

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861112

研究課題名(和文) 動脈硬化病態形成のメカニズム解明によるプラーク破裂予測因子の新規探索

研究課題名(英文) Novel predictor discovery of plaque rupture in pathological mechanism of atherosclerosis development

研究代表者

田 哲(Tian, Zhe)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・研究員

研究者番号：80723890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ApoE 欠損マウスを用いて6週間のニコチン持続投与による動脈硬化プラークの検討を行った。ニコチン群はコントロール群に比べ、プラーク形成の増加、Angpt12の発現上昇を認めた。さらにマウス初代培養血管内皮細胞にニコチン添加を行い、Angpt12の発現上昇を認めた。ニコチンによるプラーク形成がAngpt12を介するか確認のためApoE;Angpt12 欠損マウスを用いて6週間ニコチン持続投与を行った。ニコチン群とコントロール群はプラーク形成について差異を認めなかった。以上よりニコチンは血管内皮細胞のAngpt12を発現させ、Angpt12を介してプラーク形成を促進させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed the analysis of Angpt12 mRNA expression level in aorta of ApoE knockout mice with chronic administration of nicotine using osmotic pumps. The mRNA expression level of Angpt12 in aorta at 6 week after nicotine administration was significantly increased compared with vehicle control. Moreover, the mRNA expression level of Angpt12 in mouse primary endothelial cells with nicotine treatment was also significantly increased compared with control. To investigate whether the development of atherosclerotic plaque with nicotine treatment was dependent on Angpt12, we analyzed the atherosclerotic plaque of Angpt12; ApoE double KO (DKO) mice with 6-week nicotine administration. No differences were observed in size of atherosclerotic plaques of DKO mice between nicotine administration and vehicle group. These data suggested that nicotine induced Angpt12 expression in endothelial cells and then may promote atherosclerotic plaque.

研究分野：分子生物学

キーワード：動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

本邦において生活習慣の欧米化により虚血性心疾患、脳血管障害等の動脈硬化性血管病が激増し、日本人の死因統計上、がんと並んで30%の大きな位置を占めている。動脈硬化性血管病の有効な予防やその治療対策の確立は超高齢化社会時代を迎えた本邦において健康長寿社会実現のために必須の課題であり急務である。最近、動脈硬化病態形成に関して肥満、糖尿病、脂質代謝異常症などのメタボリック症候群の危険因子が集積することにより進行し、血管内皮細胞の機能障害と血管壁における慢性炎症が、動脈硬化症の病態進展の鍵を握っていることが明らかとなった。さらに、急性冠症候群の病態であるプラーク不安定化及びその破綻には、炎症性刺激によるマクロファージの活性化が関与し、それを規定する因子は破綻部における血流異常や凝固線溶系のバランスだけでなく、プラークにおける小胞体ストレス等による慢性炎症が深く関与していることが報告されている。近年の研究より、そのプラーク破綻のメカニズムに関連する分子マーカー、細胞内シグナル、転写因子、増殖因子等が解明されつつあるが、プラークの破綻を抑制もしくは安定化する画期的な治療薬はまだ見つかっていない。

アンジオポエチン様因子 Angiopoietin-like protein (Angptl)は、血管新生因子アンジオポエチンと同様の構造的特徴を持つ分子として同定され (Oike Y *et al.*, *Trends Cardiovasc Med.* 2008)、現在までに他の研究グループからの報告も含め、Angptl1-8 の8種類が同定されている (Hato T *et al.*, *Trends Cardiovasc Med.* 2008, Zhang R *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2013)。Angptl はアンジオポエチンの特異的受容体である Tie2 やそのホモログである Tie1 に結合せず、その機能も血管新生のみならず、脂質代謝やエネルギー代謝など多様な作用が近年報告されている。この Angptl ファミリーの一つである Angptl2 は、過剰な機能により、組織において慢性炎症を誘導させ、肥満・代謝異常症の発症や進展に関係しており (Tabata M *et al.*, *Cell Metab.* 2009)、さらには、正常組織における Angptl2 の持続的高発現は、慢性炎症を誘導し、発がんの感受性を高めることが報告されている (Aoi J *et al.*, *Cancer Res.* 2011)。申請者は、大動脈中膜に集積するマクロファージにおける Angptl2 の高発現が、持続的な MMP9 の活性化や炎症といった組織修復機構の過剰応答状態を引き起こし、血管壁における組織リモデリングを促進することによって腹部大動脈瘤形成に関与していることを見出し (Tazume H *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012)、また、血管周囲脂肪組織より分泌された Angptl2 が、MMP2 分泌を促進することによって、血管内膜肥厚 (血管リモデリング) を促進させ、動脈硬化病態形成に関与していることを報告した (Tian Z *et al.*, *J Mol Cell*

