

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590342

研究課題名 (和文) 血管新生因子による血管病変増悪と修復に関する病態学的研究

研究課題名 (英文) Pathological examination about the effects of angiogenic factors on the exacerbation and the improvement of vascular lesions

研究代表者

中野 敏昭 (NAKANO TOSHIAKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10432931

研究成果の概要 (和文)：動脈硬化性疾患は現在でも予防が重要な疾患であり、特に虚血性心臓病患者や慢性腎臓病患者では進行した動脈硬化疾患が主な死因となる。動脈硬化性疾患の進行の機序について、血管新生因子の関与を中心に検討した。本研究において、ApoE 欠損マウスにおける検討で、VEGF-A および VEGF-C は動脈硬化病変を増悪させることを明らかにした。また、慢性腎臓病患者の冠状動脈硬化は進行しており、その機序には腎不全による慢性炎症の惹起が関与することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Atherosclerotic diseases are a significant public health problem to prevent. Atherosclerosis is associated with an increased risk of death, especially in coronary heart disease and chronic kidney disease (CKD). We investigated the mechanisms of atherosclerosis proceeded with the focus on angiogenic factors. We revealed that VEGF-A and VEGF-C progressed atherosclerotic lesions of ApoE-KO mice. We also revealed that CKD was associated with an increased risk of coronary heart disease caused by the acceleration of chronic inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：血管新生、動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病としての動脈硬化関連疾患である虚血性心疾患や脳血管障害は、現在なお増加の一途をたどり、日本人の主要な死亡原因である。その病態解明、治療、予防法の確立は、21 世紀においてきわめて重要な

課題である。近年、難治性血管病である下肢閉塞性動脈硬化症患者に対し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF2) を投与する血管新生療法が行われ、閉塞する血管を再生する治療が試みられている。一方、粥状動脈硬化や糖尿病性網膜

症、癌等の諸疾患においては、血管系の無秩序な発達により基礎疾患の病勢が促進されることが明らかになりつつある。

また、生活習慣病としての糖尿病性腎症による腎不全の増加により日本における透析患者は20万人以上となり、透析医療費は年間一兆円を超え増加の一途をたどっている。腎臓は毛細血管の集合体であり、血管を閉塞させない新しい治療戦略が急務とされる。近年、血管新生因子 VEGF の投与により、動物モデル糸球体腎炎の腎症を改善させ、腎不全の予防に成功した報告を認めるが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。

生体内における血管新生には「病的ならびに機能的血管新生プロセス」の両面があり、血管新生の病態学的意義を解明するためには疾患の病態生理に則した血管新生機構を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

(I) 動脈硬化の病態を炎症・修復機序、特に血管新生因子の時間的・空間的相互反応を介した「病的血管新生プロセス」としての視点から検討するために、Apo E 欠損マウスに対し、血管新生関連因子である VEGF-A、VEGF-C、VEGF-C 156S、PlGF を投与し動脈硬化発生、進展に与える影響を検討し、FACS 法による血中の骨髄由来血管内皮前駆細胞 (EPC) と単球/マクロファージの動員の解析を行い、動脈硬化の進展に与えるこれら血管新生関連因子の影響を病理病態学的に解明する。

(II) 腎不全患者の主な死亡原因は心血管病であることが近年明らかにされている。腎不全患者は動脈硬化の危険因子を多く持つだけでなく、尿毒症により慢性炎症が惹起され動脈硬化の進行および「病的血管新生プロセス」が促進している可能性がある。これらの視点から、慢性腎不全患者の剖検例を用いて、冠状動脈の動脈硬化の進行を検証し、病的血管新生の影響を評価する。

## 3. 研究の方法

(I) 動脈硬化モデルにおける VEGF family の動脈硬化進展に与える影響

ApoE 欠損マウスはヒトの動脈硬化と類似の自然発生粥状動脈硬化動物モデルとして

有名であり、コレステロール負荷食により高度の動脈硬化巣を来することが知られている。このマウスにおいて以下の実験を行った。

1. 組み換えヒト蛋白 VEGF-A (VEGF 受容体 1, 2 と結合)、VEGF-C (受容体 2, 3 と結合)、PlGF (VEGF 受容体 1 のみに結合)、VEGF-C 156S (受容体 3 のみに結合) を  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  連日 3 週間腹腔内投与することにより、マウス大動脈における動脈硬化の進行を病理組織学的に評価した。
2. 動脈硬化巣は慢性炎症性疾患であり、肥厚内膜への単球/マクロファージ、平滑筋細胞の動員が認められ、進行すると内膜に血管新生も認められるようになる。VEGF の作用によりこれらの現象が促進するか検証するために、単球/マクロファージ、平滑筋細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞を免疫組織化学的手法にて検索・同定し、VEGF family の動脈硬化進展における病理病態学的意義を検討した。
3. 近年、骨髄由来の内皮前駆細胞が動脈硬化巣に動員され、動脈硬化の進行に寄与すると報告されている (Nat Med 2001)。VEGF は、内皮前駆細胞や単球/マクロファージを動員する作用があると報告されており (EMBO J 1999, Circulation 2002)、VEGFs を投与した際に、骨髄中・血中の内皮前駆細胞および VEGF 受容体 1 陽性単球、VEGF 受容体 3 陽性単球が増加するかフローサイトメトリーを用い測定した。

(II) 慢性腎臓病と冠状動脈進展、病的血管新生の影響

慢性腎臓病と動脈硬化の進行との関係を明らかにするために、剖検例の冠状動脈を採取し病理組織学的に観察を行った。久山町住民の連続剖検症例のうち、死亡 3 年以内に検診を受けた 482 名から対象例を 126 例無作為に選出する。対象例を推定糸球体濾過値 (eGFR,  $\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ ) により、60 以上、45-59、30-44、30 未満の 4 群に分類した。各症例の冠状動脈主幹部 3 カ所を採取した。動脈硬化病変に対し酸化 LDL、単球/マクロファージの免疫染色を行い、冠動脈内新生血管は冠動脈内膜内の CD34 陽性血管数で評価した。

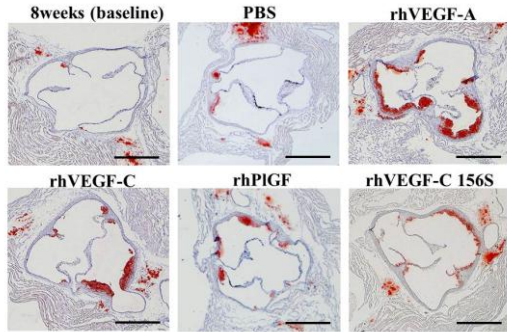
## 4. 研究成果

(I) 動脈硬化モデルにおける VEGF family

### の動脈硬化進展に与える影響

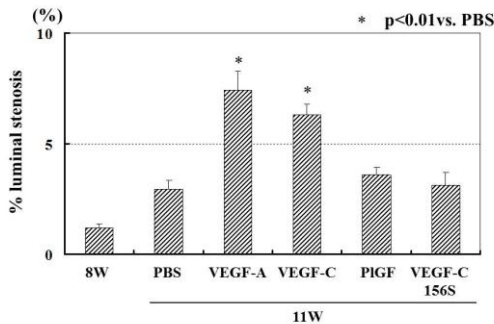
ApoE 欠損マウスに対して、組み換えヒト蛋白 VEGF-A)、VEGF-C、PlGF、VEGF-C 156S、を  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  連日 3 週間腹腔内投与することにより、大動脈起始部における粥状硬化病変の進行 (スタン IV 染色) を認めた。

ApoE欠損マウスの大動脈起始部における動脈硬化の病変 (スタンIV染色)



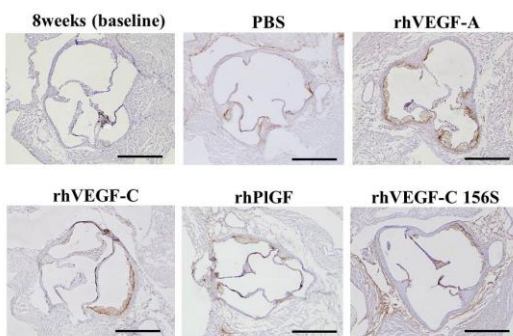
大動脈起始部における内腔狭窄率を計測したところ、VEGF-A 群および VEGF-C 群においてコントロール群 (PBS) と比べて有意な内腔狭窄率の上昇を認めた ( $p < 0.01$ )。

大動脈における内腔狭窄率(%)

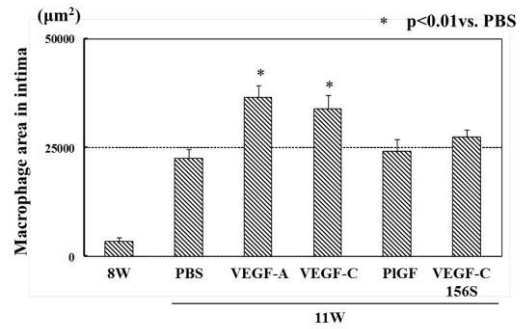


動脈硬化病変において単球/マクロファージに関して免疫染色 (F4/80) を行ったところ、VEGF-A 群および VEGF-C 群において有意に単球/マクロファージの浸潤の増加を認めた ( $p < 0.01$ )。

大動脈起始部における単球/マクロファージの浸潤

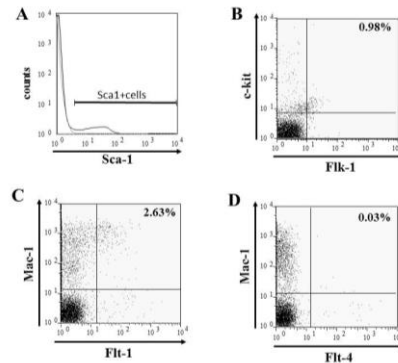


大動脈における単球/マクロファージの浸潤



また、VEGF-A および VEGF-C による動脈硬化病変の進行には、組織学的に内膜内での血管新生およびリンパ管新生は認められなかった。

続いて、骨髄由来の内皮前駆細胞や単球/マクロファージの動員を検討するために、血中の内皮前駆細胞および VEGF 受容体 1 陽性単球、VEGF 受容体 3 陽性単球の数をフローサイトメトリー (FACS) を用い測定した。



末梢血中の内皮前駆細胞 (EPC) は、VEGF-A および VEGF-C 投与により明らかな増加を認めなかった。VEGF 受容体 1 陽性単球、VEGF 受容体 3 陽性単球に関しては、VEGF-A および VEGF-C の投与にて一部増加を認めたが、単球全体の増加には有意差を認めなかった。

末梢血における内皮前駆細胞(EPC)と単球数(FACSによる解析)

	EPC	Flt-1+monocytes	Flt-4+monocytes	total monocytes
PBS	0.022±0.009	1.13±0.16	0.018±0.004	6.38±1.29
VEGF-A	0.026±0.007	1.72±0.50*	0.047±0.029*	7.47±1.14
VEGF-C	0.023±0.011	1.09±0.72	0.112±0.039*	6.58±1.80
PlGF	0.022±0.006	1.65±0.35	0.025±0.021	7.29±1.53
VEGF-C156S	0.021±0.004	1.03±0.17	0.167±0.096*	6.62±1.44

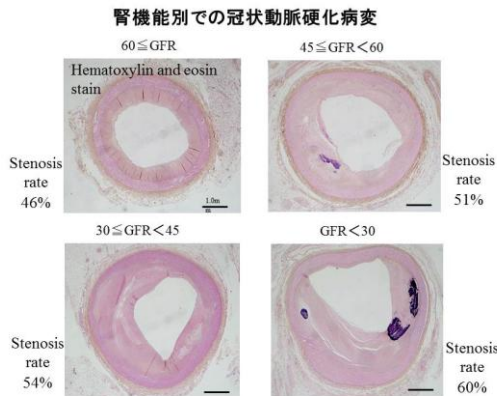
\* $p < 0.05$  vs PBS groups. n= 3 to 6.

これらのことから、VEGF-A および VEGF-C による粥状硬化進行の機序には、血中からの

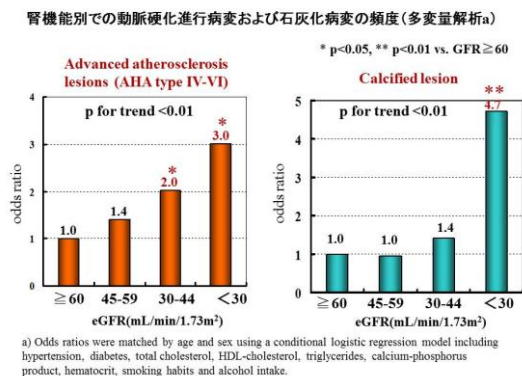
EPC や単球の動員を介さずに、直接的に動脈硬化巣に対して影響を与えることが推定された。

## (II) 慢性腎臓病と冠状動脈進展、病的血管新生の影響

375 標本の冠動静脈について、糸球体濾過値 (GFR) 別に 4 群に分けて検討した。GFR が低下するに従って、冠動静脈の内腔狭窄率は有意に上昇した ( $p < 0.01$ )。



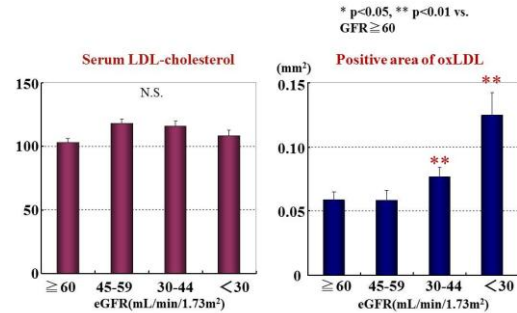
動脈硬化進行病変の頻度、石灰化の頻度は GFR の低下に伴い増加した。年齢、性、高血圧、糖尿病、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、Ca、Pi 積、貧血、喫煙歴、飲酒歴について多変量調整後も、GFR の低下に伴い動脈硬化進行病変の頻度、石灰化の頻度は増加した ( $p < 0.01$ )。



脂質の影響に関しては、腎機能低下に伴って、血清 LDL コレステロール値は明らかな増

加を認めなかった。これに対して、血管内膜内の酸化 LDL 陽性面積は、GFR の低下とともに有意に増加した ( $p < 0.01$ )。また、マクロファージ陽性面積に関しても、GFR の低下に伴いマクロファージの浸潤面積の増加を認めた ( $p < 0.01$ )。

腎機能別での血清LDLコレステロール値および酸化LDL陽性面積の違い



また、冠状動脈内膜内の新生血管数を測定したところ、eGFR 60 以上、45-59、30-44、30 未満の各群における新生血管数の平均は、それぞれ 10.7、11.8、18.7、23.5 であり腎機能低下により有意に増加した ( $p < 0.01$ )。

これらのことから、慢性腎臓病患者の動脈硬化病変には、酸化 LDL の沈着、慢性炎症の促進が認められるため、動脈硬化病変は進行しやすい環境にあり、病的血管新生によるプラーク破裂の危険も高くなることが示唆された。

## 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 1 件)

Nakano T, Ninomiya T, Sumiyoshi S, Fujii H, Doi Y, Hirakata H, Tsuruya K, Iida M, Kiyohara Y, Sueishi K.

Association of kidney function with coronary atherosclerosis and calcification in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama study. *Am J Kidney Dis.* 55(1):21-30, 2010

[学会発表] (計 2 件)

- ① 中野敏昭、二宮利治、鶴屋和彦、清原裕、飯田三雄

「冠狀動脈硬化病変における腎機能と酸化LDL、慢性炎症との関係」

第53回日本腎臓学会学術総会、2010年6月16日

- ② Nakano T, Ninomiya T, Tsuruya K, Iida M, Kiyohara Y, Sueishi K.

Association of kidney function with coronary atherosclerosis and calcification in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama study. International Society of Nephrology, Nexus, April 15-18, 2010

〔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〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中野敏昭 (NAKANO TOSHIAKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10432931

### (2) 研究分担者

居石克夫 (SUEISHI KATSUO) [2008年度のみ]

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70108710

鶴屋和彦 (TSURUYA KAZUHIKO)

九州大学・医学研究院・客員教授

研究者番号：203722740

升谷耕介 (MASUTANI KOSUKE) [2008-2009年度]

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30419593

谷口正智 (TANIGUCHI MASATOMO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60419562