

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目： 基盤研究（B）  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19390207  
 研究課題名（和文） 動脈硬化進展の新規制御機構の同定と分子イメージング法への応用  
 研究課題名（英文） Identification of novel regulator of atherosclerosis and development of molecular imaging technique  
 研究代表者  
 佐田 政隆（SATA MASATAKA）  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
 研究者番号： 80345214

## 研究成果の概要：

動脈硬化進展と破綻に関する新規制御機構を明らかにすることを目的とした。特に、従来あまり注目されていなかった、外膜血管新生ならびに動脈周囲の脂肪組織の意義をモデル動物と手術中に得られるサンプルを用いて検討した。血管外周囲脂肪組織は、病的血管リモデリングに対して、通常防衛的に機能すると考えられた。血管障害や生活習慣病によって、血管周囲脂肪組織の形質が変化し、内膜増殖や動脈硬化の病態に重要な役割を演ずることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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： 血管病態学、動脈硬化、脂肪、

## 1. 研究開始当初の背景

不安定狭心症や急性心筋梗塞といった急性冠症候群の原因として、「プラークの破綻」が注目されている。破綻した病変では、脂質コアの増大、被膜の菲薄化、平滑筋細胞数の減少、凝固能の亢進、コラーゲン含有量の減少、炎症細胞浸潤、タンパク分解酵素の発現亢進、プラーク内血管新生などが認められる。しかし、このようなプラークの脆弱化がどのようにしておこるのか、どのようにして予知できるのか、どのようにして予防できるのか

などに関して不明な点が多い。

動脈硬化は「血管への傷害」を契機に発症すると考えられている。近年、様々な分化能を有する組織幹細胞が成体においても残存しており、遠隔臓器の修復や再生に関与することが明らかになった。そこで、動脈硬化の進展と破綻における血中前駆細胞の関与を検討すると同時に、脂肪細胞の起源と脂肪前駆細胞の同定ならびにその機能解析を試みた。また、「プラーク破綻」の過程における脂肪組織の役割に関して検討することにした。

## 2. 研究の目的

(1) 動脈硬化進展と破綻に関する新規制御機構を明らかにする。特に、従来あまり注目されていなかった、動脈硬化の進展と破綻における外膜血管新生の意義を検討する。

(2) 血管外膜周囲に豊富に存在する脂肪組織の形質を、皮下脂肪、内臓脂肪と比較する。また、血管外膜脂肪組織周囲と血管壁との物理的、機能的、生理的相互関係を検討する。血管傷害時に、血管外膜周囲脂肪組織に生じる遺伝子発現の変化を検討する。

(3) 血管外膜周囲脂肪組織を残した場合と、除去した場合で、血管傷害を加えて病変の形成の程度を比較検討する。血管外膜周囲脂肪組織から遊離されるアディポサイトカインの血管リモデリングにおける生理的意義を各種遺伝子改変マウスを用いて検討する。

(4) 血管外膜における毛細血管の発達を蛍光標識技術、走査型電子顕微鏡など先端画像診断技術で判断する。

## 3. 研究の方法

(1) ApoE 欠損マウス(ApoE<sup>-/-</sup>)に、西洋型食餌を30-60週間与え、高度に進行した動脈硬化を形成させる。そのうえで、アポE欠損かつGFPを発現するマウス(ApoE<sup>-/-</sup>GFP<sup>+/+</sup>)を発現するマウスの骨髄を移植する。大動脈の粥状動脈硬化病変にみられる平滑筋細胞の由来を調べる。また、その細胞の遺伝子発現を経時的に観察する。

(2) 高度動脈硬化の進展した60-100週齢の高齢ApoE欠損マウスと血管病変を有しない若齢C57マウスを屠殺し、生理的食塩水で灌流する。心臓周囲、動脈硬化好発部位である腕頭動脈、大動脈弓部、総腸骨動脈分岐部などを外膜、周囲脂肪組織、結合織など一塊として摘出したのち、OCTコンパウンド中に包埋する。20-50 $\mu$ m程度に厚く凍結切片を作製したのち、スライドガラス上で4%パラフォルムアルデヒドで固定したのち、血管内皮細胞(CD31, Cy3), 平滑筋細胞( $\alpha$ -SMアクチン, FITC,) 脂肪組織(アディポネクチン, Cy5)で三重染色する。三次元再構築共焦点顕微鏡(FV-300, Olympus)を用いて、血管壁、毛細血管叢、粥腫、外膜周囲脂肪組織の機能的相互関係を評価する。T細胞(CD3), マクロファージ(MOMA2)に対する多重染色を施行し、動脈硬化発症の経過と血管外膜周囲脂肪組織への炎症細胞浸潤の関連を検討する。

(3) 60-100週齢の高齢ApoE欠損マウスに屠殺し、下大静脈を切開したのち、左心室から生理的食塩水を生理的圧力のもと灌流したのち、パラフォルムアルデヒドで固定する。その後、合成樹脂MERCOSYL-2R(大日本インキ)を灌流し、一昼夜かけて重合させる。そ