Cardiol. 2013)。さらに、Angptl2 と動脈硬化病態形成の関連については、Angptl2 KO マウスは、野生型に比べ、血管内皮機能の明らかな改善を認めるが、逆に、血管内皮特異的 Angptl2 強制発現トランスジェニックマウス (Tie2-Angptl2 Tg) においては血管内皮機能低下を認め、Angptl2 が動脈硬化初期病態とされる内皮機能障害を引き起こすことを見出した。さらに動脈硬化モデルである Angptl2;ApoE ダブル欠損 (DKO) マウスを作製し、大動脈における動脈プラークを定量評価したところ、DKO マウスでは、ApoE KO マウスに比べ、動脈硬化プラークの減少を認め、逆に血管内皮細胞特異的 Angptl2 強制発現マウス (Tie2-Angptl2 Tg;ApoE KO) では、ApoE KO に比べ、動脈硬化プラークの明らかな増加を認め、血管内皮細胞由来 Angptl2 の動脈硬化病態形成への関与を報告した。 (Horio E *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014) 近年、Angptl2 は喫煙者の内胸動脈において発現が上昇することが知られており、タバコによる Angptl2 発現誘導の可能性が報告されている (Nada F *et al.*, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2008)。動脈硬化プラーク病態形成に関するニコチンと Angptl2 の関連については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本申請研究では、慢性炎症の鍵因子である Angptl2 が、動脈硬化進展に関わるという新規知見より (Horio E *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014)、Angptl2 のシグナルの観点から動脈硬化プラーク形成とその破綻を引き起こす病態のメカニズムに対して新規因子を同定し、その作用機構を解明することにより、虚血性心疾患の新規予防・治療法開発に向けた基盤研究を行う。

3. 研究の方法

本申請では動脈硬化プラークの病態形成における Angptl2 のシグナル分子やその作用機構の検討を行う為、ApoE KO マウス、Angptl2 ; ApoE double KO マウスおよび浸透圧ポンプ (osmotic pump) を用いて慢性的に薬物を注入し、動脈硬化の解析を行った。また、マウス初代培養血管内皮細胞を用いて解析を行った。

4. 研究成果

生体において nicotin 持続投与下での動脈硬化病態形成における Angptl2 の発現解析を行うため、ApoE KO マウス (16-20 週齢, ♂) 及び浸透圧ポンプを利用して vehicle 群と nicotin 群 (Low:1mg/kg/day, High:5mg/kg/day) で6週間投与を行い、検討した。nicotin 群 (High 及び Low) では Vehicle 群に比べ明らかな血圧上昇を認めなかったが、nicotin 群は、vehicle 群に比べ、明らかなプラーク部の増加を認め、かつ Angptl2、Mmp2、CD68、TNF α

mRNA レベルの明らかな発現上昇を認めた。さらに nicotin による動脈硬化プラーク形成の影響が Angptl2 を介するか確認のため、ApoE;Angptl2 欠損マウスを用いて同様の nicotin 投与を行い検討した。nicotin 群と vehicle 群については、プラーク形成について明らかな差異を認めなかった。

大動脈において Angptl2 の発現誘導の一つとして nicotin が示唆されたため、マウス血管内皮細胞初代培養を樹立し、in vitro において nicotin 添加による Angptl2 の発現解析を行ったところ、nicotin 添加において Angptl2 mRNA 発現レベルの明らかな上昇を認めた。この結果より、ニコチンは、血管内皮細胞に作用して Angptl2 発現を上昇させ、動脈硬化プラーク形成を促進させる可能性が示唆された。

また、アンジオテンシン II (AngII) 持続投与による動脈硬化プラーク部における Angptl2 発現について検討を行った。vehicle 群(150 mM NaCl, 1 mM acetic acid)と AngII 群(1.44mg/kg/day)で 4 週間投与し、大動脈より mRNA を抽出し定量 RT-PCR により発現解析を行ったところ、AngII 群では、vehicle 群に比べ、大動脈において明らかなプラークの増加を認め、Mmp2、CD68 mRNA 発現レベルの明らかな上昇を認めたが、Angptl2 mRNA 発現レベルについては有意な差を認めなかった。以上より、AngII によるプラーク形成については、Angptl2 の関与の可能性は低いと考えられる。Angptl2 conditional KO マウスを作製し、Tie2-Cre トランスジェニックマウスとの交配を行い、血管内皮特異的 Angptl2 欠損マウスの樹立を行った。

また、ヒト冠動脈サンプルを用いた免疫染色において ANGPTL2 はプラーク部の血管内皮細胞および CD68 陽性細胞での発現を認めた。今後症例数を増やして検討が必要と考えられた。

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 4 件)

1. Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, Ninomiya T, Horiguchi H, Endo M, Tabata M, Tazume H, Tian Z, Takahashi O, Terada K, Takeya M, Hao H, Hirose N, Minami T, Suda T, Kiyohara Y, Ogawa H, Kaikita K, Oike Y. Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Apr;34(4):790-800. doi:

10.1161/ATVBAHA.113.303116. (査読あり)

2. Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metab.* 2014 Apr 1;19(4):712-21. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.006. (査読あり)
3. Xu Y, Tian Z, Xie P. Targeting complement anaphylatoxin C5a receptor in hyperoxic lung injury in mice. *Mol Med Rep.* 2014 Oct;10(4):1786-92. <https://www.spandidos-publications.com/mr/10/4/1786> (査読あり)
4. Morinaga J, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Terada K, Tian Z, Sugizaki T, Tanigawa H, Zhao J, Zhu S, Sato M, Araki K, Iyama K, Tomita K, Mukoyama M, Tomita K, Kitamura K, and Oike Y. ANGPTL2 increases renal fibrosis by accelerating TGF- β signaling in chronic kidney disease. *Kidney Int., in press.* 2016 Feb;89(2):327-41. doi: 10.1016/j.kint.2015.12.021(査読あり)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田 哲 (TIAN, Zhe)
熊本大学・大学院生命科学研究部・研究員
研究者番号：80723890

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし