

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430089

研究課題名(和文)世界初の急性冠症候群疾患モデルの実現

研究課題名(英文)Development of the novel in vivo model for acute coronary syndrome

研究代表者

小池 智也(Koike, Tomonari)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40432158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：働き盛りの生命を前触れなく奪う急性冠症候群は、その予防法の開発が必須だが、この病態を再現できる生体モデルが存在しないことが予防法開発の障壁となっていた。本研究課題では、我々が独自に開発した疾患モデルを応用し、急性冠症候群を再現できるモデルの開発を試み、疾患発症のきっかけとなる現象(冠動脈硬化プラークの損傷)を高率に誘発できるモデルの開発に成功した。この新規モデルは、急性冠症候群の予防を目的とした新薬の生体レベルでの薬効評価において優れたツールとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Acute coronary syndrome (ACS) is a life-threatening disease for mainly middle-aged men. Although prevention of ACS is one of the most important tasks for human beings, a lack of an appropriate animal model for this disease is a barrier for the development of its prevention. We tried to develop the animal model for ACS and we've established the experimental model for mimicking the initiation of ACS, i.e., coronary plaque injury, in the coronary arteries of live animals. It is expected that this model may contribute to the evaluation of novel drugs for prevention of ACS.

研究分野：実験動物学

キーワード：急性冠症候群 疾患モデル 冠動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性冠症候群 (ACS) の動物モデルが存在せず、決定的な治療戦略が確立されていない

ACS は働き盛りの中高年を突然死させる重篤な疾患のため、その予防法・治療法の開発が世界的に研究されている。しかし、研究推進に必須となるモデル動物がなく、本疾患の新たな予防法開発の障壁となっている。現在、ACS の予防を目的としてコレステロール低下剤 (スタチン) が広く処方されているが、ACS 発症の予防効果は約 30%と低い。また、重度の高コレステロール血症を示す患者に対し、血中コレステロールを強力に低下させても冠動脈プラークの進展を抑制できなかったという臨床研究があり (N Engl J Med 2008;358:1431-43)、脂質低下に頼る現状の予防法だけでは不十分な状況にある。

(2) ヒトの ACS を再現できる疾患モデルが求められる

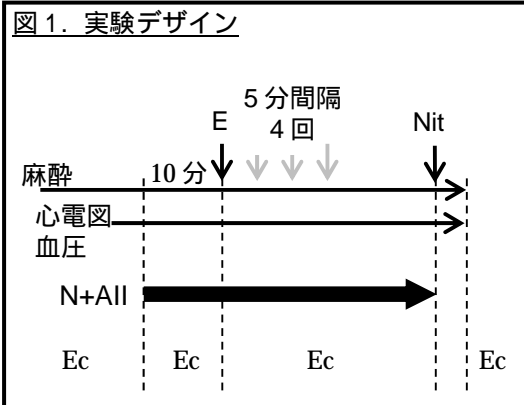
ACS は種々の機序により発症するが、中でも、心臓の血管 (冠動脈) の動脈硬化病変 (プラーク) に破裂が生じ、プラーク内容物が血中に流出して急性の血栓を発生させ、その血栓で冠動脈が突如閉塞し、心筋が虚血状態に陥ることによって発症するケースが多い。これらは発症直前まで自覚症状がないため、予測・予防が困難である。この研究の推進には、適した疾患モデル動物が必須だが、ヒトに類似した冠動脈プラークを自然発症する動物モデルは当施設で開発された WHHLM1 ウサギ以外には報告がない (Curr Opin Lipidol 2008;19:631-6, Atherosclerosis 2009;207:1-7)。これまで、ブタや正常ウサギに冠動脈の異常収縮 (冠攣縮) を誘発させ、冠動脈プラークの破裂による ACS の発症を再現する試みが行われたが、臨床に類似した生理的条件下でそれを再現できたモデルは存在しなかった。

2. 研究の目的

生体内で自然発症した冠動脈プラークに薬剤誘発性の冠攣縮を生じさせることで高率にプラーク損傷・破綻を誘発できるモデルを開発する。これによりプラーク破綻による血栓形成によって ACS を発症する世界初のモデル動物の開発を試みる。

3. 研究の方法

WHHLM1 ウサギの冠動脈に自然発症するプラークを、薬剤投与による冠攣縮の誘発によりプラーク破綻を引き起こすことで、ACS モデルを確立する。実験デザインを以下に示す。



