢の ApoE^{-/-}マウスの動脈瘤の発症頻度が高い腎動脈近位腹部大動脈を露出し、その周囲に ApoE^{-/-}、ApoE^{-/-}AT_{1a}^{-/-}マウスの精巢上体脂肪組織を移植する。移植直後より通常の大動脈瘤モデルと同様に高脂肪食を開始し、9 週齢で osmotic minipump を植え込み Ang II (1000 ng/kg/min) を 28 日間投与した。13 週齢で腹部大動脈、移植した大動脈周囲脂肪をサンプリングした。

(3) 動脈瘤血管径、組織学的検討

サンプリングした腹部大動脈の血管径を計測し、各群間での比較検討を行った。また、免疫組織化学的手法によりマクロファージ浸潤の程度を評価するとともに、in situ zymography により MMP-2、9 活性に差がないか否かについても検討を加えた。

(4) 脂肪組織の採取、検討

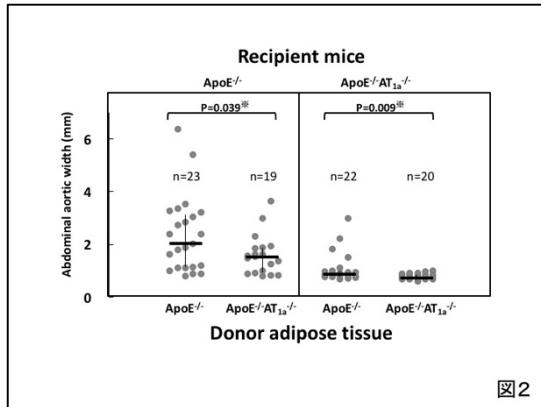
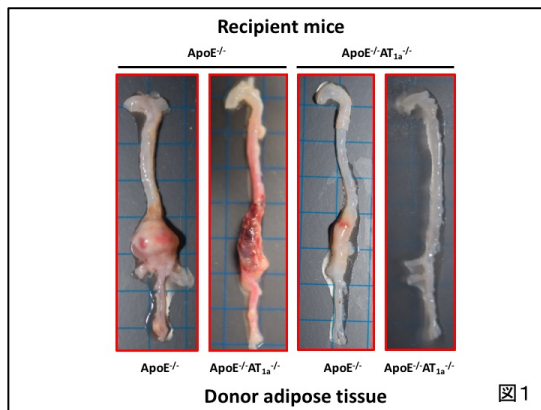
28 日間高脂肪食と Ang II (1000 ng/kg/min) で刺激された ApoE^{-/-}、ApoE^{-/-}AT_{1a}^{-/-}マウスの精巢上体脂肪組織をサンプリングし、定量的 PCR や Western blotting により炎症性サイトカイン/ケモカインの mRNA 発現やタンパク発現を検討した。更に、脂肪組織に浸潤しているマクロファージの M1/M2 極性を fluorescence-activated cell sorting により検討

した。

4. 研究成果

(1) 血管周囲脂肪組織における AT_{1a} 受容体遺伝子発現が腹部大動脈瘤の発症に及ぼす影響

$ApoE^{-/-}$ マウスの腹部大動脈周囲に $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織を移植した群では、 $ApoE^{-/-}$ マウスの腹部大動脈周囲に $ApoE^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織を移植した群に比し、腹部大動脈瘤の発症が有意に抑制されていた ($p=0.039$)。一方で、 $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの腹部大動脈周囲に $ApoE^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織を移植した群では、 $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの腹部大動脈周囲に $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織を移植した群に比し、腹部大動脈瘤が有意に増悪していた ($p=0.009$) (図1、2)。

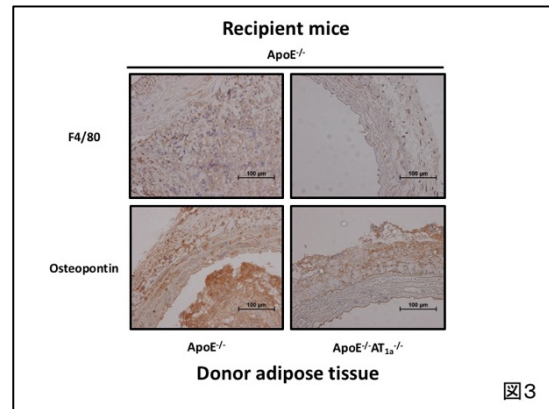


これらの結果は、血管組織のみならず、血管周囲脂肪組織における AT_{1a} 受容体が腹部大動脈瘤の発症に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(2) 大動脈瘤病変組織におけるマクロファージ浸潤、オステオポンチン発現、MMP 発現・活性