の後、55 $^{\circ}$ C水酸化カリウムで組織を十分に溶解したのち、走査型電子顕微鏡で観察する。豊富な脂肪内毛細血管叢が解剖学的に血管壁内と交通しているかどうかを詳細に検討する。

(4) ウサギやブタに高脂食を投与して、大動脈や冠状動脈に動脈硬化病変を形成させる。麻酔下に造影剤を投与して、64列マルチスライスCTで外膜やその周辺の毛細血管(Vasa Vasorum)を3次元的に描出する。動脈硬化病変とVasa Vasorum発達との関連を評価する。コントラストを調整して血管外膜周囲脂肪組織を描出する。Vasa Vasorumの走行を詳細に検討し、動脈硬化プラークと外膜周囲脂肪組織との毛細血管を介する交通を評価する。高度進行病変において、周囲の新生血管をCD31, MECA-32, BS-レクチン, 第VIII因子を用いた免疫染色で同定し、毛細血管密度として組織学的に定量化する。

## 4. 研究成果

(1) 高脂血症による動脈硬化への骨髄由来細胞の関与を検討した。病変が形成されていない6週齢のApoE欠損マウスに骨髄移植を施行した。粥腫の平滑筋細胞の半数は骨髄由来細胞であった。また、高度動脈硬化病変が形成された31~48週齢においてApoE欠損マウスにGFPマウスの骨髄を移植したところ、80~83週齢において大動脈粥腫ならびに外膜にGFP陽性細胞が集積していた。これらの骨髄由来細胞の一部は平滑筋細胞もしくは内皮細胞のマーカーを発現していた。

(2) マウス、ラビット、ヒトの末梢血単核球をPDGF-BBと塩基性FGF中で培養することで、 $\alpha$ アクチン陽性細胞を分化させることができた。高脂血症、加齢によって平滑筋前駆細胞数は増加した。アンジオテンシン・受容体拮抗薬によって末梢血中の平滑筋前駆細胞数は減少し、病変形成は抑制された。逆に、アンジオテンシンIIの持続注入によって血管前駆細胞数は増加し、病変進行は加速した。末梢血単核球から平滑筋様細胞への分化をスタチンは抑制した。若齢もしくは高齢ApoE欠損マウスに対する骨髄移植を行い、動脈硬化の発症と進展における血中前駆細胞の関与を検討した。骨髄細胞が血管前駆細胞として血中に動員され平滑筋細胞もしくは内皮細胞へ分化し動脈硬化病変に取り込まれていた。骨髄由来前駆細胞は、MMP-9を高発現シコラーゲンの産生能が低下していた。血中前駆細胞は外膜の新生血管から粥腫に進入しプラークの進展や破綻に関与していると考えられた。末梢血単核球から平滑筋様もしくは内皮様細胞を分化させることができた。アンジオテンシンは外膜における血管新生、骨髄前駆細胞の動員を促進し、プラークの形成を促進した。逆にアンジ

オテンシン1型受容体欠損マウスにおいては、血中前駆細胞数が減少しており、病変形成が抑制されていた。野性型マウスからの骨髄移植によって、アンジオテンシン1型受容体欠損マウスの動脈硬化は促進された。アンジオテンシン受容体拮抗薬の投与によって、病変進展は抑制され、粥腫はより安定した性状を呈した。以上より、高度に進行した血管病変の細胞ターンオーバーに血中前駆細胞が関与していると思われる。特に、Vasa Vasorumからの新生血管を介してプラーク内部へ到達した前駆細胞は動脈硬化巣構成細胞に分化し、粥腫の進展と不安定化に関与している。骨髄ならびに血管のレニンアンジオテンシン系がプラークの脆弱化を促進し、急性冠症候群の発症予防のためアンジオテンシン受容体拮抗薬は有効であると考えられた。