N; Norepinephrine, All; Angiotensin II, E; Ergonovine, Nit; Nitroglycerine, Ec; 心エコー

使用動物; WHHLM1 ウサギ、約 30 月齢 (高齢)、約 12 月齢 (若齢)。

冠攣縮誘発薬の投与量; Norepinephrine (1 microgram/kg/min), Angiotensin II (20 nanogram/kg/min), Ergonovine (1000 microgram/kg), Nitroglycerine (50 microgram/kg)。投与は全て経静脈投与。

麻酔; Ketamine (15mg/kg) と Midazolam (1 mg/kg) の混合液の静脈投与により導入麻酔とし、維持麻酔には Ketamine の持続投与 (60 mg/kg/h) を行った。

血圧; 大腿動脈にカテーテルを留置し、圧トランスデューサーと接続した。心電図; 四肢および胸部に電極を取り付け、12 誘導心電図を計測した。血圧および心電図データの取得は日本光電のポリグラフシステムを用いた。心エコー; 冠攣縮に伴う心機能の変化を Philips 社の Envisor C を使用して計測した。

病理組織学的解析; 当施設の定法

(Arterioscler Thromb Vasc Biol.

2013;33:2518-2523) により標本を作製した。ウサギ冠動脈の左冠動脈回旋枝 (LCX) を 100-1000 micrometer 間隔で 30-100 枚の標本を作製した。左冠動脈前下行枝 (LAD)、中隔枝 (LSP)、

右冠動脈(RCA)も同様の間隔で5-30枚の標本を作製した。標本の染色はElastica van GiesonまたはVictoria Blue HEにより行った。

4. 研究成果

当施設にて確立されたウサギへの冠攣縮誘導法(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013; 33:2518-2523)により、WHHLMI ウサギにて、虚血性の心電図所見の誘発ならびにプラーク損傷・破綻が認められていたが、その頻度が低く実用化が困難なため方法の改良に着手し、本研究課題開始前年度までに、実験デザイン(図1)に示した方法ならびに実験方法に示した投与量による方法を確立し、本研究課題に採用した。この方法で高齢(約30月齢)のWHHLMI ウサギに投薬したところ、冠攣縮の誘発率は従来法と大きな違いは認められなかった(従来法77%、今回80%)が、冠攣縮に伴う冠動脈プラークの損傷について病理組織学的解析を行ったところ、病変内マクロファージの内腔への突出を伴うプラーク損傷の頻度が大幅に増加していることが明らかになった(図2,3)。

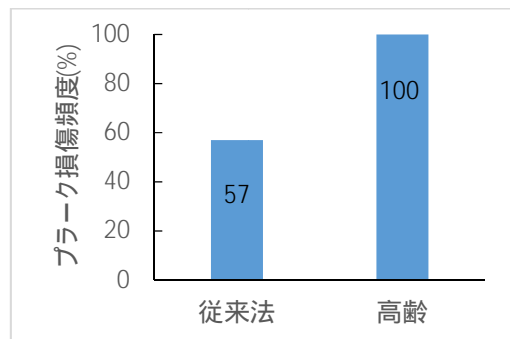


図2. プラーク損傷の頻度(%)

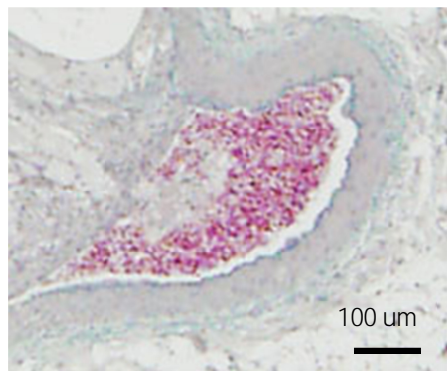


図3. マクロファージの内腔への突出

続いて、高齢個体に比べ、泡沫細胞に富む脆弱なプラークを持つ若齢個体を使用し、同様の方法にて冠攣縮を誘発した。その結果、若齢群では高齢群に比べ、より高率に冠攣縮が誘発された(図4)。

