

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461141

研究課題名(和文) 血管と周囲組織の微小血管構造と外膜微小血管を中心とした動脈硬化病変の成因の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of atherosclerosis focusing on arteries, microvessels in perivascular tissues and vasa vasorum in adventitia

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化病変を持つ血管の外膜では微小血管が増殖し、血管外膜側からプラーク内に侵入して病変内に脂質や炎症細胞を供給する導管となっている。また、血管に隣接して、豊富な微小血管を含む周囲脂肪組織が存在する。血管周囲脂肪組織はアディポサイトカインを産生し動脈硬化病変の形成に関与すると考えられている。しかし、血管と外膜微小血管、血管周囲脂肪組織中の微小血管の関連は明らかになっていない。本研究では、マウスを用いて、動脈硬化モデルマウスに自然発症する動脈硬化病変や、機械的血管傷害で生じる血管病変における、血管外膜微小血管と周囲組織の構造的、機能的関連を評価した。

研究成果の概要(英文)：In adventitial area of advanced atherosclerotic lesion, vasa vasorum expands and penetrates into atherosclerotic plaque from the adventitial side, plays as a conduit which supplies lipid and inflammatory cells into the plaque. Adjacent to arteries, there are perivascular adipose tissues, which have plentiful capillary networks. Perivascular adipose tissue is considered to secrete adipocytokines, that control vascular lesion formation. However, the relation between arteries, adventitial vasa vasorum and capillaries in perivascular adipose tissue remains to be elucidated. In this study, the structural and functional relation between arteries, adventitial vasa vasorum and perivascular tissues were evaluated, using spontaneous and mechanically induced vascular lesions in mouse models of atherosclerosis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 血管外膜 血管外膜微小血管 血管周囲脂肪組織 動脈硬化モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 最近では、動脈硬化病変は血管の慢性炎症により生じるとされている。高血圧や脂質異常症などの環境下で生じる血管の炎症は、血管内皮障害に始まり、炎症が外膜側に波及すると考えられている。このため、血管内皮細胞や動脈硬化プラークの構成成分が注目されてきた。一方で、血管外膜に、動脈硬化の進展に伴い微小血管 (vasa vasorum, VV) の増殖が生じることも古くから知られていた (Barger AC, N Engl J Med. 1984;310:175-177)。
- (2) VV は正常血管では、内腔からの養分や酸素が行き届かない血管外膜側の栄養血管であるが、動脈硬化病変では増殖して外膜側からプラーク内に侵入し、病変内に脂質や炎症細胞を供給する導管となり、病変を拡大し脆弱化させてプラーク破綻を招く (Moulton KS, Current Opin Lipidol. 2006;17:548-555)。
- (3) さらに最近では、血管周囲脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインが、局所の動脈硬化病変に作用する際、直接浸潤する他、血管外膜 VV を介した経路の可能性も示唆されている (Rajshaker S. Curr Opin Pharmacol. 2010;10:191-196)。このように、動脈硬化病変と血管外膜 VV、血管周囲脂肪組織は、構造のおよび機能的に関連している可能性があるが、詳細は明らかになっていなかった。
- (4) 研究代表者はこれまでの研究で、動脈硬化モデルマウスであるアポリポプロテイン E 欠損マウス (ApoE 欠損マウス) を用いて、ピオチン付きトマトレクチン灌流染色による微小血管染色により、動脈硬化病変の血管外膜 VV の評価を行ってきた。その結果、ApoE 欠損マウスの腹部大動脈に生じる動脈硬化病変では、病変の拡大に伴い血管外膜 VV の増殖が生じること、微小血管を増殖させる作用を持つ線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) を徐放化して若年 ApoE 欠損マウスの腹部大動脈周囲に留置すると、血管外膜 VV 増殖とその周囲への炎症細胞集積が生じ、その後に動脈硬化病変が生じること、つまり、血管外膜側から内膜側へも炎症が波及しうることを見出し報告した (Tanaka K, Atherosclerosis. 2011;215(2):366-73)。しかし、野生型マウスに同様の bFGF 投与を行っても、外膜 VV 増殖は生じるものの、動脈硬化病変は形成されなかった。

2. 研究の目的

- (1) 動脈硬化病変と血管外膜 VV、血管周囲脂肪組織の構造のおよび機能的関連を、高齢 ApoE 欠損マウスに自然発症する動脈硬化病変や、脂肪組織移植や機械的血管傷害を組み合わせたモデルを用いて評価する。

- (2) 従来言われている血管内膜側から外膜側とは逆の、血管外膜側から内膜側への炎症の波及により、動脈硬化病変が形成されうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 動脈硬化病変、外膜 VV、血管周囲脂肪組織の微小血管の構造的関連の検討

