

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08096

研究課題名(和文)「血管褐色化」からとらえる閉経後の動脈硬化性疾患への新たなアプローチ

研究課題名(英文) A New Approach to Postmenopausal Atherosclerotic Disease Based on "Vascular Beiging"

研究代表者

上田 和孝 (Ueda, Kazutaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60375798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：過去の研究から、エストロゲンが動脈硬化の発症・進展への関与が示唆されているが、その詳細な病態生理学的、及び分子生物学的メカニズムについては未解明な部分が多い。本研究では、「血管の褐色化」という観点から血管傷害後の反応メカニズムを解き明かすことを目的とした。そして、褐色化ブロッックマウス(adipoq-Cre PRDM16 flox)を使用して褐色化の意義を検討するとともに、1細胞解析によって褐色化PVAT由来の抗炎症性分泌因子neureglin4を同定した。本研究結果から、血管傷害後に生じるPVATの褐色化によって、血管の炎症を終息に導き、病的な血管リモデリングを抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
傷害血管で褐色脂肪に特徴的な遺伝子発現が増加する「血管の褐色化」はこれまでにほとんど報告のない新しい概念である。本研究により、血管褐色化の制御が動脈硬化性疾患の新たな治療ターゲットとして見出される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Although past studies have suggested the involvement of estrogen in the development and progression of atherosclerosis, the detailed pathophysiological and molecular biological mechanisms remain unresolved. In this study, we aimed to elucidate the response mechanism after vascular injury in terms of "vascular browning". We elucidated the significance of beiging using adipoq-Cre PRDM16 flox mice and identified an anti-inflammatory secreted factor, neureglin4, derived from beiging PVAT by single-cell analysis. These results indicate that beiging of PVAT following vascular injury leads to the resolution of vascular inflammation and suppresses pathological vascular remodeling.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 性ホルモン 脂肪褐色化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過去の研究から、エストロゲンが動脈硬化の発症・進展に深く関わっていることが明らかにされている。しかしその詳細な病態生理学的、及び分子生物学的メカニズムについては未解明な部分が多い。

我々は、DNA マイクロアレイによる予備検討で、内皮傷害を受けた血管では、一般に褐色脂肪細胞に特徴的に発現するとされる UCP1, Cidea, COX7a, COX8b 等の遺伝子群が顕著に増加しており、「血管褐色化」ともいえる現象が起きていることを捉えた。また同時に、この現象はエストロゲンによって制御されることを見出した。

エストロゲン受容体(estrogen receptor, ER)は、従来知られる核内移行して遺伝子発現を制御する古典的 " genomic " 経路の他に、核内移行しない " non-genomic " なシグナル伝達経路が存在し、その役割の解明が待たれている。我々は non-genomic シグナルの活性化に不可欠な ER の遺伝子領域を同定し、その部位のアミノ酸配列を組み替えた変異 ER において non-genomic シグナルが消失することを細胞実験で見出した(Circulation 2012, PLoS One 2016)。本研究に先立ち、我々は全ての ER を変異 ER に置換することで、non-genomic シグナルを選択的にブロックした新規の遺伝子改変マウスを世界に先駆けて樹立し、non-genomic ER シグナルの役割を直接的に検討することを可能にした。

2. 研究の目的

本研究では、予備検討から得られたデータをもとに、「血管の褐色化」という観点から血管傷害後の反応メカニズムを解き明かすとともに、我々が樹立したエストロゲン受容体 non-genomic 経路のみを選択的にブロックしたマウスを用いて、エストロゲンの血管保護作用に重要なシグナル経路を同定する。研究期間内には以下のことを明らかにすることを目的とした。

動脈硬化の発症・進展における血管褐色化の意義
エストロゲンの血管保護作用における血管褐色化の役割とシグナル経路
血管褐色化制御による動脈硬化性疾患の新規治療法の開発基盤の構築

