

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590870
 研究課題名 (和文) アンジオテンシンによる T リンパ球系幹細胞の分化・増殖・活性化と不安定プラーク破綻
 研究課題名 (英文) Role of T lymphocyte activation by angiotensin II in the development of vulnerable plaque
 研究代表者
 山田 浩之 (YAMADA HIRIYUKI)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：00240036

研究成果の概要：

本研究は、骨髄におけるレニン・アンジオテンシン系の動脈硬化における働きに注目した先端的研究である。動脈硬化進展過程において骨髄単球系細胞の分化・増殖が亢進するが、骨髄細胞 AT1 受容体は、骨髄造血系幹細胞 (HSCs) および単球系前駆細胞における M-CSF 受容体の発現調節を介して HSCs から単球系前駆細胞への分化・増殖を促進し、動脈硬化形成の進展に関与していることが明らかとなった。骨髄レニン・アンジオテンシン系を動脈硬化性疾患の治療標的とした新たな治療方法の開発に発展することが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

1. 研究開始当初の背景

血管壁における慢性炎症が動脈硬化の中心的病態であり、レニン・アンジオテンシン (RA) 系はその発症進展過程において中心的役割を果たしている。申請者らはこれまで骨髄 RA 系に着目し、骨髄細胞アンジオテンシン II (AngII) タイプ 1

受容体 (AT1) の動脈硬化形成における機能解析について報告してきた。AT1 欠損 (AT1-KO) マウスの骨髄を移植したアポE欠損 (apoE-KO) マウスでは、動脈硬化病変が対照マウスに比べて著しく減少し、単球・マクロファージの集積や遊

走、泡沫細胞形成が抑制されていた。同様に、骨髄AT1-KOマウスを用いた血管傷害モデルでは、新生内膜増生が対照マウスに比べて著明に抑制されていた。さらに、骨髄AT1 受容体は単球・マクロファージをはじめとした炎症性細胞の機能制御（炎症性サイトカイン産生・遊走能・貧食能）に関与するだけでなく、骨髄における単球・マクロファージ系前駆細胞の分化・増殖を促進することも明らかとなった。

こうした炎症性細胞の動脈硬化プラーク内における動態は、様々なリンパ球系細胞を介した複雑な免疫調節機構により制御されている。実際、急性冠症候群（ACS）患者の末梢血やプラーク内には単クローン性の活性化Tリンパ球が増殖・集積している。さらに最近では、活性化Tリンパ球がプラーク被膜の平滑筋細胞にアポトーシスを誘導し、プラーク破綻に直接関与している可能性も報告されている。急性冠症候群の発症予測およびその予防には、従来からの炎症マーカーや単球・マクロファージ系細胞の活性化を抑制することに加えて、こうした炎症性細胞の機能制御に直接関与しているリンパ球をはじめとした免疫調節細胞の分化・増殖、さらにはその活性化機構を標的とした新たな診断・治療方法の開発が強く望まれる。

2. 研究の目的

活性化Tリンパ球の分化・増殖および細胞傷害作用を介した不安定プラークの破綻機序におけるAT1 受容体の役割を、細胞工学を駆使して発現している細胞別に解析することが可能である。さらに、リンパ系細胞の分化・増殖・活性化機構をAT1 受容体の働きに応じて制御し、不安定プ

ラークの破綻抑制に応用することが期待できる。本研究の目的は、1) Tリンパ球活性化におけるAT1 受容体作用の機能解析

2) 遺伝子改変動物を用いた不安定プラーク破綻過程におけるTリンパ球AT1 受容体の機能解析

3) Tリンパ球による免疫調節機構とレニン・アンジオテンシン系との関連を新たなプラーク破綻抑制療法の標的として発展させることである。

3. 研究の方法

(1) 骨髄移植モデルを用いた動物実験：

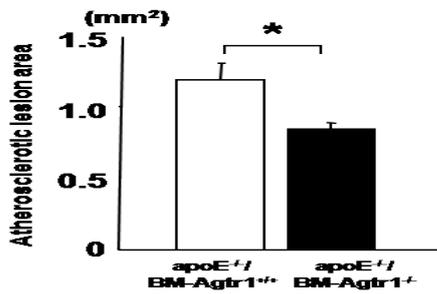
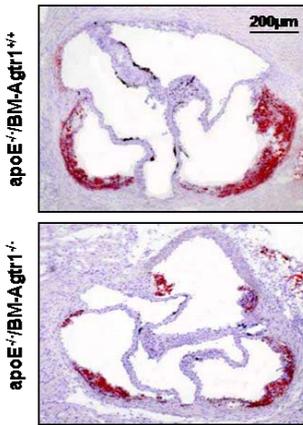
8週齢アポE欠損マウスに全身 X 線照射後、AT1 欠損マウスまたは野生型マウスの骨髄細胞をそれぞれ静脈内投与し、骨髄移植モデルを作製した。移植後4ヶ月後より高脂肪食を2ヶ月間投与した後、組織学的検討および骨髄細胞および末梢血をフローサイトメトリー法を用いて解析した。

