

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700366
 研究課題名 (和文) ApoE 欠損マウスを用いたプラーク破綻モデルのメカニズム解明
 - 炎症反応との関連性
 研究課題名 (英文) The mechanism of atherosclerotic plaque disruption in apoE-deficient mice. The concept of the involvement of inflammation.
 研究代表者
 佐々木 健 (SASAKI TAKESHI)
 浜松医科大学 技術部 技術専門職員
 研究者番号：20397433

研究成果の概要：心筋梗塞や脳梗塞は、血管の肥厚内膜が破れるプラーク破綻(破裂)が引き金になるとされているが、このプラーク破綻のメカニズムは不明のままである。研究代表者の佐々木は、マウスを用いたプラーク破綻モデルを作成し、そのメカニズムの解明を試みた。その結果、このマウスモデルにおけるプラーク破綻には、病変部に集積する炎症細胞(マクロファージ、好中球等)と、それらの細胞が放出するプロテアーゼが重要であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：プラーク破綻、動脈硬化、炎症性細胞、細胞外マトリックス、MMPs

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化巣における不安定プラークの破綻に伴う閉塞性血栓の形成は、心筋梗塞や脳梗塞などの極めて重篤な疾患の引き金となることが知られているが、このプラーク破綻のメカニズムは依然として不明な部分が多い。その一因として、プラーク破綻に関する研究を行なう上での有効な疾患モデル動物が知られていなかったことが挙げられる。最近、研究代表者らは ApoE 欠損マウスにおいてプラーク破綻を誘起する簡便なモデル手技を発見し、このプラーク破綻モデルの病理像はヒトのプラーク破綻のものと幾つかの点で類似していることを報告した。その後、研究代表者は本モデルを用いて更なる研究

を加え、炎症性細胞やその炎症細胞由来のプロテアーゼが本モデルのプラーク破綻に関与している可能性を示唆する知見を得た。

2. 研究の目的

上述の背景に基づき、本研究では先に研究代表者が報告した「ApoE 欠損マウスを用いたプラーク破綻モデル(Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006)」を用い、そのプラーク破綻メカニズムを炎症性細胞とそのプロテアーゼの関与に焦点を当てて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本モデルのプラーク破綻に関与する炎症性細胞とプロテアーゼの検討を、組織学的手法と分子生物学的手法により解析した。

