

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590880

研究課題名（和文） 動脈硬化病変形成における細胞性免疫の関与とその制御による新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new treatment for atherosclerosis by regulating cell-mediated immunity

研究代表者

磯部 光章 (ISOBE MITSUAKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80176263

研究成果の概要（和文）：主としてマウス心臓移植および大腿動脈ワイヤー障害のモデルを用いて、動脈硬化病変における細胞性免疫の関与とその制御による治療法の開発を行った。多様な介入治療を行った。MMP-9、ICAM-1、adiponectin に着目して、その役割を検討した。クラリスロマイシンによる MMP-9 の抑制、siRNA による ICAM の抑制、adiponectin 過剰マウスにおいて、動脈病変の抑制が可能であったことから、それぞれが動脈病変に関与していることが示された。また治療法としての発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of cell-mediated immunity on the mechanism of arteriosclerosis using mouse models of cardiac allograft transplantation and wire-induced injury of the femoral artery. We paid attention to MMP-9, ICAM-1, and adiponectin as mediators or suppressors of arteriosclerosis in these models. Clarithromycin which suppresses MMP-9 activity and siRNA ICAM-1 were effective in suppressing arterial lesions and adiponectin over expression mouse showed lesser extent of chronic allograft rejection. These results indicate the role of immunity and inflammation on the arteriosclerosis and these new agents may be useful as new targets for prevention of clinical diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化、心臓移植、冠動脈再狭窄、細胞性免疫、トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

心臓移植後の冠動脈硬化やインターベンション治療後の再狭窄は臨床的な課題である。移植においては長期死亡の最大の原因で

ある。これら冠動脈病変の成り立ちと粥腫の不安定化には脂肪蓄積と共に T 細胞の浸潤、血管平滑筋の増殖がみられる。その過程で T 細胞活性化に緒を発する炎症反応が重要な

役割を果たす。

## 2. 研究の目的

冠動脈再狭窄、移植後冠動脈硬化を広いスペクトラムの冠動脈リモデリングの中で捉え、免疫、分子生物学の基盤の元に病態の解明と治療法の開発をすることが最終目的である。

## 3. 研究の方法と成果

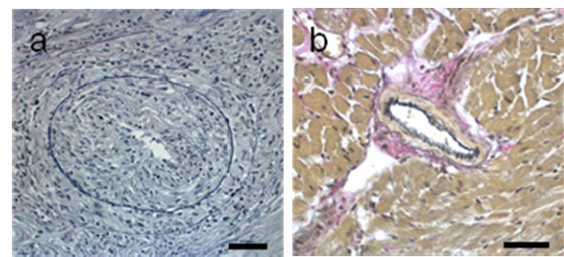
(1) 心臓移植後、移植心では血管内に平滑筋と細胞外マトリックスを中心とする細胞で構成された新生内膜が形成され血管が狭窄する。マクロライド系の抗生物質であるクラリスロマイシン (CAM) の MMP-9 の発現を制御作用に着目して、急性拒絶反応および移植心血管内膜肥厚に対する効果を検討した。

ドナーマウス BALB/c とレシピエントマウス C57BL/6 の組み合わせ (MHC total allomismatch) は急性拒絶、C57BL/6 Bm12 と C57BL/6 との組み合わせ (MHC class II mismatch) は慢性拒絶の検討に用いた。異所性心移植を行い、レシピエントマウスには CAM (100mg/kg) を 1 日 2 回、連日経口投与した。その結果、急性拒絶モデルにおいて CAM 投与群では移植心の有意な生着の延長が見られた。CAM 投与群では 7 日目の細胞浸潤、線維化面積は有意に減少していた。また慢性移植もでるにおいて血管狭窄の有意な減少が見られた。いずれのモデルでも CAM による拒絶反応の軽減は炎症性サイトカインの mRNA の発現減少、MMP-9 の発現抑制をともなっていた。J774.1 細胞を IL-1 $\beta$  で刺激すると vehicle 群では無刺激群と比べて MMP-9 の強い発現が見られたが CAM の投与によって MMP-9 のタンパク、mRNA レベルは減少していた。培養平滑筋細胞においても CAM 投与により MMP-9 発現が減少した。平滑筋細胞に PDGF-BB 刺激を行うと細胞の顕著な増殖が見

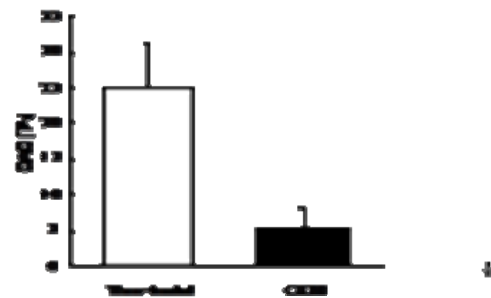
られるが、CAM を添加すると細胞の増殖は抑制され、細胞遊走評価分析でも CAM の投与により細胞の遊走が抑制された。

これらの結果は慢性拒絶で起こる移植片血管病変の進展を CAM が抑制する事、その効果は MMP-9 の発現制御に関係していることを示すものである。CAM は急性拒絶も同様に抑制する。

以上より、CAM は MMP-9 の活性を阻害する事により急性及び慢性拒絶を抑制する。クラリスロマイシンは免疫抑制作用を持たず、また一般臨床に安全に用いられている薬剤である。そのため移植後患者への適用が期待出来る。



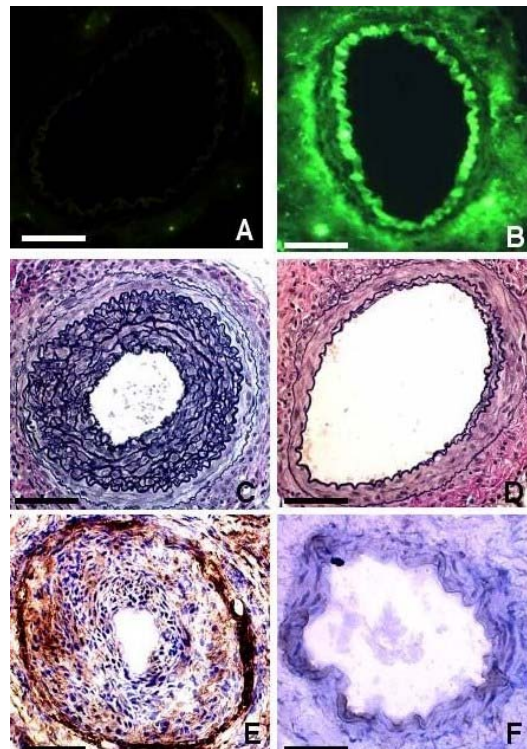
## C



a : 無治療コントロールの移植心冠動脈、b : クラリスロマイシンで治療したレシピエントの移植心冠動脈。内膜肥厚が著明に抑制されている。C : 肥厚内膜の定量的評価。クラリスロマイシン投与群で内膜肥厚は有意に抑制されている。

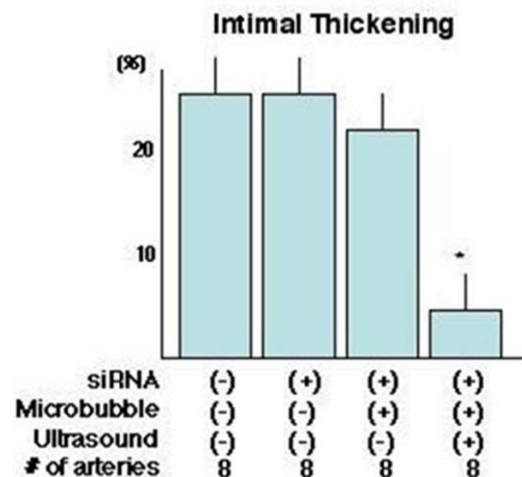
(2) ICAM-1 の mRNA 発現を抑制する siRNA を作成した。ICAM-1 siRNA の生物学的活性を確認するために混合リンパ球培養 (MLR) を行った。ICAM-1 siRNA は導入濃度依存性に MRL での細胞増殖を抑制した。動物実験モデルは B6 マウス大腿動脈のワイヤー障害による血管障害である。まず FITC-siRNA と GFP-siRNA を作成した。遺伝子の導入には超音波マイクロバブルを用いた。DOTAP とマイクロバブル

(Optison) に siRNA (ICAM-1 または GFP) を混和した。血管ワイヤー障害作成直後に、この混和物を血管内に注入した。さらに血管外から超音波を放射した (1 MHz、0.5 W/cm<sup>2</sup>、20 秒)。FITC-siRNA を注入したマウスは 8 時間後に、GFP-siRNA を注入したマウスは 7 日後に血管を採取した。いずれも siRNA、マイクロバブル、超音波の存在下で血管壁に色素の顕著な集積を認め、遺伝子が導入されていることが証明された。いずれかの要素が含まれていないコントロールでの色素の発現は認められなかった。このことから、超音波とマイクロバブルを用いた非ウイルスでの血管壁への遺伝子導入が可能であることが示された。同じ方法を用いて siRNA ICAM-1 を血管障害後の大腿動脈に導入した。28 日目に血管を採取してその効果を確認したところ、コントロール群に比して内膜肥厚が有意に抑制されていた。免疫組織学的には T 細胞、マクロファージ、ICAM-1 陽性細胞、VCAM-1 陽性細胞などの炎症細胞の浸潤が siRNA ICAM-1 導入群の障害血管で抑制されていた。以上の結果からウイルスを用いない接着分子阻害の遺伝子導入により血管障害後の内膜肥厚を抑制することが示された。他臓器、他疾患の炎症抑制にも応用可能な技術として今後の発展が期待される。



マウス大腿動脈の病理所見

A: 超音波なし。B: 超音波とマイクロバブル。GFP が血管に取り込まれている。C: ワイヤ障害後コントロール siRNA で治療。内膜増殖が顕著である。D: ICAM-1 siRNA で治療した血管。内膜肥厚が著明に抑制。E: コントロール siRNA で治療した血管での ICAM-1 発現。バルーン障害で肥厚した内膜に顕著な発現が見られる。F: ICAM-1 siRNA で治療した血管では ICAM-1 の発現が抑制されている。



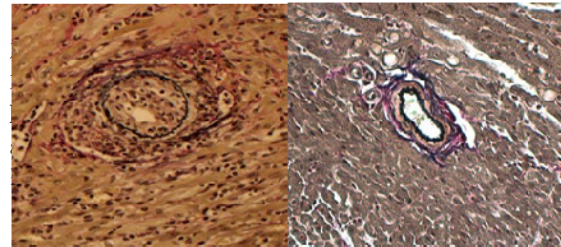
肥厚内膜の定量的評価。siRNA を超音波とマ

イクロバブルで導入した血管で内膜肥厚が有意に抑制されている。

(3) アディポネクチンは脂肪組織から特異的に分泌されるタンパクであり、抗炎症作用、および抗動脈硬化作用を持つことが知られている。今年度は我々はアディポネクチンの心移植モデルにおける役割を検討した。方法：アディポネクチントランスジェニックマウス (APN-SE) を用い、急性及び慢性拒絶反応についての検討を行った。慢性拒絶に関しては class II mismatch の組み合わせ (ドナー: B6. C-H-2<sup>bm12</sup>KhEg、レシピエント: APN-SE) で移植を行い、8 週間後にサクリファイスを行って検討した。

結果：まず、APN レセプター (APN R1, R2) についての検討を行ったところ、心筋の定量 PCR 及び免疫染色で APN-SE をレシピエントとした群で APNR1, R2 共に mRNA の発現、レセプター数が増加していることが示された。移植心の内膜肥厚に関して検討したところ、APN-SE をレシピエントとした群 (luminal occlusion,  $8.88 \pm 2.21$  %) では、wild type を道いた群 ( $49.37 \pm 10.50$  %) と比較して有意に血管内膜の増殖を抑制できた。次に、定量 PCR を用いてサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量を検討した。interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin 2 (IL-2)、IL-6、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) に関しては APN-SE を用いた群で mRNA の発現が有意に抑制された。MCP-1、IFN $\gamma$  に関しは、ウエスタンブロットでタンパク量を検討し、同様の結果が得られた。また、平滑筋細胞増殖アッセイを行ったところ、APN によって平滑筋細胞の増殖を抑制できることが確認され、さらに、その効果は Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) インヒ

ビターにより抑制されることがわかった。結論：アディポネクチンは炎症性のサイトカインを抑制すること、および、アディポネクチンレセプターの発現を増加させることによって、心移植の慢性拒絶の抑制に大きな役割を果たしていると考えられる。また、その経路として、AMPK を介した経路が大きく関わっていると考えられる。



#### 4. 主な発表論文等

1. Ogawa M, Suzuki J, Isobe M: Clarithromycin Attenuates Acute and Chronic Rejection via MMP Suppression in Murine Cardiac Transplantation. **J Am Coll Cardiol**, 51:1977-1985, 2008 (May)
2. Saiki H, Suzuki J, Kosuge H, Haraguchi G, Ishihara T, Haga T, Maejima Y, Isobe M, Uede T: Blockade of the 4-1BB pathway attenuates graft arterial disease in cardiac allografts. **Int Heart J** 49: 105-118, 2008
3. Egashira K, Suzuki J, Ito H, Aoki M, Isobe M, Morishita R: Long-term follow up of initial clinical cases with NF- $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotide transfecton at the site of coronary stenting. **J Gene Med** 10: 805-809, 2008 (Apr) .
4. Suzuki J, Ogawa M, Muto S, Yamaguchi Y, Itai A, Isobe M: The effects of pharmacological PAI-1 inhibition on thrombus formation and neointima formation after arterial injury. **Expert Opin Ther Targets** 12: 783-794, 2008
5. Karube A, Suzuki J, Haraguchi G,

- Maejima Y, Saiki H, Kosuge H, Isobe M, Uede T: Suppression of neointimal hyperplasia after vascular injury by blocking 4-1BB/4-1BB ligand pathway. **J Med Dent Sci** 55: 207-213, 2008
6. Ogawa M, Suzuki J, Takayama K, Isobe M. Matrix metalloproteinase suppression induced by clarithromycin in murine cardiac allografts. **Transplant Proc.** 41:395-397, 2009.
  7. Suzuki J, Tezuka D, Morishita R, Isobe M: An initial case of suppressed restenosis with nuclear factor-kappa B decoy transfection after percutaneous coronary intervention. **J Gene Med** 11: 89-91, 2009(Jan)
  8. Ogawa M, Suzuki J, Isobe M: The Mechanism of Anti-Inflammatory Effects of Prostaglandin E2 Receptor 4 Activation in Murine Cardiac Transplantation. **Transplantation** 87: 1645-1653, 2009 (Jun)
  9. Ogawa M, Suzuki J, Hirata Y, Nagai R, Isobe M. A critical role of COX-2 in the progression of neointimal formation after wire injury in mice. **Expert Opin Ther Targets.** 13: 505-511, 2009 (May)
  10. Suzuki J, Ogawa M, Takayama K, Taniyama Y, Morishita R, Hirata Y, Nagai R, Isobe M: Ultrasound-Microbubble Mediated ICAM-1 siRNA Transfection Attenuates Neointimal Formation after Arterial Injury in Mice. **J Am Coll Cardiol**, 55:904-913, 2010
  11. Isobe K, Kuba K, Maejima Y, Suzuki J, Kubota S, Isobe M: Inhibition of endostatin deteriorates left ventricular remodeling and heart failure through matrix proteinases and angiotensin converting enzyme in rat myocardial infarction. **Circ J** 74(1): 109-119, 2010
  12. Kosuge H, Ishihara T, Haraguchi G, Maejima Y, Okada H, Saiki H, Suzuki H, Isobe M: Treatment with telmisartan attenuates graft arteriosclerosis in murine cardiac allografts. **J Heart Lung Transplant** 29(Jan): 562-567, 2010
  13. Neely GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Elmén L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia C-p, Keene AC, Alayari NN, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Kogelgruber R, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Knoblich JA, Pfeufer A, Hicks AA, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Bodmer R, Penninger JM: A global *in vivo Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. **Cell** 41: 1-12, 2010 (April)
  14. Ogawa M, Suzuki J, Yamaguchi Y, Muto S, Itai A, Hirata Y, Isobe M, Nagai R. The effects of pharmacological plasminogen activator inhibitor-1 inhibition in acute and chronic rejection in murine cardiac allografts. **Transplantation.** 91(1): 21-26, 2011
  15. Konishi M, Haraguchi G, Ishihara T, Ohgashi H, Saito K, Nakano Y, Isobe M: Adiponectin protects doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK upregulation in mice. **Cardiovasc Res**, in press
  16. Aoyama N, Suzuki J, Wang D, Ogawa M, Kobayashi N, Hanatani T, Takeuchi Y, Izumi Y, Isobe M: Porphyromonas gingivalis Promotes Murine Abdominal Aortic Aneurysms via Matrix Metalloproteinase-2 Induction. **J Period Res**, in press
  17. Ishihara T, Haraguchi G, Konishi M, Ohigashi H, Saito K, Nakano Y, Isobe M: The effect of adiponectin on the cardiac allograft vasculopathy. **Circ J** in press
- 〔雑誌論文〕 (計 17 件)
- 〔学会発表〕 (計約 20 件)
- 〔図書〕 (計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
5. 研究組織
- (1) 研究代表者  
磯部光章 (ISOBE MITSUAKI)
- 研究者番号 : 80176263
- (2) 研究分担者

鈴木淳一 (SUZUKI JUNIICHI)

研究者番号 : 90313858

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :