

令和元年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19178

研究課題名(和文)自律性血管運動を応用した新しい血管内皮・平滑筋機能検査法の開発とその有用性の検討

研究課題名(英文) Development of novel vascular endothelium / smooth muscle function test applying vasomotion

研究代表者

渡辺 彰吾 (Watanabe, Shogo)

岡山大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：20548341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：自律性血管運動(vasomotion)は、細動脈において栄養や酸素を効率よく運搬するための自律的な血管収縮・拡張運動である。申請者は上腕部のvasomotionを記録し、その各周波数成分が虚血性心疾患に潜む血管内皮機能障害、腎機能障害、炎症、糖尿病と関連することを発見した。vasomotionは新しい血管内皮機能の評価法となりうるが、そのメカニズムや有用性については詳しく検証されていない。脂肪肝と動脈硬化を同時発症するSHRSP5モデルラットのvasomotion記録に成功し、関連論文を2編発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮細胞は、全身をめぐる血管の最内層にある細胞で、一酸化窒素(NO)やエンドセリンなど数多くの血管作動性物質を放出しており、血管壁の収縮・弛緩をはじめとして、血管壁への炎症性細胞の接着、血管透過性、凝固・線溶系の調節などを行っている。この血管内皮機能は、高血圧や糖尿病、脂質異常症、肥満に加え、近年問題となっているメタボリックシンドローム(MetS)によってもその機能が低下することが知られている。血管内皮機能の低下を早期に発見することができれば、動脈硬化および重篤な心血管・脳血管疾患を未然に防ぐことが出来るため、非常に重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：Vasomotion is an autonomous vasoconstriction / expansion movement for efficiently transporting nutrients and oxygen in arterioles. We recorded vasomotion in the upper arm and found that each frequency component is associated with vascular endothelial dysfunction, renal dysfunction, inflammation and diabetes underlying ischemic heart disease. Although vasomotion can be a new evaluation method of vascular endothelial function, its mechanism and usefulness have not been examined in detail. We succeeded in vasomotion recording of SHRSP5 model rat that developed fatty liver and arteriosclerosis simultaneously, and published two related papers.

研究分野：動脈硬化学

キーワード：血管内皮機能 FMD 動脈硬化 脂質代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は、全身をめぐる血管の最内層にある細胞で、一酸化窒素(NO)やエンドセリンなど数多くの血管作動性物質を放出しており、血管壁の収縮・弛緩をはじめとして、血管壁への炎症性細胞の接着、血管透過性、凝固・線溶系の調節などを行っている。この血管内皮機能は、高血圧や糖尿病、脂質異常症、肥満に加え、近年問題となっているメタボリックシンドローム(MetS)によってもその機能が低下することが知られている。血管内皮機能が低下した状態が続けば、動脈硬化の進展、さらにはプラークの不安定化を引き起こす可能性が高い。血管内皮機能の低下を早期に発見することができれば、動脈硬化および重篤な心血管・脳血管疾患を未然に防ぐことが出来るため、非常に重要な課題である。

このような背景のもと、血管炎症や動脈硬化を反映する血管内皮機能の指標として、血流依存性血管拡張反応 (Flow-Mediated Dilatation: FMD)検査が注目されている。この FMD 検査は、早期の動脈硬化を診断できる手法として 2012 年 4 月に厚生労働省に認可され、生活習慣病の改善指導や実際の臨床現場への導入も増加している。実際、FMD 検査に関する論文はすでに 2800 件以上にのぼり、世界的な関心の高さが伺える。申請者(渡辺)も虚血性心疾患患者の FMD を測定し、自律神経機能を加味した新しい FMD 解析手法を提案した実績をもつ。このように FMD 検査は非常に有用であることが示唆されているが、以下のような問題点も有している。

[血管内皮機能(FMD)検査の問題点]

- ① FMD による血管拡張反応には、純粋な血管内皮細胞の NO 放出機能だけでなく、血管平滑筋の拡張機能も含まれる。血管平滑筋の機能を単離するニトログリセリン誘発性血管拡張反応(NMD)検査もあるが、ニトログリセリンを患者に投与するには倫理的なハードルが高い。
- ② 5 分間の血管駆血が必要であるため、上腕動脈のみの測定にとどまっており、本来、アテローム型の動脈硬化が好発する頸動脈や大腿動脈への応用が極めて難しい。
- ③ 測定手技の習熟が必要であるため、測定誤差が大きく、再現性に乏しい。(米国心臓協会のガイドラインでは、検査技師には最低 6 ヶ月のトレーニングと年 100 回以上の測定経験が必要と述べられている)