(2) プラーク破綻における好中球の関与を組織学的手法により解析した。

(3) 本モデルのプラーク破綻に対する薬剤 (Fluvasutatin) の効果を、本モデルマウスに薬剤を投与し、その病変部を解析した。

4. 研究成果

(1) 本プラーク破綻モデルにおいて、炎症性細胞であるマクロファージ、好中球、T 細胞の破綻部位への浸潤が確認された (図 1)。

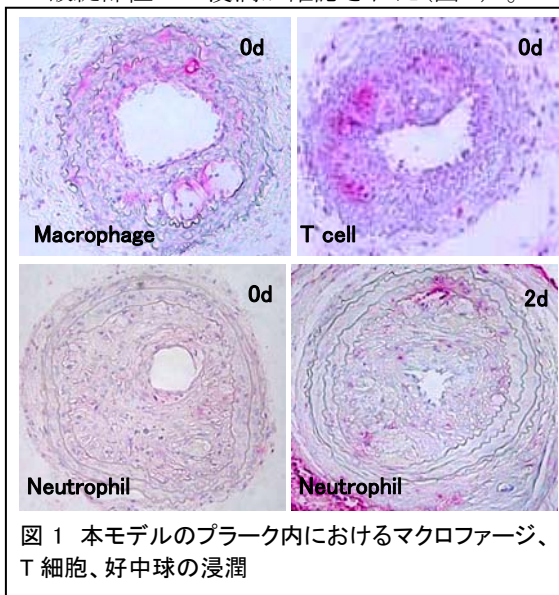


図 1 本モデルのプラーク内におけるマクロファージ、T 細胞、好中球の浸潤

(2) マクロファージや好中球由来の MMP-8、-9 の発現が観察され、それらはプラーク破綻に伴って上昇していた (図 2-4)。

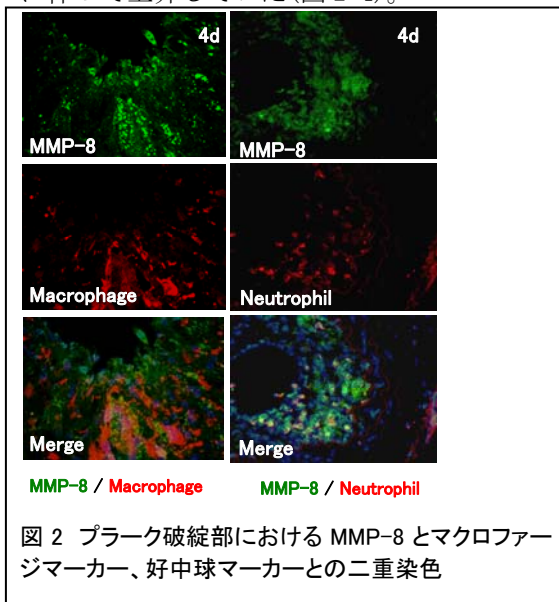


図 2 プラーク破綻部における MMP-8 とマクロファージマーカー、好中球マーカーとの二重染色

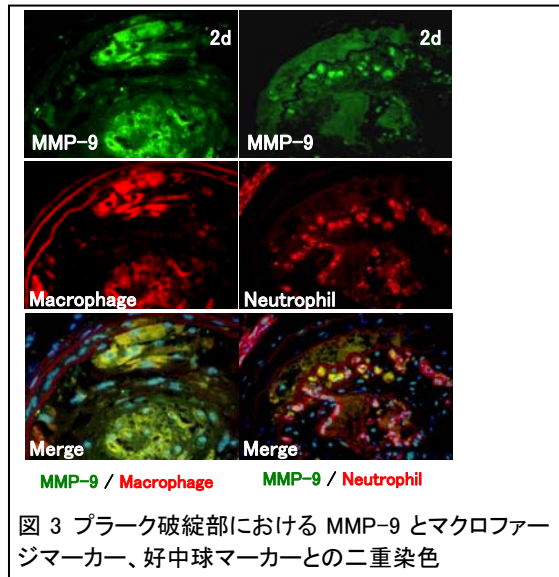


図 3 プラーク破綻部における MMP-9 とマクロファージマーカー、好中球マーカーとの二重染色

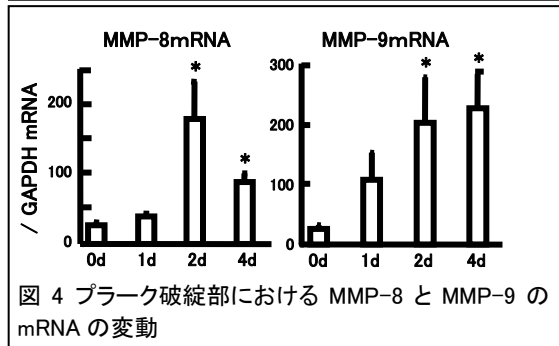


図 4 プラーク破綻部における MMP-8 と MMP-9 の mRNA の変動

(3) また、本モデルのプラーク破綻部における好中球浸潤は、プラーク破綻に伴い有意に上昇した (図 5)。

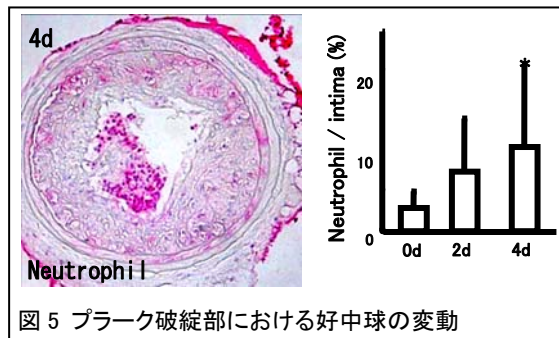


図 5 プラーク破綻部における好中球の変動

(4) 本モデルにコレステロール低下作用薬であるスタチン (Fluvasutatin, 10mg / kg 体重) を投与すると、血中脂質濃度とは関係なく、プラーク破綻が有意に抑制された (表 1)。

	n	Disruption	No disruption	
			Hemorrhage	No hemorrhage
Fluvasutatin	25	24.0 (6)	36.0 (9)	40.0 (10)
Control	18	55.5 (10)	38.9 (7)	5.6 (1)

