

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293236

研究課題名(和文)小児期から進行する動脈硬化性リモデリングの分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular Mechanisms of atherosclerotic remodeling in childhood

研究代表者

横山 詩子(YOKOYAMA, Utako)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：70404994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児期における動脈硬化の前病変の進行の実態とその分子機序の解明は十分とは言えない。本研究では小児期から進行する動脈硬化性リモデリングの分子機構をPGE2-EP4シグナルに焦点を当てて解明することを目的とした。ヒト冠動脈平滑筋細胞では、プロスタグランジンE受容体のうちEP4が主要なサブタイプであった。内膜肥厚形成は0歳から71歳の10名全ての患者で観察されEP4の発現が認められた。生後32週齢のApoE^{-/-}EP4^{+/+}およびApoE^{-/-}EP4^{+/-}マウスの大動脈の解析から、EP4欠損によりプラーク形成は減少していた。これらより、EP4は動脈硬化の進展に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The process of progression of atherosclerosis during childhood and its molecular mechanisms are not fully understood. We aimed to examine the developmental changes of atherosclerosis using vascular tissue samples ranging in age from 0 to 71 years old. In human coronary arterial smooth muscle cells, prostaglandin E receptor EP4 was highly expressed among EP receptors. Physiological intimal thickening was observed from newborn infants. We analyzed ApoE^{-/-}EP4^{+/+} and ApoE^{-/-}EP4^{+/-} mice and found that EP4 deficiency inhibited atherosclerotic plaque formation. These data suggested that EP4 contributes to progression of atherosclerotic remodeling from childhood.

研究分野：小児循環器

キーワード：動脈硬化 小児 内膜肥厚 リモデリング 冠動脈

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化が成人に特有の疾患ではないことが近年明らかになりつつある。Barker らによって、低出生体重児は動脈硬化などの心血管疾患のリスクが高く、母体の環境の違いが成人期の心血管病変を引き起こす、という説が提唱され(Barker's hypothesis, Lancet, 1989) その後それを支持する報告がなされてきている(Leduc et al., Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2010, 他)。また川崎病罹患後は動脈硬化のリスクが増加することが報告されている(Fukazawa, Curr Opin Pediatr, 2010, 他)。これらの結果は、成人期に動脈硬化を発症する環境が、胎児期 小児期から血管で既に作られていることを示唆している。つまり動脈硬化は成人期に突然発症するのではなく、胎児期 小児期から連続して進行している可能性が極めて高い。

成人期の動脈硬化の病態メカニズムに関しては膨大な研究がなされており、また血管の初期発生に関する研究も盛んである。しかしながら、その間をつなぐ小児期における動脈硬化の前段階病変の実態とその分子機構に関しては、国内外で現在報告がなされておらず、未開拓分野と言える。

動脈硬化に対しライフスタイルの改善、血清脂質低下薬剤の導入が一定の効果をあげたものの、動脈硬化性疾患は依然として先進諸国では主たる死因である。一生を通して動脈硬化を発症しない小児医療の確立は、生涯医療として非常に重要である。

研究代表者らは先行研究で、0 歳から 71 歳までの 10 例の心疾患以外で亡くなった患者の冠動脈(北海道大学 西原より提供)を検討したところ、すでに 0 歳児から動脈硬化の前病変である内膜肥厚が存在し、年齢とともに内弾性板の断裂を伴う内膜肥厚が全周性となりその厚みも増加することを見出した。また、内膜肥厚部位には炎症細胞(CD68 陽性)の浸潤がなく冠動脈は病的変

化の前段階にあること、全年齢を通して冠動脈にはプロスタグランジン E2 受容体の中でも特に EP4 が高発現することを見出した。

これらの結果より、小児期から冠動脈には動脈硬化の前病変が既に存在し、成人期での動脈硬化発症に向けて PGE2-EP4 シグナルが関与しているのではないかと着想した。