##### 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 78 件)

- ① Fukuda D, Enomoto S, Shirakawa I, Nagai R, Sata M. Fluvastatin accelerates re-endothelialization impaired by local sirolimus treatment. *Eur J Pharmacol.* 612:87-92. 2009 査読有
- ② Sainz J, Sata M. When p66<sup>ShcA</sup> is away, mice EPCs sweetly play. *Cardiovasc Res.* 82:388-389. 2009 査読有
- ③ Fukuda, D., Sata, M. Role of bone marrow renin angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 21. 70-78. 2008 査読有
- ④ Iwata, H., Sata, M. The origin of the cells that contribute to neointima growth. *Circulation.* 117:3060-3061. 2008 査読有
- ⑤ Tanaka, K., Sata, M. Contribution of circulating vascular progenitors in lesion formation and vascular healing: lessons from animal models. *Curr Opin Lipidol.* 19:498-504. 2008 査読有
- ⑥ Fukuda, D., Sata, M., Ishizaka, N., Nagai, R. A critical role of bone marrow angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. 28. 90-96. 査読有
- ⑦ Sainz, J., Sata, M. Open sesame! CXCR4 blockade recruits neutrophils into the plaque. *Circ Res.* 102. 154-156. 2008 査読有
- ⑧ Tanaka, K., Sata, M., Natori, T., Kim-Kaneyama, J-R., Nose, K., Shibamura, M., Hirata, H., Nagai, R. Circulating progenitor cells contribute to neointimal formation in non-irradiated chimeric mice. *FASEB J* 22. 428-436. 2008 査読有
- ⑨ Matsumoto, M., Sata, M., Fukuda, D., Tanaka, K., Soma, M., Hirata, Y., Nagai, R. Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 197. 524-533. 2008 査読有
- ⑩ Shimazaki, M., Nakamura, K., Kii, I., Kashima, T., Amizuka, N., Li, M., Fukuda, K., Nishiyama, T., Kitajima, S., Saga, Y., Fukayama, M., Sata, M., Kudo, A. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp. Med.* 205. 295-303. 2008 査読有
- ⑪ Imaizumi, S., Miura, S., Nakamura, K., Kiya, Y., Uehara, Y., Zhang, B., Matsuo, Y., Urata, H., Ideishi, M., Rye, K.A., Sata, M., Saku, K. Anti-arrhythmogenic effect of reconstituted high-density lipoprotein against ischemia/reperfusion in rats. *J Am Coll Cardiol.* 51. 1604-1612. 2008 査読有
- ⑫ Sumi, M., Sata, M., Toya, N., Yanaga, K., Ohki, T., Nagai, R. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci* 80:559-565. 2007 査読有
- ⑬ Sainz, J., Sata, M. CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 263-265. 2007 査読有
- ⑭ Sahara, M., Sata, M., Morita, T., Nakamura, K., Hirata, Y., Nagai, R. Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation. *Circulation.* 115: 509-517. 2007 査読有
- ⑮ Inoue, T., Sata, M., Hikichi, Y., Sohma, R., Fukuda, D., Uchida, T., Shimizu, M., Komoda, H., Node, K. Mobilization of CD34-Positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation* 115: 553-561. 2007 査読有
- ⑯ Sumi, M., Sata, M., Miura, S.I., Rye, K.A., Toya, N., Kanaoka, Y., Yanaga, K., Ohki, T., Saku, K., Nagai, R. Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 813-818. 2007 査読有
- ⑰ Aihara, K, Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Sata, M., Takamori, N., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Kawano, H., Yamada, T., Fukuda, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Sato,

T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Oomizu, A., Tsukada, M., Hayashi, H., Sudo, T., Kato, S., Matsumoto, T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 117. 1514-1526 2007 査読有

- ⑱ Yamada, T., Kondo, T., Numaguchi, Y., Tsuzuki, M., Matsubara, T., Manabe, I., Sata, M., Nagai, R., Murohara, T. Angiotensin II receptor blocker inhibits neointimal hyperplasia through regulation of smooth muscle-like progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 11. 2363-2369. 2007 査読有
- ⑲ Fukuda, D., Sata, M. Renin-angiotensin system: a potential modulator of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res.* 30. 1017-1018. 2007 査読有

[学会発表] (計 104 件)

- ① Takaoka M, Nagai R, Sata M. Endovascular injury alters adipocytokine profile of the periadventitial adipose tissue. American Heart Association 2008 November 8-12, New Orleans.
- ② Matsumoto M Eicosapentaenoic Acid Up-regulates Adiponectin Expression In Peri-adventitial Adipose Tissue And Suppresses Atherosclerotic Lesion Formation In Apoe-deficient Mice. American Heart Association Scientific Sessions, November 4-7. 2007. Orland
- ③ Takaoka M, Sata M, Nagai R. Endovascular Injury Affects Adipocytokine Profile Of The Periadventitial Adipose Tissue. American Heart Association Scientific Sessions, November 4-7. 2007. Orland
- ④ Sahara M, Sata M, Morita T, Hirata Y, Nagai R. Acceleration of Hyperlipidemia-induced Atherosclerosis in Apolipoprotein E and Angiotensin-converting Enzyme 2 Double-Knockout Mice. American Heart Association Scientific Sessions, November 4-7. 2007. Orland

[図書] (計 2 件)

- ① 田中君枝、佐田政隆 B 慢性心不全の治療 21. 再生医療にエビデンスはあるのか? EBM 循環器疾患の治療 2008-2009 (三田村秀雄、山科章、川名正敏、桑島巖編集) 中学医学社 2007:356-361.
- ② 佐田政隆 薬剤による血管再生 血

管の再生—血管再生医学の夜明け: 近づく実用化 (森下竜一編集) 真興交易 (株) 医書出版部 2008:118-129.

[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

佐田 政隆 (SATA MASATAKA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授

研究者番号: 80345214

(2) 研究分担者

平田 恭信 (HIRATA YASUNOBU)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 70167609

百瀬 敏光 (MOMOSE TOSHIMITSU)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 20219992

(3) 連携研究者

なし