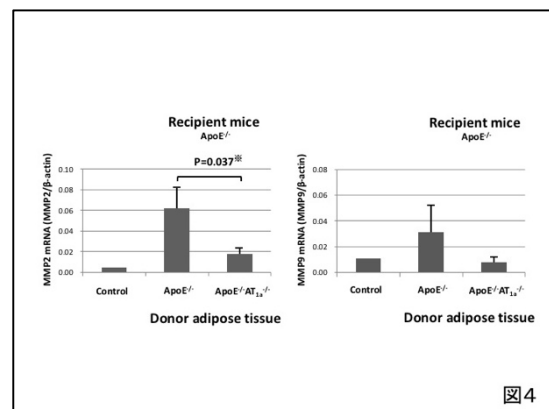
AT_{1a} 受容体遺伝子欠損脂肪組織の移植によって腹部大動脈瘤の発症が抑制されるメカニズムを明らかにするため、まず、摘出した腹部大動脈瘤サンプルを用いて組織学的検討を行った。 $ApoE^{-/-}$ マウスの腹部大動脈周囲に $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織を移植した群では、 $ApoE^{-/-}$ マウスの腹部大動脈周囲に $ApoE^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織を移植した群に比し、腹部大動脈組織へのマクロフ

ァージ浸潤、オステオポンチン発現がいずれも低下していた (図3)。更に、*in situ* zymography による検討では、同様に $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織を移植した群で MMP-2、9 活性が減弱していることが判明した。



(3) 脂肪組織におけるオステオポンチンおよび MMP 発現

28 日間高脂肪食と Ang II (1000 ng/kg/min) で刺激された $ApoE^{-/-}$ 、 $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織をサンプリングし、定量的 PCR や Western blotting によりアディポカインの mRNA、タンパク発現を検討したところ、 $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織では $ApoE^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織に比し、炎症性サイトカインである TNF- α の発現が低下していることが分かった。また、同様に $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織では $ApoE^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織に比し、オステオポンチン、MMP-2 の mRNA 発現が有意 ($p=0.037$) に低下しており、MMP-9 の mRNA 発現が低下傾向にあった (図4)。



(4) 脂肪組織浸潤マクロファージの極性
脂肪組織に浸潤しているマクロファージの M1/M2 極性を fluorescence-activated cell sorting により検討したところ、 $ApoE^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織に浸潤したマクロファージは、 $ApoE^{-/-}$ $AT_{1a}^{-/-}$ マウスの精巣上体脂肪組織に浸潤したマクロファージに比し、M1 極性に傾いていることが判明した (図5)。

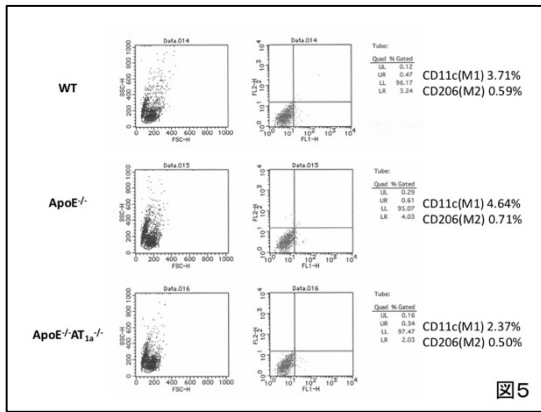


図5

以上の結果より、血管周囲脂肪組織における AT_{1a} 受容体刺激は、オステオポンチンの発現を介して炎症性サイトカインの発現や炎症性 (M1) マクロファージの浸潤を促し、MMP の発現増強および活性化から腹部大動脈瘤の発症や進展に重要な役割を果たしていることが示された。更に、血管周囲脂肪組織における AT_{1a} 受容体は、腹部大動脈瘤発症予防の治療戦略における新たなターゲットとなりうる可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 純 (Suzuki, Jun)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40452693