表 1 本モデルにおける Fluvasutatin によるプラーク破綻抑制効果

(5)また、これによって好中球の浸潤や MMP-9 の発現も抑制された(図 6-7)。

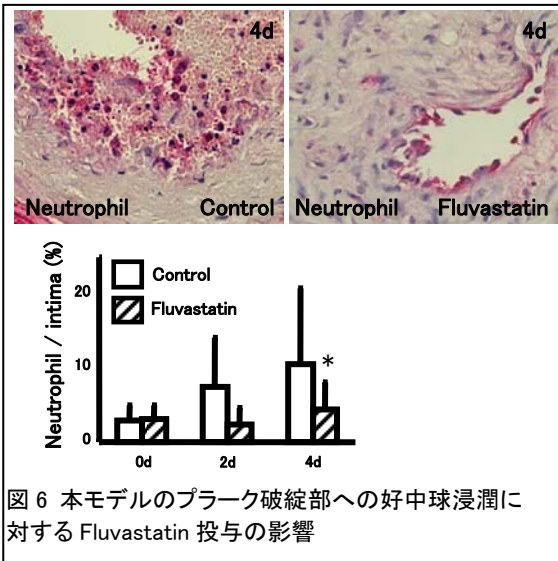


図 6 本モデルのプラーク破綻部への好中球浸潤に対する Fluvastatin 投与の影響

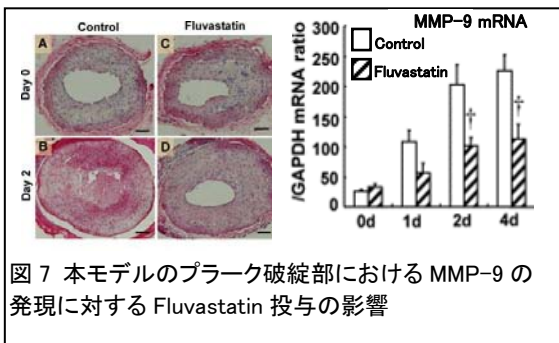


図 7 本モデルのプラーク破綻部における MMP-9 の発現に対する Fluvastatin 投与の影響

(6)さらに、プラーク破綻に伴って引き起こされたプラーク内のコラーゲン量の減少は、Fluvastatin の投与により有意に抑制された(図 8)。

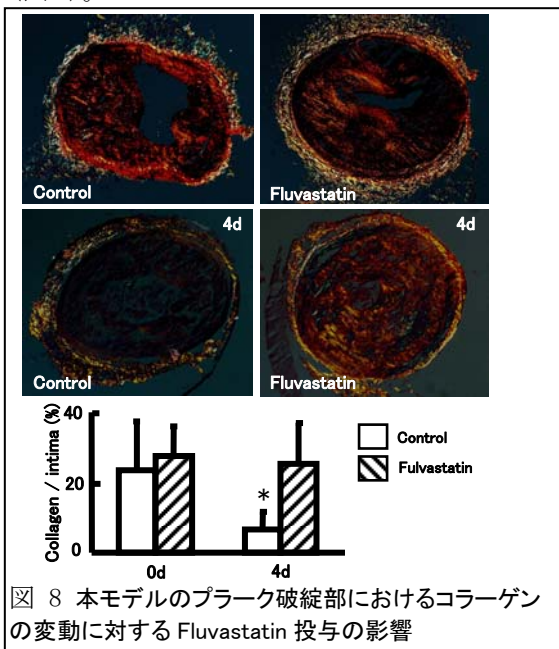


図 8 本モデルのプラーク破綻部におけるコラーゲンの変動に対する Fluvastatin 投与の影響

(7)以上の研究結果をまとめると、本モデルにおけるプラーク破綻において以下のような機序が考えられる。

- ①マクロファージや好中球をはじめとする炎症性細胞がプラーク内に浸潤、集簇する。
- ②これら炎症性細胞が活性化され、MMP-8 や MMP-9 をはじめとするプロテアーゼを産生、分泌する。
- ③プラークの安定性を保つ細胞外マトリックス(コラーゲンなど)が、この炎症性細胞より分泌されたプロテアーゼにより分解される。
- ④その結果、プラークの脆弱化が引き起こされ、プラーク破綻に至る。

(8)また、本研究ではプラーク破綻を抑制する薬剤の検証として、脂質低下作用薬である Fluvastatin の投与を行った。その結果、Fluvastatin はコレステロール低下作用とは別に、本動物モデルにおけるプラーク破綻を抑制した。その作用機序として、好中球の浸潤抑制効果、MMP-9 の発現抑制、さらに細胞外マトリックス成分(コラーゲン)の保持が考えられた。加えて、現在アンギオテンシンレセプター拮抗薬である Olmesartan を用いた検討も行っており、本研究成果は論文として発表準備中である。

(9)本研究結果は、事項に記載するような論文、学会発表、図書等で公表された。特に、代表者らの発表論文(Atherosclerosis, 2009)は、本モデル動物を用いた世界で初めての研究発表である。また、本研究成果は、研究会賞(名古屋 Metabolic Syndrome 研究会 研究奨励賞)を受賞するに至るなど、高い評価を得ている。

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 7 件)

1). Nakamura K, Sasaki T, Cheng XW, Iguchi A, Sato K, Kuzuya M
Statin prevents plaque disruption in apoE-knockout mouse model through pleiotropic effect on acute inflammation. Atherosclerosis (2009, in press) [査読有]

2). Suzuki T, Sasaki T, Takagi H, Sato K, Ueda K
The effectors responsible for gastrointestinal nematode parasites, *Trichinella spiralis*, expulsion in rats. Parasitol Res 103, 1289-1295 (2008) [査読有]

3). Cheng XW, Murohara T, Kuzuya M, Izawa H, Sasaki T, Obata K, Nagata K, Nishizawa T, Kobayashi M, Yamada T, Kim W, Sato K, Shi GP, Okumura K, Yokota M. Superoxide-dependent cathepsin activation is associated with hypertensive myocardial remodeling and represents a target for angiotensin II type I receptor blocker treatment. *Am J Pathol* 173, 358-369 (2008) [査読有]

4). Iwata Y, Suzuki K, Wakuda T, Seki N, Thanseem I, Matsuzaki H, Mamiya T, Ueki T, Mikawa S, Sasaki T, Suda S, Yamamoto S, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Nakamura K, Sato K, Takei N, Hashimoto K, Mori N. Irradiation in adulthood as a new model of schizophrenia. *PLoS ONE*. 3, e2283 (2008) [査読有]

5) Kuzuya M, Sasaki T Neointimal cracks (plaque rupture?) and thrombosis in wrapped arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 252 (2007) [査読有]

6) Sasaki T, Nakamura K, Kuzuya M Plaque rupture model in mice. *Methods Mol Med*, Humana Press, 139, 67-76 (2007) [査読有]

7) Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N, Kondo T, Jin H, Numaguchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, Murohara T Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice. *Circ Res* 100, 904-913 (2007) [査読有]

[学会発表] (計 15 件)

1) 佐々木健、中村香江、成憲武、林泰壽、増田陽子、佐藤康二、葛谷雅文
ApoE 欠損マウスにおけるアテロームプラークの脆弱化に対する olmesartan の効果とその作用機序
第 5 回名古屋 Metabolic Syndrome 研究会
2009 年 2 月 27 日 ホテルグランコート名古屋

2) Cheng XW, Okumura K, Kuzuya M, Inoue A, Sasaki T, Nakamura K, Song H, Li P, Nagata K, Sato K, Murohara T. Azelnidipine Enhances Beneficial Effects

of Olmesartan on Left Ventricular Remodeling During the Development of Hypertension-induced Heart Failure
第 31 回日本高血圧学会総会日中高血圧シンポジウム 2008 年 10 月 9-10 日 札幌

3) 中村香江、佐々木健、成憲武、佐藤康二、井口昭久、葛谷雅文
動物モデルを用いたアテロームプラーク破綻に対するオルメサルタンの破綻抑制効果とその作用機序
第 40 回日本動脈硬化学会総会 2008 年 7 月 10-11 日 つくば国際会議場

4) 井上愛子、成憲武、中村香江、佐々木健、奥村健二、室原豊明、葛谷雅文
高齢マウスにおける虚血性血管新生低下機序に関して
第 40 回日本動脈硬化学会総会 2008 年 7 月 10-11 日 つくば国際会議場

5) 成憲武、葛谷雅文、奥村健二、井上愛子、中村香江、佐々木健、金ウエン、室原豊明
Mechanisms Underlying the Impairment of Ischemia-induced Neovascularization in Aging Mice: the Pivotal Role for Matrix-Metalloproteinase-2
第 72 回日本循環器学会学術集会、2008 年、3 月 28-30 日、福岡国際会議場

6) 成憲武、葛谷雅文、中村香江、奥村健二、井上愛子、佐々木健、室原豊明
Treatment of ApoE-Deficient Mice with Statin Inhibits the Oxidative Stress-dependent Lysosomal Protease Cathepsin Activation System: Implication for Plaque Stability
第 72 回日本循環器学会学術集会、2008 年、3 月 28-30 日、福岡国際会議場

7) 中村香江、佐々木健、成憲武、井口昭久、佐藤康二、葛谷雅文
動物モデルを用いたアテロームプラーク破綻に対するオルメサルタンの破綻抑制効果とその作用機序
第 4 回名古屋 Metabolic Syndrome 研究会、2008 年、2 月 22 日、ホテルグランコート名古屋

8) 佐々木健、岡田聡、笹田久美子、中村香江、成憲武、鈴木亨、井口昭久、佐藤康二、葛谷雅文
血管の石灰化における Matrix metalloproteinase-2 の関与
第 15 回日本血管生物医学会、2007 年、11 月 29-30 日、九州大学医学部

9) 中村香江、佐々木健、成憲武、井口昭久、葛谷雅文

動物モデルを用いたアテロームプラーク破綻に対するオルメサルタンの破綻抑制効果とその作用機序

第15回日本血管生物医学学会、2007年、11月29-30日、九州大学医学部

10) Cheng XW, Okumura K, Kuzuya M, Nagata K, Obata K, Inoue K, Sasaki T, Nishizawa T, Izawa H, Yamata T, Kobayashi M, Murohara T, Yokota M.

Superoxide-Dependent Activation of Cysteine Protease Cathepsin System is Associated with Hypertensive Myocardial Remodeling and Represents a Target for Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Therapy.

American Heart Association, Scientific Sections 2007年、11月4-7日 Orlando, Florida

11) 佐々木健

実験動物を用いた疾患モデル作成術

①閉塞性血栓形成モデル ②粥状動脈硬化巣破綻モデル

東海・北陸地区国立大学法人等技術職員合同研修会、2007年、9月5-7日、浜松医科大学

12) 佐々木健、笹田久美子、岡田聡、中村香江、成憲武、井口昭久、佐藤康二、葛谷雅文
動脈硬化巣の石灰化における Matrix metalloproteinase-2 の関与

第39回日本動脈硬化学会総会、2007年、7月13-14日、大阪国際会議場

13) 中村香江、佐々木健、井口昭久、葛谷雅文

アテロームプラーク破綻動物モデルを用いたフルバスタチンのプラーク破綻に及ぼす効果

第39回日本動脈硬化学会総会、2007年、7月13-14日、大阪国際会議場

14) 成憲武、葛谷雅文、井上愛子、中村香江、佐々木健、奥村健二、室原豊明

Mechanisms Underlying the Impairment of Ischemia-induced Neovascularization in MMP-2-deficient Mice.

第39回日本動脈硬化学会総会、2007年、7月13-14日、大阪国際会議場

15) Maruyama Y, Mikawa S, Sasaki T, Hotta Y, Sato K

BMP4 Expression in the Developing Rat Retina.

ARBO 2007 ANNUAL MEETING、2007年、

6月24-26日、Boston, Massachusetts

〔図書〕(計1件)

佐々木健、葛谷雅文

プラーク破綻モデル：血栓症・動脈硬化モデル動物作製法 p115-123、金芳堂、2007年

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

①研究会賞

第3回名古屋メタボリックシンドローム研究会 研究奨励賞

②報道関連情報

学会ダイジェスト：血管生物医学学会

「オルメサルタンは好中球を解してアテロームプラーク破綻を抑制」 日経メディカルオンライン 2007年11月30日

<https://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/all/gakkai/jvbmo2007/200711/504929.html>

③ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/wla/anal/index-j.html>

http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGL_OBAL_ID=200901097957904310&t=1&d=1&q=5000080806

<http://kaken.nii.ac.jp/ja/r/20397433>

<http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/19700366>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 健 (SASAKI TAKESHI)

浜松医科大学・技術部・技術専門職員

研究者番号：20397433

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

葛谷 雅史 (KUZUYA MASAFUMI)

名古屋大学大学院・医学系研究科・准教授

研究者番号：10283441

成 憲武 (CHENG XIAN WU)
名古屋大学・医学部・講師
研究者番号 : 30378228

中村 香江 (NAKAMURA KAE)
ミシガン大学・Cardiovasc center・研究員

鈴木 亨 (SUZUKI TOHRU)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 10362188