2. 研究の目的

動脈硬化は川崎病罹患後や低出生体重児でその発症リスクが高いとされ、動脈硬化が成人特有の問題ではないことが明らかになってきたが、小児期における動脈硬化の前病変の進行の実態とその分子機序の解明はいまだ未開拓分野である。本研究では小児期から進行する動脈硬化性リモデリングの分子機構を PGE2-EP4 シグナルに焦点を当てて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト冠動脈平滑筋細胞での EP4 発現の検討

ヒト冠動脈平滑筋細胞とヒト大動脈平滑筋細胞(Lonza)より RNA を抽出し、定量 PCR にて EP4 発現を検討した。

(2) ヒト冠動脈組織でのタンパク発現検討

ヒト冠動脈、腸骨動脈の組織切片(北海道大学より)を作製し、Elastica-Masson 染色免疫染色(抗 EP4、COX-2、Biglycan、CD68、などの抗体を使用)を行った。

(3) EP4 刺激による遺伝子・蛋白発現変動の検討

EP4 を高発現するラット動脈管平滑筋細胞を EP4 アゴニストである ONO-AE1-329 で 24 時間刺激し、マイクロアレイに供した。また、同刺激を 48 時間行い質量分析を行った。

(4) ApoE・EP4 ダブル欠損マウスにおける動脈硬化進展の検討

生後 20 週齢、26 週齢、32 週齢の、ApoE -/-マウスまたは ApoE -/-EP4+/- マウスから大

動脈を摘出し、10%ホルマリンで一晩固定をしたのち、オイル赤O染色による脂質染色を行った。オイル赤O陽性部分を動脈硬化プラークとして、BZ-解析アプリケーションを用いて定量した。大動脈全体の面積とプラーク部分の面積を定量し、大動脈の面積に対するプラークの面積の割合を算出する方法で行った。

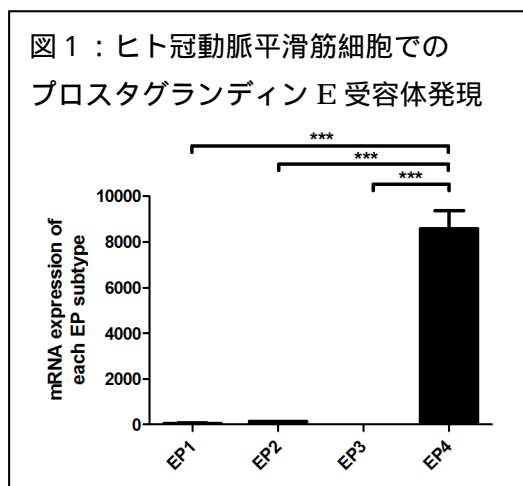
(5) 血管炎症惹起による動脈硬化病変形成の検討

20週齢の ApoE^{-/-} EP4^{+/+}および ApoE^{-/-} EP4^{+/-}マウスに、1週間に一回、5週間もしくは10週間 LPS を腹腔内投与し、大動脈弁における内膜肥厚部の脂質沈着を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト冠動脈平滑筋細胞での EP4 発現の検討

ヒト冠動脈平滑筋細胞では、プロスタグランジン E 受容体である EP1, EP2, EP3, EP4 のうち、EP4 mRNA の発現が圧倒的に多く、EP4 が主要なサブタイプであった(図1)。また、EP4 はヒト大動脈平滑筋細胞と比べて、ヒト冠動脈平滑筋細胞で発現が多かった。