2. 研究の目的

本研究ではこれらの FMD 検査の問題点を克服するため、「自律性血管運動: vasomotion」に着目した。vasomotion は哺乳動物の抵抗血管、すなわち細動脈に見られる自律的な血管収縮・拡張運動と報告され、末梢血液の栄養物質の運搬に関与するのみと考えられていたが、近年になって vasomotion が、血管内皮細胞と血管平滑筋間の電位依存的 Ca チャネル結合 (Gap junction)に起因することが報告された。したがって、一度の測定で血管内皮機能と血管平滑筋機能の両者をそれぞれ評価できることが示唆されている。事実、Hodges らは正常若年者の指尖部にレーザードプラ血流センサを取り付け、その血流変化(vasomotion)を周波数解析した結果、0.009~0.021 Hz を血管内皮依存性領域、0.052~0.145 Hz を血管平滑筋依存性領域であると結論づけた。

本手法は、駆血の必要がなく、特別な測定手技の習熟も必要としない。さらに、血管運動の周波数帯域によって、血管内皮機能と血管平滑筋機能も簡単に分離できる可能性を有している。しかしながら、その血管障害と vasomotion のメカニズムは不明な点が多く、実用化に向けてその有用性を検討することは非常に重要である

本研究の目的は、「自律性血管運動(vasomotion)を応用した新しい血管内皮・平滑筋機能検査法の開発とその有用性の検討」であるが、申請者(渡辺)が 2015 年 10 月に移籍したため、当初予定していた実験モデル動物 (DahlS.Z-Lepr^{fa}/Lepr^{fa} (DS/obese))を変更せざるを得なかった。そこで新しく高脂肪食負荷で非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)と動脈硬化を引き起こす SHRSP5/Dmcr モデルを使用し、vasomotion と心機能、腎機能、血管線維化、心臓交感神経、血管炎症、代謝機能との関連について考察した。

3. 研究の方法

[対象]

新しいメタボリックシンドロームのモデルラットとして SHRSP5/Dmcr モデルを用いた。本モデルはメタボリックシンドロームの肝臓での表現系とされる NASH と非常によく似た症状を呈する。この雄性 SHRSP5 ラットを 9 週齢で入手した。解析項目が多岐にわたるため、以下のように群分けをしてデータを取得する。

① WKY+普通食

② SHRSP5+高脂肪食

(その他にも、条件を変えた群を用意したが、本報告書では省略する)

[実験手順と解析項目]

10 週齢時から、WKY には通常飼料、SHRSP5 には高脂肪食を与え、毎週 1 回体重、血圧、心拍数、摂食量、摂水量を測定して経時的な変化を観察する。そして、18 週齢において vasomotion やマグヌス法による血管内皮機能評価、心エコーおよび心臓カテーテルによる心機能評価を行った後、全採血、臓器摘出を行い、病理組織学的、生化学的および分子生物学的な解析を行う。

具体的な解析項目を以下に示す。

- ① vasomotion(18週齢に実施)：vasomotionの記録には血管マグナス装置を使用した。マグナス装置の恒温槽プールに、リンゲル液(37℃)を貯め、1gで大動脈リング標本を牽引し、十分な馴化の後、フェニレフリンを投与した。血管張力がプラトーに到達した際に発生するvasomotionを記録した。血管張力を測定後、付属のソフトウェアを用いて振幅や周波数成分を解析した。
- ② 血管内皮機能(18週齢に実施)：同じく血管マグナス装置を使用した。上記のvasomotionを記録後、アセチルコリンを滴下し、血管を弛緩させた。記録されたデータはPCに保存され、アセチルコリンによる血管内皮依存性弛緩-濃度曲線を得た。

4. 研究成果

SHRSP5/Dmcrラットモデルは、高脂肪食負荷によって、NASHと動脈硬化を示すはずである。我々は、実際にこのモデルが、高脂肪食負荷によって、NASHと動脈硬化を進展させるかを確認した(図1)。その結果、SHRSP5は、8週間の高脂肪食負荷によって、肝臓の白色化および著大な肥大を引き起こし、さらには、マッソントリクローム染色による肝臓線維化を確認することができた(図1(1))。また、血管系においては、腸間膜動脈や腹部大動脈にオイルレッドOで染まる脂質沈着を確認することができた(図1(2))。その脂質沈着は冠動脈にも及び、冠動脈閉塞による心筋虚血、心筋梗塞巣、左室心筋収縮能低下も認められた(図1(3))。血清生化学検査では、NASHをとまなうSHRSP5ラットで、明らかな総コレステロール、LDL/HDL比の増加を認め、脂質沈着を惹起しやすい脂質代謝プロファイルを有していた(図1(4))。さらに、vasomotionと最も関連が深いと思われる血管内皮機能は、SHRSP5モデルの方が明らかにアセチルコリン反応性が弱く、わずか40%程度しか血管が弛緩しなかった(図1(5))。これは、SHRSP5モデルにおける血管内皮機能が障害され、高コレステロール血症との相互作用で、動脈硬化が悪化していることを証明している。本結果は、本研究の発表論文1: Journal of Atherosclerosis and Thrombosisに掲載された。