3. 研究の方法

動脈硬化の発症・進展における血管褐色化の意義の解明

-1. 褐色化を生じる血管構成成分の同定

動脈は血管内膜、中膜、外膜、血管外マトリックス、血管周囲脂肪組織(perivascular adipose tissue; PVAT)などで構成されている。血管内皮傷害を受けた血管において褐色化する血管組織成分を明らかにするために、組織免疫染色法を用いて、代表的な褐色化マーカーである UCP1 がいずれの血管構成成分に発現しているのかを検討する。同様に、フローサイトメトリー(FACS)により、UCP1 陽性細胞が、平滑筋(SMA, SM22)、内皮(CD31)、マクロファージ(F4/80)、脂肪(PPAR)等のうち、どの細胞腫マーカーと共発現しているのかを検討し、褐色化する細胞成分を同定する。

-2. 「血管褐色化ブロックマウス」の作製

FACS でソーティングした UCP1 発現細胞内の遺伝子転写産物を用いて RNA シークエンスを行い、褐色化マーカー発現細胞の特徴を捉えるとともに、ネットワーク解析によって血管褐色化のマスター遺伝子を見出す。さらにその遺伝子をノックアウトしたマウス「血管褐色化ブロックマウス」を樹立する。そのマウスを用いて血管褐色化が動脈硬化性変化に与える影響を検討する。

-3. 各種動脈疾患における血管褐色化の意義の検討

血管の褐色化現象が他の動脈疾患モデルにおいても認められるのかを検討する。我々の施設では、様々な動脈性疾患のマウスモデルを検討できる体制にある。大動脈瘤自然発症モデル(血管弾性板の形成不全による)、高脂血症モデル(ApoE ノックアウトマウス)、糖尿病モデル(ストレプトゾトシン投与)、肥満モデル(高カロリー食付与、レプチンレセプター欠損マウス)などが使用可能であり、これらの各種病態において大血管における褐色化マーカーの発現変化の有無を検討する。さらにこれらのモデルを、前述の血管褐色化ブロックマウスに適用することで、血管褐色化と病態形成の意義について検討する。

エストロゲンの血管保護作用における血管褐色化の役割とシグナル経路

-1. non-genomic シグナル選択的ブロックマウスを用いた検討

予備検討で得られた、エストロゲン投与が傷害後の血管褐色化を抑制するという結果について、より詳細なメカニズムについて検討する。loss of function の系として、non-genomic シグナル選択的ブロックマウスを用いて、エストロゲンによる血管褐色化制御および血管保護作用における、non-genomic シグナル経路の重要性について明らかにする。

-2. non-genomic シグナルの選択的活性化薬剤を用いた検討
gain of function の系として、non-genomic 経路を選択的に活性化するとされるアルブミン結合エストロゲン等の化合物を用いて、non-genomic シグナルの選択的な活性化による血管褐色化の変化や血管保護効果の変化を検討することにより、シグナル選択的エストロゲン作用薬の動脈疾患に対する治療応用の可能性について検討する。

4. 研究成果

・ PVAT 褐色化は傷害後の血管炎症を終息に導く

褐色化ブロックマウス(adipoq-Cre PRDM16 flox)において血管傷害を作成すると、傷害 14 日後の血管内膜肥厚が野生型マウスに比べて増悪した。F4/80 による免疫染色では、PVAT および血管におけるマクロファージの集積の程度には両群で差がなかった一方で、褐色化ブロックマウスにおいては、炎症型マクロファージマーカーである iNOS 陽性細胞数は顕著に増加しており、一方で抗炎症型マクロファージである CD206 陽性細胞数は減少していたことから、褐色化をブロックすることでマクロファージの性質が変化することが示唆された。

次に、褐色化 PVAT がマクロファージの性質を制御するメカニズムを検討するために、褐色化脂肪において特徴的に発現する機能分子である UCP1 をノックアウトしたマウス(UCP1 KO マウス)を用いて同様の実験を行ったところ、意外にも、血管傷害後のリモデリングに違いは見られなかった。このことから、褐色化 PVAT は UCP1 発現とは異なる機序でマクロファージに働きかけ、性質を変化させている可能性を考えた。

・ 1 細胞解析による褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の同定

そこで我々は、PVAT 脂肪組織を用いた 1 細胞解析を試みた。マウス大腿動脈にワイヤーによる血管傷害を加えた後に PVAT を採取したが、得られる組織量が極めて少ないこと、また、脂肪細胞のみならず膠原線維などの比較的弾性の強い組織も含まれることから、細胞をきれいに単離していく作業に難渋しており、現在も分離法の最適化を試みている。

一方で、マウス内臓脂肪組織を用いた 1 細胞解析結果については過去に報告があったことから、その結果を活用した解析を並行して行った。細胞ごとの発現遺伝子の特徴によるクラスター分類で、マウス内臓脂肪は個別の特徴を有する 15 のクラスターに分類された。その中で、褐色化を刺激する 3 受容体刺激薬投与後の脂肪において、ある一つのクラスター(C7)が特徴的に現れることが分かった。このクラスターの特徴を詳しく見てみると、褐色脂肪に特徴的に発現する遺伝子群(Ucp1, Cidea, Ppargc1a 等)が増加しており、本クラスターは褐色化した脂肪細胞の群であることが分かった。Gene Ontology によって遺伝子の機能的特徴を解析すると、ある分泌性タンパクをコードする遺伝子 neuregulin4 が見出された。

・ 褐色化 PVAT 制御による血管炎症抑制効果

3 受容体刺激薬(CL316243)は PVAT の褐色化を強く促進することを確認した。この CL316243 をマウス大腿動脈周囲に塗布したのち、血管傷害を加えたところ、傷害 14 日後の血管では、iNOS 陽性細胞数が減少し、CD206 陽性細胞数は増加しており、血管リモデリングは有意に抑制された。また、上記研究 2 で同定した neureglin4 を用いて培養マクロファージ細胞(RAW264.7)を刺激すると、マクロファージの抗炎症型へのシフトが起こり、炎症性サイトカインの発現も減少した。

本研究から、血管傷害後に生じる PVAT の褐色化によって、PVAT から分泌される因子がマクロファージに作用し抗炎症型へシフトさせることで、血管の炎症を終息に導き、病的な血管リモデリングを抑制することが示唆される。この結果は、褐色化刺激薬が動脈硬化予防・治療に有用である可能性を示唆するものであり、今後は、将来の臨床への応用の可能性を見据え、血管傷害以外の血管疾患モデルでの検討や、ヒトの動脈サンプルを用いた検討などをさらに行う予定。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Zhu Guangshuo, Ueda Kazutaka, Hashimoto Masaki, Zhang Manling, Sasaki Masayuki, Kariya Taro, Sasaki Hideyuki, Kaludercic Nina, Lee Dong ik, Bedja Djahida, Gabrielson Matthew, Yuan Yuan, Paolucci Nazareno, Blanton Robert M., Karas Richard H., Mendelsohn Michael E., O'Rourke Brian, Kass David A., Takimoto Eiki	4. 巻 596
2. 論文標題 The mitochondrial regulator PGC1 is induced by cGMP-PKG signaling and mediates the protective effects of phosphodiesterase 5 inhibition in heart failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 17~28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14228	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Takayuki, Takeda Norifumi, Hara Hironori, Ishii Satoshi, Numata Genri, Tokiwa Hiroyuki, Maemura Sonoko, Suzuki Takaaki, Takiguchi Hiroshi, Kubota Yoshiaki, Seo Kinya, Sakata Asuka, Nomura Seitaro, Hatano Masaru, Ueda Kazutaka, Nishimura Satoshi, Komuro Issei	4. 巻 144
2. 論文標題 Three-Dimensional Visualization of Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1452~1455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056219	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Kazutaka, Fukuma Nobuaki, Adachi Yusuke, Numata Genri, Tokiwa Hiroyuki, Toyoda Masayuki, Otani Akira, Hashimoto Masaki, Liu Pang-Yen, Takimoto Eiki	4. 巻 12
2. 論文標題 Sex Differences and Regulatory Actions of Estrogen in Cardiovascular System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.738218	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Adachi Yusuke, Kiyosue Arihiro, Ando Jiro, Kawahara Takuya, Kodera Satoshi, Minatsuki Shun, Kikuchi Hironobu, Inaba Toshiro, Kiriya Hiroyuki, Hirose Kazutoshi, Shinohara Hiroki, Saito Akihito, Fujiwara Takayuki, Hara Hironori, Ueda Kazutaka, Momomura Shin-ichi, Fujita Hideo, Komuro Issei	4. 巻 11
2. 論文標題 Factors associated with left ventricular reverse remodelling after percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular systolic dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80491-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toko Haruhiro, Morita Hiroyuki, Katakura Masanori, Hashimoto Michio, Ko Toshiyuki, Bujo Satoshi, Adachi Yusuke, Ueda Kazutaka, Murakami Haruka, Ishizuka Masato, Guo Jiaxi, Zhao Chunxia, Fujiwara Takayuki, Hara Hironori, Takeda Norifumi, Takimoto Eiki, Shido Osamu, Harada Mutsuo, Komuro Issei	4. 巻 10
2. 論文標題 Omega-3 fatty acid prevents the development of heart failure by changing fatty acid composition in the heart	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72686-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Kazutaka, Adachi Yusuke, Liu Pangyen, Fukuma Nobuaki, Takimoto Eiki	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulatory Actions of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 0~0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuma Nobuaki, Takimoto Eiki, Ueda Kazutaka, Liu Pangyen, Tajima Miyu, Otsu Yu, Kariya Taro, Harada Mutsuo, Toko Haruhiro, Koga Kaori, Blanton Robert M., Karas Richard H., Komuro Issei	4. 巻 5
2. 論文標題 Estrogen Receptor- Non-Nuclear Signaling Confers Cardioprotection and Is Essential to cGMP-PDE5 Inhibition Efficacy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 282~295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2019.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akazawa Hiroshi, Toko Haruhiro, Harada Mutsuo, Ueda Kazutaka, Koderia Satoshi, Kiyosue Arihiro, Fujii Katsuhito, Hatano Masaru, Daimon Masao, Ando Jiro, Takimoto Eiki, Morita Hiroyuki, Komuro Issei	4. 巻 83
2. 論文標題 Overview of the 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Renaissance of Cardiology for the Creation of Future Medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1829~1835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0587	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Kazutaka, Toko Haruhiro, Komuro Issei	4. 巻 139
2. 論文標題 Endothelial Cell-Derived Angiocrines Elicit Physiological Cardiomyocyte Hypertrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2585 ~ 2587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040632	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko M, Ueda K, Nishimae I, Nitta S, Suzuki M, Kasao M, Shirai T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Subendocardial Ischemia Because of Coronary Artery Spasm Causes Transient Severe Mitral Regurgitation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ Heart Fail.	6. 最初と最後の頁 e005496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda K, Takimoto E, Lu Q, Liu P, Fukuma N, Adachi Y, Suzuki R, Chou S, Baur W, Aronovitz MJ, Greenberg AS, Komuro I, Karas RH.	4. 巻 67
2. 論文標題 Membrane-Initiated Estrogen Receptor Signaling Mediates Metabolic Homeostasis via Central Activation of Protein Phosphatase 2A.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1524-1537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db17-1342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Adachi Y, Ueda K, Ito K, Takimoto E, Komuro I.
2. 発表標題 Pathophysiological Role of Browning of Perivascular Adipose Tissue in the Development of Vascular Remodeling
3. 学会等名 Annual Symposium of the American Heart Association scientific sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi Y, Ueda K, Ito K, Takimoto E, Komuro I.
2. 発表標題 Pathophysiological Significance of Browning of Perivascular Adipose Tissue in the Development of Atherosclerosis.
3. 学会等名 Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi Y, Ueda K, Ito K, Takimoto E, Komuro I
2. 発表標題 Pathophysiological Significance of Browning of Perivascular Adipose Tissue in the Development of Atherosclerosis
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi Y, Ueda K, Ito K, Takimoto E, Komuro I.
2. 発表標題 Pathophysiological significance of browning of perivascular adipose tissue in the development of atherosclerosis
3. 学会等名 Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi Y, Ueda K, Ito K, Takimoto E, Komuro I.
2. 発表標題 Phenotypic change of perivascular adipose tissue associated with endovascular damage
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi Y, Ueda K, Ito K, Takimoto E, Komuro I.
2. 発表標題 Phenotypic change of perivascular adipose tissue associated with endovascular damage.
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Adachi Y, Ueda K, Ito K, Takimoto E, Komuro I.
2. 発表標題 Phenotypic change of perivascular adipose tissue associated with endovascular damage
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関