

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008年度
 課題番号 19591681
 研究課題名 (和文) 頸動脈プラーク不安定機構に関わるプロテオグリカンの意義とその制御
 研究課題名 (英文) **Significance of proteoglycan in relation to oxidized low-density lipoprotein and plaque vulnerability**
 研究代表者 宇野 昌明 (UNO MASAOKI)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
 研究者番号：90322884

研究成果の概要：

頸動脈脈内膜剥離術の至適な施行時期を解析するため、発症後一週以内の急性期とそれ以後の慢性期に手術により摘出したプラークを免疫組織学的に安定性/不安定性プラークに分類した。さらにプラーク中の酸化 LDL およびマトリックスメタロプロテナーゼ-9 (MMP-9) の含有量や活性を測定し、免疫組織学的にこれらの局在を調べた。頸動脈狭窄症例の発症早期に酸化 LDL 含量や MMP-9 の活性が、慢性期に摘出したプラークに較べて上昇していることを明らかにした。さらに酸化 LDL のマクロファージへの取り込みに関与するプロテオグリカンである Decolin や Biglycan の発現量およびその局在を評価し、これらのプロテオグリカンが不安定なプラークに多く発現していることを認めている。またこれらの発現は酸化 LDL の増加と関連していた。従来、頸動脈脈内膜剥離術は症状の安定を待って1ヶ月以後に手術が施行されていた。しかし頸動脈狭窄症例では発症早期により強い酸化ストレスや炎症性変化があることを示した本研究結果から、発症早期に手術を行うことが妥当であることを示唆した。この研究から得た知見については Journal of Vascular Surgery に投稿し、受理された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：頸動脈病変、CEA、decorin、biglycan、HCII

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の成因として Low density Lipoprotein (LDL) の血管内膜細胞外マトリックスへの浸潤が重要な役割を果たす。血管内膜に浸潤した LDL は生理的条件下では不活性な monomer lipoprotein lipase (LPL) を介して proteoglycan (PG) である decorin や biglycan に強固に結合し蓄積する。また活性型の dimer LPL を介して OxLDL は biglycan に強固に結合し血管内膜に蓄積する。我々は粥状硬化性頸動脈狭窄症に対して有効性の高い治療法である頸動脈内膜剥離術 (CEA) 施行例の plasma および摘出した plaque 中の酸化 LDL (OxLDL) を、抗酸化 phosphatidylcholine 抗体 (DLH3) を用いて定量比較し、plaque 中で LDL の酸化が促進されることを示した。さらに不安定 plaque 症例において plasma および plaque 中の OxLDL が安定 plaque 症例より上昇していることを世界で初めて示した (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002, 22:1649-1654)。この論文はその後、多くの top journal で引用されている。また不安定性 plaque では OxLDL と SOD 活性が逆相関を示したことから plaque OxLDL 上昇は生体の酸化機構の活性化に抗酸化機能が対応不可能になり不均衡が生じていることを実証した (Uno et al. J Neurosurg 2005, 103:518-525)。

一方 *in vitro* 研究から collagen XVIII の蛋白分解産物である endostatin (ES) は LDL や OxLDL の biglycan への結合を抑制することが示され、collagen XVIII/ES の不足は plaque の新生血管を増加し、傷害された血管内皮機能によって LDL が内皮を通過して血管内膜に浸潤する割合を増加させると考えられている。また高脂血症治療薬である statin は *in vivo* 研究から proteoglycan の分子量を増加させるが LDL への結合能を低下するとされており、plaque 安定化や抗血栓性にも寄与すると考えられている。

2. 研究の目的

肝臓で合成される serin protease inhibitor である heparin cofactor II (HC II) は decorin や biglycan に結合し、抗 thrombin 活性を増大させる作用がある。血中 HC II 活性は血管内皮機能と関連があり、心血管 event の予知 marker になるとされる。また大動脈における動脈硬化巣

での HC II 活性の低下が示されており、脳梗塞患者でも血中 HC II 活性の低下が報告されている。これらの研究成果から動脈硬化巣での decorin, biglycan が OxLDL の結合によって修飾を受け HC II による抗 thrombin 活性が低下すると推察される。以上から decorin, biglycan の発現や構造変化および HC II 活性に及ぼす機能変化の mechanism を解明し、statin との関係を明らかにすることにより動脈硬化進展予防法や有効な治療法を構築できる可能性がある。また従来、頸動脈内膜剥離術は症状の安定を待って 1 ヶ月以後に手術が施行されていたが、どの時期での手術適応が妥当かについての根拠となる検討は行われていないため、頸動脈狭窄症例における発症早期と慢性期での酸化 LDL や MMP-9 および decorin, biglycan などの解析の比較を行い、手術適応時期の妥当性についても解析する。

3. 研究の方法

- ① 動脈硬化病変/非病変部位、プラークの安定性/不安定性と酸化 LDL, MMP-9, decorin, biglycan の発現や構造変化および機能の関連性についてインフォームドコンセントの得られた CEA 症例の plaque を用いて RT-PCR や western plot、免疫組織学的評価などにより解析する。さらに症候性/無症候性との関連性についても明らかにする。
- ② 上記の項目について発症早期の手術適応例と慢性期の手術例とで比較を行う。
- ③ Plaque 中の decorin biglycan の発現や構造変化と HC II 活性を解析し、血中 HC II にどのように反映されるかについて探求する。また、抗血栓性に関連すると考えられる biglycan の iduronic acid および disulfated disaccharide 含量について解析し、HC II 関与の抗 thrombin 活性との関係を明らかにする。
- ④ LPL, decorin, biglycan および HC II 活性と statin の関係について解析し、動脈硬化発症および進展の予防や治療法構築のための検討を行う。
- ⑤ またヒト平滑筋細胞を用いて statin の decorin biglycan に対する直接作用や thrombin 活性に対する作用を明らかにする。

4. 研究成果

動脈硬化病変/非病変部位、プラークの安定性/不安定性と酸化 LDL, MMP-9, decorin, biglycan の発現や構造変化および機能の関連性についてインフォームドコンセントの得られた CEA 症例の plaque を用いてプラーク中の酸化 LDL およびマトリックスメタロプロテナーゼ-9 (MMP-9) の含有量や活性を測定し、免疫組織学的にこれらの局在を調べた。頸動脈狭窄症例のプラークを安定性/不安定性とに分類し、酸化 LDL のマクロファージへの取り込みに関与するプロテオグリカンである Decolin や Biglycan の発現量およびその局在を評価し、これらのプロテオグリカンが不安定なプラークに多く発現していることを認めた。またこれらの発現は酸化 LDL の増加と関連していた。RT-PCR や western blot による解析でも同じ傾向がみられた。さらに症候性/無症候性との関連性についても調べたが、いずれも差が明確でなかった。プロテオグリカンの発現制御に関するメカニズムは明らかでないけれども、酸化 LDL の発現と相関がみられることから、酸化 LDL のマクロファージへの取り込みと関連して産生機構が活性化されると推察される。

さらに頸動脈脈内膜剥離術の至適な施行時期を解析するため、発症後一週間以内の急性期と、それ以後の慢性期に手術によって摘出したプラークを、免疫組織学的評価により、マクロファージの発現量を基に安定性/不安定性プラークに分類した。さらにプラーク中の酸化 LDL およびマトリックスメタロプロテナーゼ-9 (MMP-9) の含有量や活性を測定し、免疫組織学的にこれらの局在を調べた。頸動脈狭窄症例の発症早期に酸化 LDL 含量や MMP-9 の活性が、慢性期に摘出したプラークに較べて上昇していることを明らかにした。さらに酸化 LDL のマクロファージへの取り込みに関与するプロテオグリカン蛋白発現量およびその局在を評価した。従来頸動脈脈内膜剥離術は症状の安定を待って手術が施行されていた。しかし頸動脈狭窄症例では発症早期により強い酸化ストレスや炎症性変化があることを示した本研究結果から、発症早期に手術を行うことが妥当であることを示唆した。この所見については Journal of Vascular Surgery に投稿し、受理された。

さらにスタチン投与によりプラークが安定化するかどうかを酸化 LDL, MMP-9 活性およびプロテオグリカン蛋白発現量の変化を解析している。CEA 適応が決定した

症例に CEA 前日まで少なくとも 1 週間から 1 ヶ月スタチンを投与している。不安定性プラークでは酸化 LDL と β 2 glycoprotein 1 との複合物 (OxLDL/ β 2GP1) やプロテオグリカンの Decolin Biglycan およびが上昇しており、MMP-9 活性の上昇と相関がみられている。またスタチン投与例では OxLDL/ β 2GP1 および MMP-9 活性低下が観察されており、プロテオグリカンおよびビグリカンの発現を免疫組織学的および western blot 解析により OxLDL/ β 2GP1 および MMP-9 活性との関係を解析するためスタチン投与症例を追加しており、その解析を継続している。

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 15 件)

1. Yagi K, Kitazato KT, Uno M, Tada Y, Kinouchi T, Shimada K, Nagahiro S, Edaravone, a free radical scavenger, inhibits MMP-9-related brain hemorrhage in rats treated with tissue plasminogen activator, Stroke (査読有), 40: 626-631, 2009
2. Tamura T, Jamous MA, Kitazato KT, Yagi K, Tada Y, Uno M, Nagahiro S. Endothelial damage due to impaired NO bioavailability triggers cerebral aneurysm formation in female rats-Endothelial damage and cerebral aneurysm. J Hypertens (査読有) J Hypertens. 2009 Jun;27(6):1284-92 3.
3. Morita N, Harada M, Uno M, Matsubara S, Matsuda T, Nagahiro S, Nishitani H. Ischemic findings of T2*-weighted 3-tesla MRI in acute stroke patients. Cerebrovasc Dis. 2008;26(4):367-75. Epub 2008 Aug 27.
4. Liu H, Kitazato KT, Uno M, Yagi K, Kanematsu Y, Tamura T, Tada Y, Kinouchi T, Nagahiro S. Protective mechanisms of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan against cerebral ischemia: in-vivo and in-vitro studies, Journal of Hypertension (査読有), 26(7): 1435-1445, 2008
5. Morigaki R, Uno M, Matsubara S, Satoh K, Nagahiro S. Choreoathetosis due to rupture of a distal accessory anterior cerebral artery aneurysm. Cerebrovasc Dis. 2008;25(3):285-7. Epub 2008 Mar 7. (査読有)

6. Suzue A, Uno M, Kitazato KT, Nishi K, Yagi K, Liu H, Tamura T, Nagahiro S. Comparison between early and late carotid endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in relation to oxidized low-density lipoprotein and plaque vulnerability. *J Vasc Surg*. 2007 (査読有) Nov;46(5):870-5.
7. Uno M, Suzue A, Nishi K, Nagahiro S. Hemodynamic cerebral ischemia during carotid endarterectomy evaluated by intraoperative monitoring and post-operative diffusion-weighted imaging. *Neurol Res*. (査読有) 2007 Jan; 29(1): 70-7.
8. Nishi K, Uno M, Nagahiro S. Vascular reconstruction (chronic)-CEA, STA-MCA anastomosis, *Nippon Rinsho*. (査読無) 2006 Nov 28; 64 Suppl 8: 100-3.
9. Jamous MA, Nagahiro S, Kitazato KT, Tamura T, Aziz HA, Shono M, Satoh K, Endothelial injury and inflammatory response induced by hemodynamic changes preceding intracranial aneurysm formation: experimental study in rats, *J. Neurosurg* (査読有), 107: 405-411, 2007
10. Morigaki R, Uno M, Suzue A, Nagahiro S. Hemichorea due to hemodynamic ischemia associated with extracranial carotid artery stenosis. Report of two cases. *J Neurosurg*. (査読有) 2006 Jul;105(1):142-7.
11. Toi H, Uno M, Nagahiro S. Surgical indication and selection of surgical procedure for hypertensive subcortical hemorrhage, *Nippon Rinsho*. (査読無) 2006 Nov 28; 64 Suppl 8:436-41.
12. Yamasaki H, Matsubara S, Sasaki I, Nagahiro S. Retinal artery embolization during carotid angioplasty and carotid artery stenting: case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* (査読有) 2009 May;49(5):213-6.
13. Okazaki T, Kageji T, Matsuzaki K, Horiguchi H, Hirose T, Watanabe H, Ohnishi T, Nagahiro S. Primary anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma with widespread neuroaxis dissemination at diagnosis—a pediatric case report and review of the literature. (査読有) *J Neurooncol*. 2009 Mar 27.
14. Sako W, Goto S, Shimazu H, Murase N, Matsuzaki K, Tamura T, Mure H, Tomogane Y, Arita N, Yoshikawa H, Nagahiro S, Kaji R. Bilateral deep brain stimulation of the globus pallidus internus in tardive dystonia. *Mov Disord*. (査読有) 2008 Oct 15; 23(13): 1929-31.
15. Sato K, Sumi-Ichinose C, Kaji R, Ikemoto K, Nomura T, Nagatsu I, Ichinose H, Ito M, Sako W, Nagahiro S, Graybiel AM, Goto S. Differential involvement of striosome and matrix dopamine systems in a transgenic model of dopa-responsive dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (査読有) 2008 Aug 26; 105(34): 12551-6.

[学会発表] (計 3 件)

1. Uno M, Yagi K, Kitazato KT, Tada Y, Nagahiro S. Edaravone, a free radical scavenger, inhibits MMP-9 related brain hemorrhage in rats treated with tissue plasminogen activator, Xth International Symposium on Thrombolysis and Acute Stroke Therapy. 2008.9.21-23, Budapest, Hungary.
2. Uno M, Yagi K, Kitazato KT, Tada Y, Kinouchi T, Tamura T, Nagahiro S. EDARAVONE, A FREE RADICAL SCAVENGER, INHIBITS MMP-9-RELATED BRAIN HEMORRHAGE IN RATS TREATED WITH TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR. 6th World Stroke Congress, 2008.9.24-27, Vienna, Austria
3. Kitazato KT, Uno M, Yagi K, Liu H, Tamura T, Tada Y, Kinouchi T, Shimada K, Nagahiro S. SYSTEMIC- AND FOCAL EFFECTS OF CANDESARTAN AGAINST CEREBRAL ISCHEMIA, 6th World Stroke Congress, 2008.9.24-27, Vienna, Austria

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 昌明 (UNO MASA AKI) ・徳島大学 ・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 ・准教授 ・研究者番号：90232884

(2) 研究分担者

永廣 信治 (NAGAHIRO SHINJI) ・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：60145315

松原 俊二 (MATSUBARA SHUNJI) ・徳島大学 ・医学部 ・歯学部附属病院 ・講師 ・研究者番号：60294675

西 京子 (NISHI KYOKO) ・徳島大学 ・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 ・講師 ・研究者番号：60335817

(3) 連携研究者

無し