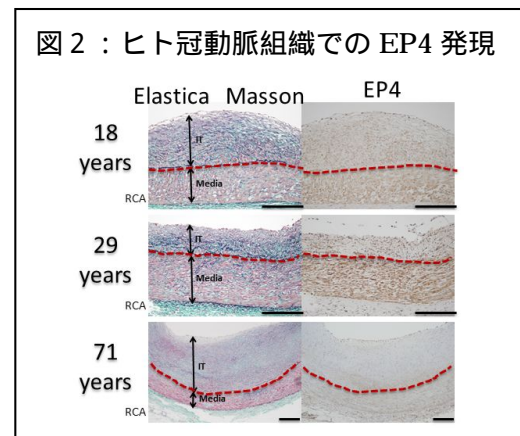


(2) ヒト冠動脈組織でのタンパク発現検討

内膜肥厚形成は生後3.5時間から71歳の全ての患者で観察された。生後2日のサンプルまでは内膜肥厚は局所的に見られたが、8歳以降は内腔全周性に拡大し、その後は部分

的に厚みを増していた。

EP4 発現は、全年齢において、内膜肥厚部だけでなく、内膜肥厚がまだ起こっていない正常部位でも発現が認められた(図2)。



EP4 の発現は、マクロファージが浸潤する前から認められた。冠動脈が直接死因に関係していない例(18、29、71歳)では、内膜肥厚が存在し EP4 が発現しているも、マクロファージマーカーである CD68 の発現はなかった。

(3) EP4 刺激による遺伝子・蛋白発現変動の検討

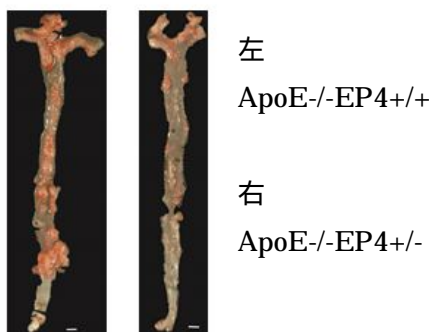
動脈管平滑筋細胞を EP4 で刺激し、マイクロアレイで発現遺伝子を検討したところ、Fibulin1 の発現が28倍に増加していた。また、質量分析では、Biglycan の分泌が20倍に増加していた。

(4) ApoE・EP4 ダブル欠損マウスにおける動脈硬化進展の検討

生後32週齢のマウスのメスの ApoE^{-/-} EP4^{+/+}および ApoE^{-/-} EP4^{+/-}マウスから大動脈を採取し、オイル赤O染色法により脂質を含む動脈硬化プラークの定量を行ったところ、EP4 欠損したマウスでは動脈弓および大動脈全体における、脂質を含むプラーク形成は減少していた(図3)。

血清脂質の検査結果では、EP4 の発現の有無に関わらず、血液中のコレステロール、中性脂肪、トリグリセリドなど、脂質量に有意差はなかった。

図3:EP4欠損による動脈硬化の検討



ApoE^{-/-}EP4^{+/-}マウスでは、弾性線維の断裂は抑制され、内膜肥厚の形成が抑えられていた。また、内膜肥厚における脂質の沈着も抑制されていた。Biglycanの発現はEP4の発現の有無によらず内膜肥厚の深部に見られたが、fibulin-1の発現はEP4欠損マウスの組織切片では抑制されていた

(5) 血管炎症惹起による動脈硬化病変形成の検討

20週齢のApoE^{-/-}EP4^{+/+}およびApoE^{-/-}EP4^{+/-}マウスに、1週間に一回、10週間LPSを腹腔内投与したところ、ApoE^{-/-}EP4^{+/+}マウスでは血管炎症惹起による脂質沈着を伴う内膜肥厚の形成が確認されたが、EP4を欠損したマウスでは、血管炎症惹起による、脂質の沈着を伴う内膜肥厚の形成は抑制されていた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計27件)

Fujita S*, Yokoyama U*, Ishiwata R, Aoki R, Nagao K, Masukawa D, Umemura M, Fujita T, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki K, Ito S, Goshima Y, Asou T, Masuda M, Ishikawa Y. Glutamate promotes contraction of the rat ductus arteriosus. *Circ J*. 査読有, 80, 2016, 2388-2396, *equal contribution
Kato Y, Yokoyama U, Yanai C, Ishige R, Kurotaki D, Umemura M, Fujita T, Kubota T, Okumura S, Sata M, Tamura T, Ishikawa Y. Epac1 deficiency attenuated vascular smooth muscle cell migration and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc*

Biol. 査読有, 35, 2015, 2617-25.

DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306534.

Yokoyama U. Prostaglandin E-mediated molecular mechanisms driving remodeling of the ductus arteriosus. *Pediatr Int*. 査読有, 57, 2015, 820-7. DOI: 10.1111/ped.12769

Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Taguri M, Kumagaya S, Ishiwata R, Yanai C, Fujita S, Umemura M, Fujita T, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Asou T, Masuda M, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki K, Yokota S, Ishikawa Y. Decreased serum osmolality promotes ductus arteriosus constriction. *Cardiovasc Res*. 査読有, 104, 2014, 326-36.

DOI: 10.1093/cvr/cvu199

Ishiwata R, Yokoyama U, Matsusaki M, Asano Y, Kadowaki K, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Shimoda H, Akashi M, and Ishikawa Y. Three-Dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells as a New Experimental Model for Vascular Elastic Fiber Formation Studies. *Atherosclerosis*, 査読有, 233, 2014, 590-600.

DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.

Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation*, 査読有, 129, 2014, 487-96.

DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004726.

Lu D*, Aroonsakool N*, Yokoyama U*, Patel HH, Insel PA. Increase in cellular cyclic AMP concentrations reverses the pro-fibrogenic phenotype of cardiac myofibroblasts: a novel therapeutic approach for cardiac fibrosis. *Mol Pharmacol*. 査読有 84, 2013, 787-93 *equally contribution DOI: 10.1124/mol.113.087742.

Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T, Ishikawa Y. The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev*. 査読有 65, 2013, 1010-52,

DOI: 10.1124/pr.112.007195.

Liu NM, Yokota T, Maekawa S, Lü P, Tei I, Taniguchi H, Yokoyama U, Kato T, Minamisawa S. Transcription profiles of endothelial cells in the rat ductus arteriosus during a perinatal period. *PLoS ONE* 査読有, 27, 2013, e73685, DOI: 10.1371/journal.pone.0073685.

[学会発表](計57件)

Jin MH, Yokoyama U, Ishiwata R, Minamisawa S, Ishikawa Y. Oxygenation-induced postnatal remodeling of the ductus arteriosus. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2016.3.30, 浜松アクロシティコンgresセンター 静岡県浜松市)

Yokoyama U. 血管平滑筋と細胞外基質制御における新たなホスホリパーゼCとサイクリックAMPの役割 The roles of phospholipase C and cyclic AMP in regulation of extracellular matrix in vascular smooth muscle cells. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2016.3.22, 札幌コンベンションセンター 北海道・札幌市)

Yokoyama U, Ishiwata R, Ichikawa Y, Yasuda S, Goda M, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Inhibition of PGE₂-EP4 Signaling as a Potential Future Therapeutic Strategy for Abdominal Aortic Aneurysm. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2016.3.18-20, 仙台国際センター 宮城県仙台市)

横山詩子 「動脈管分化の分子メカニズム」第51回日本小児循環器学会総会・学術集会(2015.7.16-7.18, ホテル日航東京 東京都)

Yokoyama U. Regulation of collagens in the heart. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2015.4.25, 大阪国際会議場 大阪府大阪市)

Yokoyama U, Ichikawa Y, Ishiwata R, Ishikawa Y. PGE₂-EP4 signaling in smooth muscle cell plays a role in chronic inflammation of aortic abdominal aneurysm. The 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (2015.2.10, 京王プラザホテル 東京都)

Yokoyama U. PGE₂-EP4 signaling is a key regulator of cardiovascular stiffness

and elasticity. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014.3.16-18, 鹿児島大学 鹿児島県鹿児島市)

Yokoyama U. Molecular mechanisms of the regulation of vascular elastic fiber formation and development of a new 3D vascular model. The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2013.12.3-6, 神戸ポートアイランド 兵庫県神戸市)