ApoE 欠損マウスに 7 週令から高脂食を投与し長期間 (50 週令程度) 飼育する。ピオチン付きトマトレクチン灌流染色により微小血管染色を行った後、腹部大動脈やその他の動脈を脂肪組織などの周囲組織と一塊にして採取し、組織標本を作製する。薄切の後、アビジン・ピオチン複合体法およびアルカリフォスファターゼ基質キットを用いて発色し、微小血管の構造を観察する。

研究代表者は、これまでの観察により、高齢 ApoE 欠損マウスでは、大動脈の他、大腿動脈にも動脈硬化病変が自然発症することを見出した。高齢 ApoE マウスの大腿動脈周囲に、全身に緑色蛍光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) を発現する GFP マウスから採取した脂肪組織を移植し、期間を置いたのち、微小血管灌流染色を行い、大腿動脈を周囲組織と共に採取する。GFP の緑色蛍光を維持するため、プラスチック包埋により組織切片を作成し、血管周囲に移植した脂肪組織由来の微小血管 (GFP 陽性およびトマトレクチン染色陽性) の構造を、共焦点顕微鏡を用いて観察する。

機械的血管傷害により生じる病変を用いた評価も行う。ApoE 欠損マウスの頸動脈に部分結紮 (頸動脈分岐部より頭側を、上甲状腺動脈を残して結紮するモデル。血流減少に伴うシェアストレスの変動により血管内皮障害を生じ短期間で動脈硬化病変を生じるといわれている。 (Nam D. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 ; 297:H1535-1543)) を行い、周囲に別の雄の ApoE 欠損マウスから採取した脂肪組織 (精巣周囲脂肪組織) を移植し、部分結紮のみの群と比較し、血管外膜 VV の増殖に違いを認めるか観察する。GFP マウスから採取した脂肪組織でも同様の移植を行う。期間を置いたのち、微小血管灌流染色を行ってから頸動脈を周囲脂肪組織と一緒に採取し、プラスチック包埋により組織切片を作成し、GFP 陽性微小血管を観察する。

- (2) 血管外膜側から内膜側への炎症の波及が動脈硬化病変形成に与える影響の検討

若年野生型マウス (C57/B6) マウスの腹部大動脈周囲に、酸性ゼラチンに混合して徐

放化した bFGF を留置して血管外膜 VV 増殖を生じさせる。

期間を置いて血管外膜に VV 増殖が生じたのち、ApoE 欠損マウスと GFP マウスを掛け合わせて作成した ApoE 欠損 GFP 陽性マウスの腹腔にチオグリコレート培地を注入して採取した腹水中のマクロファージを、ジェル(Pluronic F-127 gel)に混合し、血管外膜に留置し、血管外膜 VV 増殖およびその周囲に炎症細胞が集積した状態を作成する。

さらに期間を置いた後、微小血管灌流染色を行ってから腹部大動脈を周囲組織と一塊にして採取し、プラスチック包埋を行って組織切片を作成し、血管外膜での VV 増殖および炎症細胞集積を強制的に生じさせることにより、野生型マウスでも動脈硬化病変が形成されるか観察する。

4. 研究成果

- (1) 7 週令から高脂食を投与した 50 週令の雄の ApoE 欠損マウスの胸部および腹部大動脈、大腿動脈を観察したところ、胸部および腹部大動脈の、脂質コアを伴う拡大した病変でも VV 増殖が明らかでない病変を認めた一方、それより径の細い大腿動脈周囲に VV 増殖を伴う動脈硬化病変を認めるものがあった。これより、VV 増殖を伴わずに進展する動脈硬化病変も存在することがわかった。
- (2) 24 週令の ApoE 欠損マウスの大動脈周囲に、GFP マウスから採取した精巣周囲脂肪組織を巻き付けるように移植した。23 週後に大動脈を周囲脂肪と一緒に採取して組織標本作製し観察した。このモデルでは外膜 VV への GFP 陽性細胞の関与は明らかにできなかった。
- (3) 20-25 週令の ApoE 欠損マウスの頸動脈を部分結紮し、別の ApoE 欠損マウスから採取した精巣周囲脂肪組織を巻き付けるように移植し、8 週後に病変を観察した。脂肪移植を行った病変では、頸動脈部分結紮のみを行った病変と比較し、病変の大きさ(血管内膜/中膜面積比)は同等であった。しかし、血管外膜 VV 数は、明らかに増加していた。これより、脂肪移植により、外膜 VV が増加したと考えられた。
- (4) 20-25 週令の ApoE 欠損マウスの頸動脈を部分結紮し、雄の GFP 陽性マウスから採取した精巣周囲脂肪組織を巻き付けるように移植し、8 週間後に病変を観察した。頸動脈には動脈硬化病変の形成を認め、血管周囲には、増殖した外膜 VV を認めた。その一部は、トマトレクチン染色および