(2) 骨髄造血系幹細胞 (HSC) の分離培養実験：

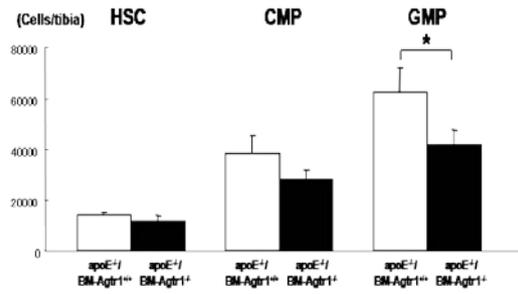
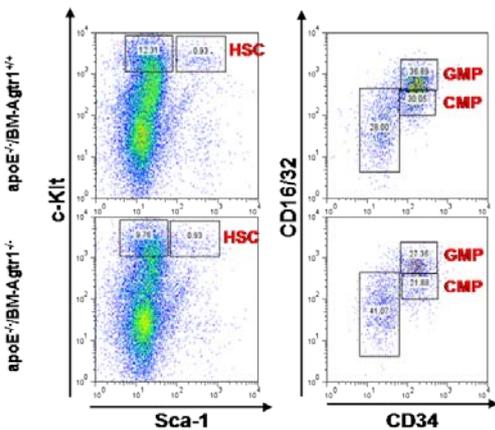
HSCから単球系前駆細胞への分化・増殖過程における骨髄AT1 受容体の作用機序を検討するため、AT1 欠損マウスおよび野生型マウスの骨髄細胞よりFACS Ariaを用いてHSCsを分離し、M-CSF刺激培養下における単球系前駆細胞数の変化を経時的に検討した。また、分離したHSCおよび単球系前駆細胞におけるM-CSF受容体(c-Fms)の発現およびそのシグナル伝達経路について解析した。

4. 研究成果

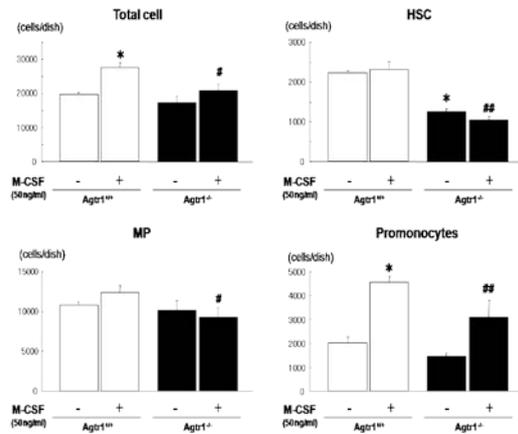
(1) 骨髄AT1 欠損マウスでは対照マウスに比べて動脈硬化形成が有意に抑制されていた(31%、 $P < 0.05$)。



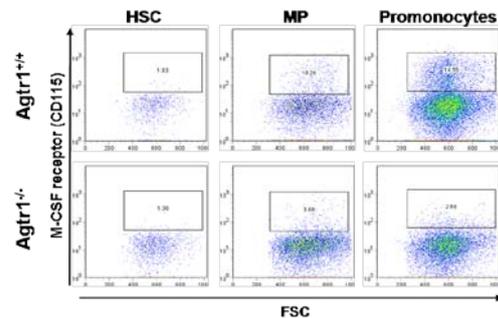
(2) ドナーマウスおよび移植4ヶ月後のマウスにおける単球系前駆細胞数および末梢血単球数は両群間で差を認めなかった。一方、高脂肪食開始2ヵ月後のマウスでは、HSC数は両群間で有意差を認めなかったものの、単球系前駆細胞数は骨髄AT1欠損マウスにおいて有意に減少しており (4.7 ± 0.7 vs $10.2 \pm 1.4 \times 10^3$ cells/tibia, $P < 0.05$)、高脂肪食開始後における単球系前駆細胞への分化・増殖がAT1受容体欠損マウスでは抑制されていることが示唆された。

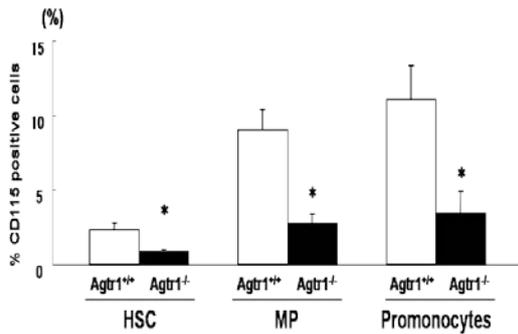


(3) M-CSF非投与下におけるHSC培養実験では、単球系前駆細胞数の増加は両群間で同等であった。一方、M-CSF投与下では単球系前駆細胞数の増加がAT1欠損HSC群で有意に抑制されていた (40%, $P < 0.01$)。

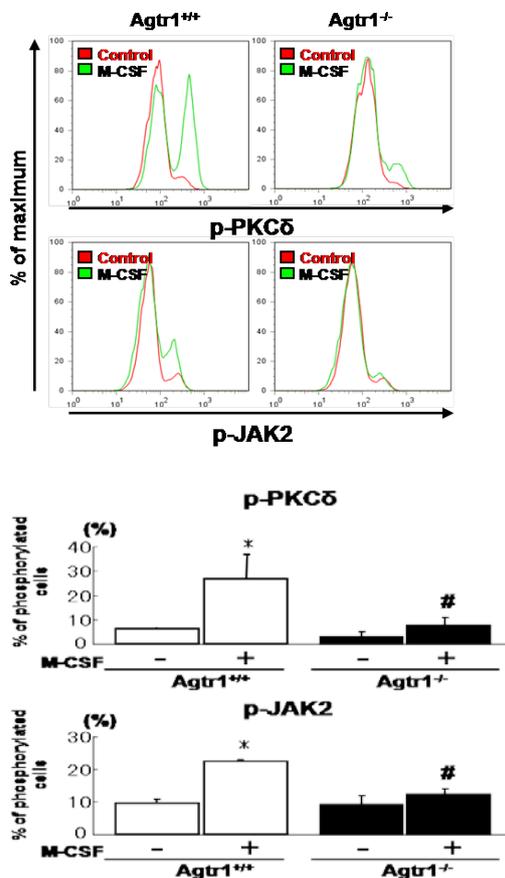


(4) M-CSFの受容体であるc-Fmsの発現はAT1欠損HSCおよび単球系前駆細胞において著明に低下していた (39%, 60%, $P < 0.05$)。





(5) c-Fms のシグナル伝達経路である PKC- δ および JAK2 のリン酸化も著明に抑制されていた (80%、75%、 $P < 0.05$)。



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 3 件)

- ① 山田浩之、椿本恵則、松原弘明 動脈硬化形成における骨髄RA系の役割 医学のあゆみ 223(13):1211-1216, 2007. 査

読無

- ② 椿本恵則、山田浩之、岸田聡、川人浩之、高田博樹、松原弘明 骨髄単球系細胞と RAS Angiotensin Research 5(4):12-16, 2008. 査読無
- ③ 山田浩之、松原弘明 骨髄RASの血管傷害後内膜増生における役割 医学のあゆみ 228(5):446-451, 2009. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yamada H, Matsubara H Bone marrow AT1 receptor augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitor cells in a platelet-derived SDF-1 α -dependent manner 第 16 回日本血管生物医学会 2008 年 12 月 5 日 金沢

- ② Yamada H, Yokoi H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Matsui A, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone Marrow AT1 Receptor Augments Neointima Formation by Promoting Mobilization of Smooth Muscle Progenitor Cells in Platelet-Derived SDF-1 α -dependent Manner. American Heart Association (米国心臓病学会) 2008 Nov8-12, New Orleans, USA

- ③ Tsubakimoto Y, Yamada H, Yokoi H, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin AT1 Receptor Regulates Differentiation of Monocyte/Macrophage-Lineage Progenitors from Hematopoietic Stem

Cells. American Heart Association (米
国心臓病学会) 2008 Nov8-12, New
Orleans, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：00240036

(2) 研究分担者

松原 弘明 (MATSUBARA HIROAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：10239072