Yokoyama U, Ishiwata R, Arakawa N, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Therapeutic Effect of EP4 Antagonist on Advanced Abdominal Aortic Aneurysm. The 86th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2013.11.16-20, Dallas, USA)

Yokoyama U, Jin MH, Ishiwata R, Ichikawa Y, Minamisawa S, Ishikawa Y. The multiple roles of prostaglandin E and oxygen in the regulation of the ductus arteriosus. The 7th TAKAO International symposium (2013.7.13-15, 国立オリンピック記念青少年総合センター 東京都)

Saito J, Yokoyama U, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y. Human Gene Profiling Reveals contribution of Tissue Plasminogen Activator to Intimal Thickening of the Ductus Arteriosus. The 89th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2016.11.12-16, New Orleans, USA)

Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 receptor EP4 signaling in vascular smooth muscle cells decreases aortic elasticity. Experimental Biology Annual Meeting (2014.4.26-30, San Diego, USA)

Yokoyama U, Ishiwata R, Yasuda S, Goda M, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Innovative pharmacological therapy for Abdominal Aortic Aneurysm by inhibition of PGE₂-EP4 signaling. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2014.3.21-23, 東京国際フォーラム

東京都)

Kumagaya S, Yokoyama U, Minamisawa S, Inoue T, Ishikawa Y. Prostaglandin E₂-EP₄ signaling-induced fibulin-1 may play a role in intimal thickening in the ductus arteriosus. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014.3.16-18, 鹿児島大学 鹿児島県鹿児島市)

Yokoyama U, Ishiwata R, Arakawa N, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Therapeutic Effect of EP₄ Antagonist on Advanced Abdominal Aortic Aneurysm. The 86th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2013.11.16-20, Dallas, USA)

Yokoyama U, Aoki R, Ichikawa Y, Iwasaki S, Seki K, Nishimaki S, Yokota S, Minamisawa S, Ishikawa Y. Decreased Serum Osmolality Augments the Closure of the Ductus Arteriosus in Neonates. The 86th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2013.11.16-20, Dallas, USA)

Kumagaya S, Yokoyama U, Sato A, Nishihara H, Inoue T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin E₂-EP₄ signaling promotes secretion of the lipid-relating proteoglycan biglycan in human coronary arteries during development. The 7th TAKAO International symposium (2013.7.13-15, 国立オリンピック記念青少年総合センター 東京都)

Ishiwata R, Yokoyama U, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin E₂-EP₄ signaling inhibits vascular elastic fiber formation in the ductus arteriosus. The 7th TAKAO International symposium (2013.7.13-15, 国立オリンピック記念青少年総合センター 東京都)

〔図書〕(計2件)

Yokoyama U, Ishiwata R, Ishikawa Y. Eicosanoids and Aortic Aneurysm. *Bioactive Lipid Mediators. Current*

Reviews and Protocols. Editors: Yokomizo T, Murakami M. 総頁数 426, ISBN 978-4-431-55669-5, p267-278, 2015, Springer

Yokoyama U, Ishikawa Y., Reconstruction of elastic fibers in three-dimensional smooth muscle cells. *corresponding author *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application*. Editors: Akashi M, Akagi T, Matsusaki M. 総頁数 271, ISBN 978-4-431-55139-3, p159-174, 2014, Springer

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 詩子 (YOKOYAMA, Utako)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 70404994

(2) 研究分担者

市川 泰広 (ICHIKAWA, Yasuhiro)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 10555121

(3) 連携研究者

杉本 幸彦 (SUGIMOTO, Yukihiro)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号: 80243038

西原 広史 (NISHIHARA, Hiroshi)
北海道大学・医学研究科・特任准教授
研究者番号: 50322805

荒川 憲昭 (ARAKAWA, Noriaki)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教
研究者番号: 60398394

(4) 研究協力者

なし