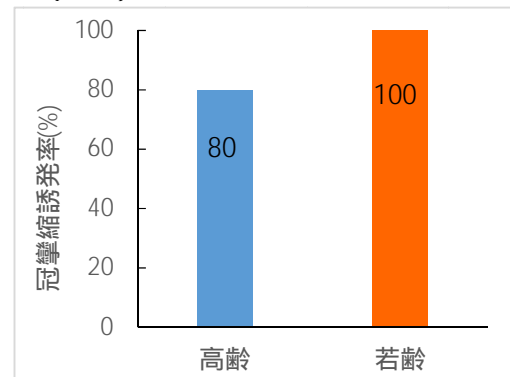


図4. 冠攣縮の誘発率(%)

心電図所見を解析すると、従来法では約8割の個体で認められていたSTの低下が若齢群では全例に認められ、従来法では3割弱でしか認められず、今回使用した高齢群では観察されなかったSTの上昇が、若齢群では約8割という高頻度で認められた。

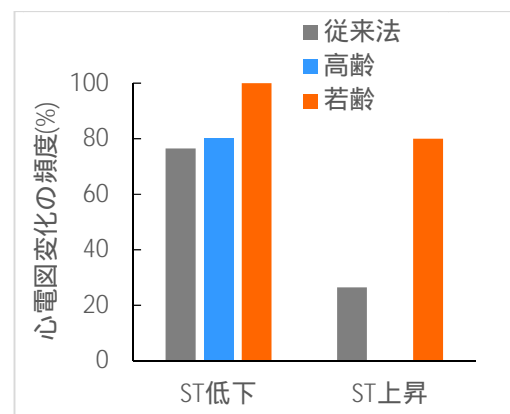


図5. 心電図変化の頻度(%)

続いて、若齢個体の冠動脈プラークについて、詳細な病理組織解析を行った。その結果、本研究で使用した若齢個体の冠動脈狭窄率には大きな個体差が存在することが明らかになった(平均狭窄率3-82%)。この結果より、重度の冠動脈狭窄のある高齢個体と比べ狭窄率が軽度でも、若齢個体のほうが薬剤誘発性の冠攣縮に対する感受性が高い可能性が示唆された。

プラークの損傷を示す病理所見は、若齢個体でも高齢個体と同様に全例に認められた。さらに、若齢個体では、病変内に赤血球が存在する所見が3割の個体に認められた(図6)。

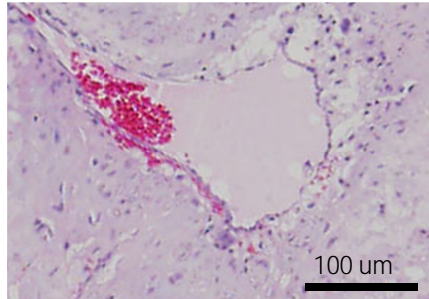


図6. 病変内の赤血球の存在

成果のまとめと期待される価値；本研究にて、当施設で確立した冠攣縮誘導法の改良により、高率にプラーク損傷を誘発することに成功した。プラーク破綻に伴う血栓の形成と冠動脈の閉塞は残念ながら誘発できなかったが、プラーク損傷を高頻度に誘発できるモデルは、ACS予防を目的としたプラークの安定化を狙う新薬の開発において、極めて有用な動物モデルとなることが期待される。これまで、プラークの安定化は、プラーク内の細胞成分(泡沫細胞、血管平滑筋細胞)ならびに繊維成分(コラーゲン、エラスチン)の染色による形態的所見でしか評価できなかったが、本研究により開発された実験モデルを用いることにより、プラーク損傷・破綻に対するプラークの物理的特性を生体内環境にて直接評価できる。高コレステロール血症の第一選択薬であるスタチンが世界的に処方されて既に30年が経過し、患者の冠動脈プラークの性状は大きく変化し、かつてのような脂質に富むプラークではなく、繊維性のプラークが大きく増えたという。それにも関わらずACSを発症する患者が後を絶たないことから、ACS研究の世界的権威であるハーバード大学のPeter Libby教授が、現在のACS発症の機序について新たな提言を発表した(Changing views on mechanisms of atherosclerosis, Feb.12, 2016, Physicians' Academy for Cardiovascular Education)。その提言では、形態的特徴だけを見ると”安定プラーク”とされる繊維性のプラークでもACSの発症につながるということが語られており、従来の病理組織学的な