図2に正常ラット(WKY)とNASH疾患(SHRSP5)における血管張力測定時のvasomotionとその周波数解析結果を示す。WKY、SHRSP5ともに、血管収縮剤であるフェニレフリンを投与後、正常に血管収縮(血管張力の上昇)を引き起こし、最大発揮張力(プラトー)に到達した。Vasomotionはフェニレフリンなどの血管収縮剤の投与により、誘発されることが知られており、確かに本実験でも最大発揮力付近で、血管張力のゆらぎ、すなわちvasomotionが確認できた(図2左の拡大図)。比較的安定した2分間のvasomotionを選択し、高速フーリエ変換(FFT)解析を行ったところ、正常WKYラットでは、0.18 Hz付近に明確なピークが認められる他にも、0-0.1 Hzで複数のスペクトルが確認された。一方で、NASHを伴うSHRSP5ラットでは、主要なスペクトルピークが、0.21 Hzや0.42 Hzに確認された(図2右図)。

Hodgesらは正常若年者の指尖部にレーザードプラ血流センサを取り付け、その血流変化(vasomotion)を周波数解析した結果、0.009~0.021 Hzを血管内皮依存性領域、0.052~0.145 Hzを血管平滑筋依存性領域であると結論づけた。ヒトと動物との違いがあるため、比較することは困難であるが、SHRSP5モデルのような血管内皮機能が障害された血管では、概ねvasomotionの周波数帯域が高かった(図2)。これは我々が以前に虚血性心疾患を持つヒト患者での結果と一致する。血管内皮機能が障害された血管で、vasomotionの周波数が高くなる理由については未だに明らかになっていない。しかしながら、血管内皮細胞と血管平滑筋をつなぐGap junction

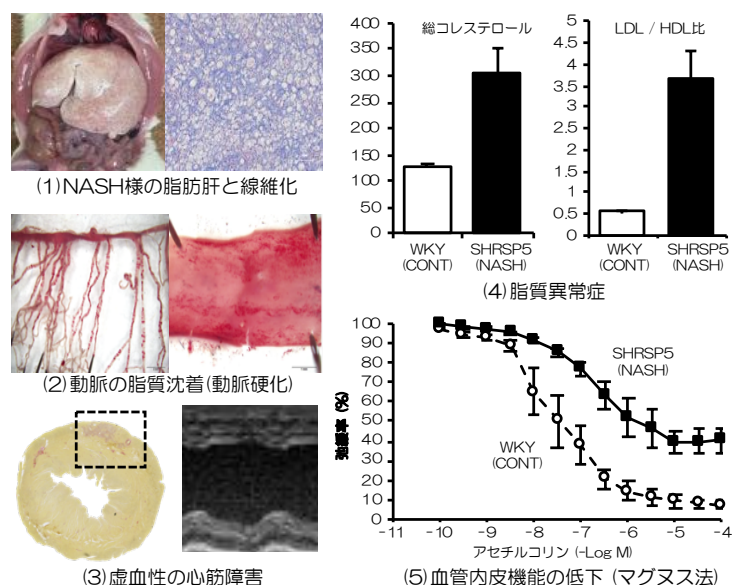


図1 SHRSP5ラットにおけるNASH、動脈硬化の進展

がリアノジン受容体を介して Ca イオンを一定周期で放出させ、血管の自律性血管運動 (vasomotion) として、効率よく血液を循環させていることはわかっている。vasomotion は、血管内皮機能の障害を代償するため、早い頻度で血管運動を繰り返している可能性があるかもしれない。

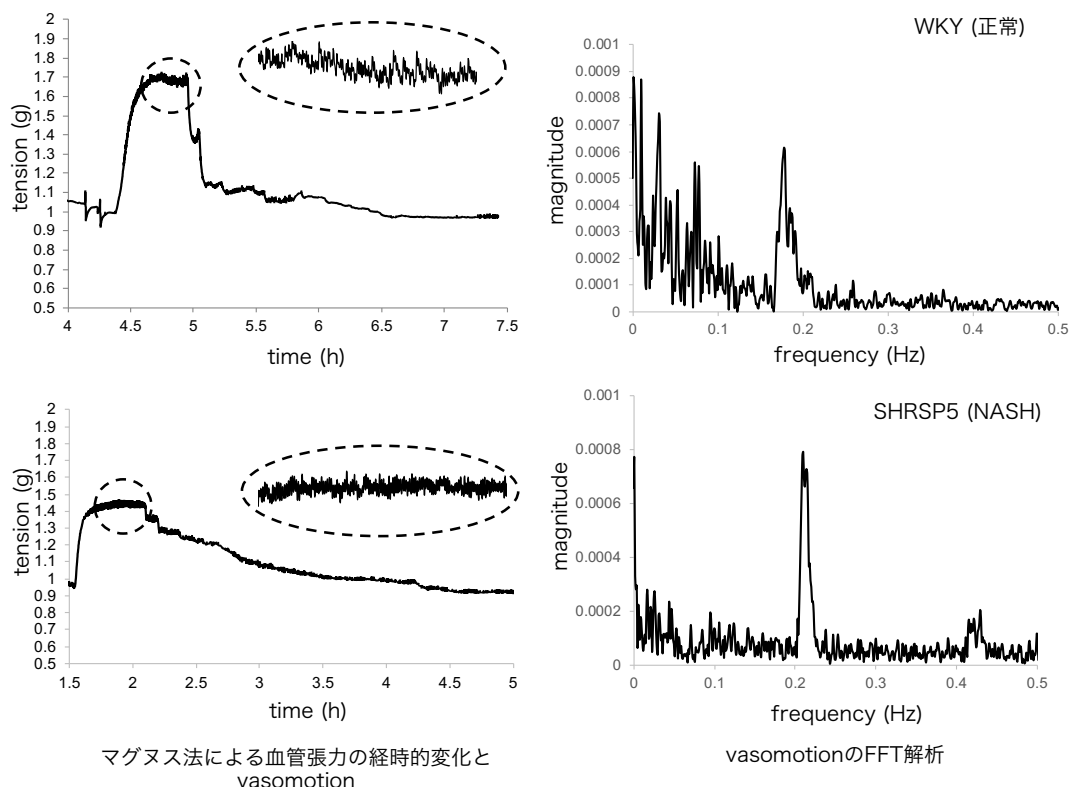


図2 正常ラット(WKY)とNASH疾患 (SHRSP5)における血管張力測定時のvasomotionとその周波数解析結果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① S. Watanabe, S. Kumazaki, K. Kusunoki, T. Inoue, Y. Maeda, S. Usui, R. Shinohata, T. Ohtsuki, S. Hirohata, S. Kusachi, K. Kitamori, M. Mori, Y. Yamori, and H. Oka, SHRSP5/Dmcr rat fed with high-fat and high-cholesterol diet induces cardiac fibrosis, vascular endothelial and left ventricular diastolic dysfunction, *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 査読有, 25(5), 2018, 439-453, doi: 10.5551/jat.40956.
- ② S. Watanabe, S. Kumazaki, S. Yamamoto, I Sato, K. Kitamori, M. Mori, Y. Yamori, S. Hirohata, Non-alcoholic steatohepatitis aggravates nitric oxide synthase inhibition-induced arteriosclerosis in SHRSP5/Dmcr rat model, *International Journal of Experimental Pathology*, 査読有, 99(6), 2018, 282-294, doi: 10.1111/iep.12301.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Shogo Watanabe et al, SHR symposium, Non-alcoholic steatohepatitis aggravates myocardial infarction induced by NO synthase inhibitor, 2018.
- ② 渡辺彰吾他, 第50回日本動脈硬化学会, SHRSP5/Dmcr ラットを用いた非アルコール性脂肪性肝炎と心血管傷害の仲介因子としての胆汁酸代謝, 2018
- ③ 渡辺彰吾他, 第50回日本動脈硬化学会, 脳梗塞易発性高血圧自然発症 (SHRSP) ラットの新規亜系統として注目される SHRSP5/Dmcr モデルの基礎病態, 2018
- ④ 渡辺彰吾他, 第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, SHRSP5/Dmcr ラットの脂肪細胞を介した非アルコール性脂肪性肝炎と心機能・血管障害の関連, 2017
- ⑤ Shogo Watanabe et al, The 6th International Congress on Lipid & Atherosclerosis 2017, SHRSP5/Dmcr rats fed on high-fat and high-cholesterol diet develop non-alcoholic steatohepatitis that aggravates cardiac or vascular dysfunction, 2017.
- ⑥ Shogo Watanabe et al, The 6th International Congress on Lipid & Atherosclerosis 2017, Uric acid aggravates cardiac inflammation via adipocyte URAT-1 in non-alcoholic steatohepatitis, 2017.

[その他]
ホームページ等
<https://watanabeshogo-lab.jimdo.com/>

6. 研究組織

該当なし