GFP 二重陽性であり、移植した GFP 脂肪組織由来の微小血管と考えられた。これより、血管周囲脂肪組織に含まれる血管細胞は、血管外膜 VV の増殖に関与している可能性が示唆された。

- (5) 9-10 週令の雄の野生型マウス(C57BL/6)の後腹膜腔腹部大動脈周囲に、酸性ゼラチンに混合して徐放化した bFGF を留置し、13 週後に腹部大動脈および周囲組織を観察した。細胞が一層の新生内膜を認めるものもあったが、明らかな動脈硬化病変は形成されていなかった。しかし血管外膜には、増殖した外膜 VV を認めた。同様に、9-10 週令の雄の C57BL/6 マウスの腹部大動脈周囲に bFGF を留置した。13 週後に、ApoE 欠損 GFP 陽性マウスの腹腔にチオグリコレート培地を注入し、3 日後に腹水を採取し、遠心して得た腹腔マクロファージを Pluronic F-127 gel に混合し、bFGF を投与した部位と同じ部位に注入した。注入後 9 週後に腹部大動脈と周囲組織を観察した。このモデルでは、腹部大動脈周囲に GFP 陽性マクロファージは認められず、bFGF のみ投与した場合と同様、動脈硬化病変の拡大は認められなかった。今後、手術タイミングを変更するなどして検討する予定である。

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 9 件)

Hotimah Masdan Salim, Daiju Fukuda, Yasutomi Higashikuni, Kimie Tanaka, et al. Teneligliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, attenuated pro-inflammatory perivascular adipose tissue and inhibited atherogenesis in normoglycemic apolipoprotein-E deficient mice. 査読有. *Vascul Pharmacol.* 2017. 印刷中. doi: 10.1016/j.vph.2017.03.003.

Akira Takashima, Daiju Fukuda, Kimie Tanaka, et al. Combination of n-3 polyunsaturated fatty acids reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting macrophage activation. 査読有. *Atherosclerosis.* 2016;254:142-150. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.02.

田中君枝, 佐田政隆. PPAR α と疾患. 査読無. *The Lipid.* 2016;27(4):343-349. http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0007_2704

田中君枝, 佐田政隆. 血管周囲脂肪組織と血管外膜微小血管. 査読有. 化学と生物. 2016;54(10):713-718.
https://katosei.jsbba.or.jp/back_issue.php?bn_vol=54&bn_no=10

Kimie Tanaka, Masataka Sata. Visualization of the human coronary vasa vasorum in vivo. 査読有. Circ J. 2015;79(6):1211-2.
doi:10.1253/circj.CJ-15-0356.

田中君枝, 佐田政隆. 動脈硬化病変における血管周囲脂肪組織と血管外膜微小血管の役割. 査読無. 血管. 2015;38(3):95-107.
http://jscr21.medic.mie-u.ac.jp/upload_file/p4_zf20161020052451.pdf

田中君枝, 佐田政隆. 血管のアンチエイジング. 査読無. Progress in Medicine. 2015;35(6):961-965.
http://www.lifesci.co.jp/pm/20150707_3096/

田中君枝, 佐田政隆. 高齢者の動脈硬化治療. 査読無. 循環器内科. 2014;76(3):289-295.
<http://www.kahyo.com/item/J201409-763>

田中君枝, 佐田政隆. 粥状動脈硬化. 査読無. 臨床循環器 Circulation. 2014;4(4):45-53.
http://www.igaku.co.jp/circulation/circulation_1404.html

[学会発表](計 4 件)

田中君枝, 糖尿病における微小血管傷害: モデルマウスを用いた血管外膜微小血管の検討, 第 24 回日本血管生物医学学会学術集会, 2016 年 12 月 10 日, 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

田中君枝, 動脈硬化病変における vasa vasorum の役割: 動脈硬化モデルマウスを用いた検討, 第 47 回日本動脈硬化学会・学術集会, 2015 年 7 月 10 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Kimie Tanaka, Masataka Sata, Issei Komuro. Vascular cells originating from perivascular adipose tissues contribute to vasa vasorum neovascularization in atherosclerosis. American Heart Association Scientific Session 2015. 2015 年 11 月 9 日, Orlando, FL, USA.

田中君枝, 佐田政隆. Vasa vasorum and atherosclerosis; Analysis using murine

models of vascular disease. 第 80 回日本循環器学会学術集会, 2016 年 3 月 20 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

[図書](計 3 件)

Masataka Sata, Kimie Tanaka and Daiju Fukuda. Springer. Mouse Models of Vascular Diseases. 2016, 296(3-20).

田中君枝, 佐田政隆. 中外医学社. EBM 循環器疾患の治療 2015-2016. 2015, 472(25-29).

田中君枝, 佐田政隆. 文光堂. 心血管事故を予防するための糖尿病治療戦略-実践のための Q&A. 2016, 237(60-63).

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

(4) 研究協力者 なし