プラーク安定化の評価が今後その価値を失っていく可能性が示唆され、一方で、本研究で開発された、プラークの物理特性を生きた動物の冠動脈で評価できるモデルの有用性がさらに高まっていくことが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- Koike T, Tamura S, Yu Y, Kuniyoshi N, Shiomi M. High susceptibility of atherosclerotic coronary arteries to the onset of vasospasm and angina pectoris-like symptoms due to coronary spasm in WHHLMI rabbits. *Exp Anim*. 2016, Nov 1;65(4):419-426. doi: 10.1538/expanim.16-0035. PMID: 27301847.
- Wang Z, Zhang J, Li H, Li J, Niimi M, Ding G, Chen H, Xu J, Zhang H, Xu Z, Dai Y, Gui T, Li S, Liu Z, Wu S, Cao M, Zhou L, Lu X, Wang J, Yang J, Fu Y, Yang D, Song J, Zhu T, Li S, Ning B, Wang Z, Koike T, Shiomi M, Liu E, Chen L, Fan J, Chen YE, Li Y. Hyperlipidemia-associated gene variations and expression patterns revealed by whole-genome and transcriptome sequencing of rabbit models. *Sci Rep*. 2016 Jun 1;6:26942. doi: 10.1038/srep26942. PMID: 27245873.
- Ning B, Wang X, Yu Y, Waqar AB, Yu Q, Koike T, Shiomi M, Liu E, Wang Y, Fan J. High-fructose and high-fat diet-induced insulin resistance enhances atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Nutr Metab (Lond)*. 2015 Aug 12;12:30. doi: 10.1186/s12986-015-0024-3. PMID: 26265929.
- Takeda H, Koike T, Izumi Y, Yamada T, Yoshida M, Shiomi M, Fukusaki E, Bamba T. Lipidomic analysis of plasma lipoprotein fractions in myocardial infarction-prone rabbits. *J Biosci Bioeng*. 2015 Oct; 120(4):476-82. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.02.015. PMID: 26162515.

[学会発表] (計 10 件)

小池 智也、冠動脈プラークの発生・進展過程の解明 - WHHLM I ウサギによる解析、第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2015.7.9、仙台国際センター(宮城県)

小池 智也、WHHLM I ウサギを用いた冠動脈プラークの発生・進展過程の検討、第 62 回日本実験動物学会総会、2015.5.30、京都テルサ(京都府)

小池 智也、Initiation and progression of coronary atherosclerosis in WHHLM I rabbits、17th International Congress on Atherosclerosis 2015、2015.5.24、アムステルダム(オランダ)

田村姿央理、冠動脈病変が冠スパズムおよび狭心症発症に及ぼす影響、WHHLM I ウサギを用いた実験的検証、第 124 回関西実験動物研究会、2014.12.5、京都大学(京都府)

于 イン、High susceptibility of atherosclerosis coronary arteries to the onset of vasospasm and angina pectoris due to coronary spasm in WHHLM I rabbits、The 2nd Sino-Japan Rabbit Model Meeting、2014.8.8、長春市(中国)

小池 智也、Coronary atherosclerosis of WHHLM I rabbits affected by aging、The 2nd Sino-Japan Rabbit Model Meeting、2014.8.8、長春市(中国)

小池 智也、WHHLM I ウサギ冠動脈プラークの加齢による質的、量的変化、第 3 回ウサギバイオサイエンス研究会、2014.8.2、山梨大学(山梨県)

小池 智也、WHHLM I ウサギ冠動脈プラークの加齢による質的、量的変化、第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2014.7.11、京王プラザホテル(東京都)

小池 智也、WHHLM I ウサギの冠攣縮性狭心症に対する冠動脈硬化の影響、日本実験動物学会、2014.5.15、札幌コンベンションセンター(北海道)

小池 智也、WHHLM I ウサギへの冠攣縮誘導による急性冠症候群の誘発(奨励賞受賞講演)、第 61 回日本実験動物学会総会、2014.5.15、札幌コンベンションセンター(北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 智也 (KOIKE, Tomonari)
神戸大学大学院医学研究科・助教
研究者番号: 40432158

(2) 研究分担者

塩見 雅志 (SHIOMI, Masashi)
神戸大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 50226106

石田 達郎 (ISHIDA, Tatsuro)
神戸大学大学院医学研究科・教授
研究者番号: 00379413

于 イン (YU, Ying)
神戸大学大学院医学研究科・講師(研究機関研究員)
研究者番号: 30644942