

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500400

研究課題名（和文）粥状硬化発症および発症阻止機構における血管壁細胞の動態

研究課題名（英文）Cellular response in preventing or inducing atherosclerosis

研究代表者

三俣 昌子 (MITSUMATA MASAKO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40064589

研究成果の概要（和文）：**第一**に血流下における内皮の増殖と粥状硬化発症の関連を検討した。層流性ずり応力に比べ乱流性ずり応力は内皮の増殖と単球接着を増加させた。内皮の増殖を抑制する p21^{Sdi/Cip/Waf1} (p21) は乱流による単球接着増加、内皮の TXNIP, VCAM-1, CCL5, CXCL10, L-selectin 発現を抑制した。血流下で p21 は単独で、または内皮の増殖抑制を介して、内皮のレドックスバランスを抗酸化状態へ導き、接着や遊走因子発現を阻止し、単球接着を抑制して抗粥状硬化性に作用すると思われる。**第二**に、粥状硬化発症への歯周病菌 (Pg) の関与を検討した。ヒト大動脈の Atheroma のマクロファージに Pg 由来 r40kDa 蛋白が存在し、Fatty streak, DIT、冠動脈の Atheroma には認めなかった。Pg 由来 LPS で刺激した単球の培養上清は内皮の TLR2 mRNA を発現させ好炎症性に作用した。

研究成果の概要（英文）：**1.** We examined the role of p21^{Sdi/Cip/Waf1} (p21), a growth inhibitor induced by laminar shear stress (LS), in monocyte adhesion to endothelial cells (ECs). Both EC proliferation and monocyte adhesion induced by disturbed shear stress (DS) were inhibited by p21-overexpression. p21-overexpression significantly suppressed the DS-induced expression of thioredoxin interacting protein, vascular cell adhesion molecule and chemokines, indicating that p21 may function to prevent atherogenesis by regulating the redox balance, which leads to the inhibition of adhesion molecule expression in ECs under LS. **2.** Porphyromonas gingivalis (Pg) protein (Pg-r40kDa) was detected mainly in macrophages in 72-82% of human aortic atheromas, but not Fatty streak, DIT and coronary atheromas. Conditioned medium from macrophages stimulated with Pg-LPS induced the expression of TLR2 mRNA in ECs, indicating that Pg induces atherosclerosis, regulating the inflammatory cross talk between ECs and macrophages

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環器病理

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：粥状硬化、内皮細胞、増殖、単球接着、p21^{sdi/cip/waf1}、thioredoxin interacting protein、Porphyromonas gingivalis、Toll-like receptor (TLR)2

1. 研究開始当初の背景

(1) われわれの観察では、日本人若年者(16歳以下)の脂質沈着の95%、plaqueの72%以上が血流の剥離や乱れが生じる血管分岐入口部の半径5mm以内の領域に初発し、層流性定常流に暴露される非分岐部には病変を見つけ難かった。すなわち、層流は**抗**粥状硬化性に、乱流は逆に**好**粥状硬化性に作用する事を示唆する。よって、われわれは異なる血流パターンが作り出す微小環境の違いが粥状硬化の発生・進展・退縮・粥腫破綻の全てを左右すると考え、その微小環境形成機構を解明することが粥状硬化発症を予防する手段を生み出すと考え研究してきた。その結果、内皮細胞(内皮)の形態・細胞-細胞外基質の接着・単球接着・細胞外基質産生と分解・増殖・アポトーシスに關与する多数の遺伝子・蛋白の発現を層流性定常流性ずり応力(層流性ずり応力)が調節することを *in vivo* および *in vitro* で証明した。これら層流性ずり応力により誘導される因子の殆どは粥状硬化の発生に抑制的に働く。一方、血流の剥離や乱流が生じる血管分岐部に粥状硬化が初発する機構はまだ解明されていない。

(2) 歯周病は粥状硬化の発症と進展を促進し、心筋梗塞の発症に關与すると推測されている。歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)の16sRNAは粥状硬化病巣に見つかっているが、歯周病菌蛋白の証明は殆どなされていない。更に、歯周病菌による粥状硬化発症のメカニズムは全く解っていない。

2. 研究の目的

粥状硬化の発生・進展・退縮のメカニズムを解明してその予防法、病変評価法、治療法の開発に寄与することを目的とする。相反する流れ(層流 vs 乱流)による粥状硬化促進または阻止微小環境形成のメカニズムを検討するために、層流または乱流下における;

(1) 内皮の増殖の変化が粥状硬化の発症に關与すると仮定し、これを証明し、そのメカニズムを検討した。内皮への単球接着は粥状硬化発症のファーストステップである。われわれの *in vivo* 観察では増殖内皮細胞数および内皮へ接着した単球数は共に、層流に曝される血管非分岐部(粥状硬化発生抵抗部位)に比べ剥離・乱流領域の分岐入口部(粥状硬化好発部位)において2倍高かった。また、*in vitro* では、層流性ずり応力は p21^{sdi/cip/waf1}(p21)—cdks—pRb を介して培養内皮を細胞周期のG0/G1に停止させた。よって、二つの異なる流れ(層流 vs 乱流)下で、遺伝子導入または siRNA による内皮の p21 発現調節が内皮の増殖を調節すると同時に内皮への単球接着も調節して粥状硬化発症を

左右すると仮定し、これを証明し、そのメカニズムも検討した。

(2) Pg が内皮の機能を変化させ、その結果粥状硬化が発症・進展すると仮定し、そのメカニズムを検討した。

3. 研究の方法

(1) **内皮の増殖と粥状硬化発症との関連** : 層流と乱流が作り出すずり応力は、角度の異なる円錐形の cone plate 式血流負荷装置を用いて作成し、培養ヒト臍帯静脈内皮を層流または乱流性ずり応力に暴露した。増殖は ³H-thymidin の細胞内への取り込み量を測定した。遺伝子の網羅的解析は microarray を用いて解析し、遺伝子と蛋白の発現は PCR, Western blotting と免疫染色を用いて検討した。内皮への単球接着は培養内皮の上に単球(THP-1)を載せて両者を共培養後に接着単球数を顕微鏡下で数えた。

(2) **Pg と粥状硬化発症の関連機構** : 最初に、Pg の外膜蛋白である r40kDa 蛋白に対する特異抗体とプライマーを用いて、ヒト大動脈、冠状動脈病巣における蛋白発現と遺伝子発現を Western blotting、抗マクロファージ抗体(CD68)と抗 r40k 抗体を用いた二重免疫染色法、PCR 法で検討した。検体は、大動脈が 45 症例 57 検体でそのうち Atheroma が 17 症例 25 検体、Fatty streak が 13 症例 17 検体、DIT が 15 症例 15 検体である。冠動脈は 21 症例 45 検体である。

粥状硬化の発症および進展には炎症反応が關与する。この炎症反応の伝達因子として自然免疫受容体である Toll-like receptors (TLRs) が注目されている。Pg による単球の活性化が内皮機能を変化させて粥状硬化を発症または進展する事を証明するために、Pg 由来 LPS で THP-1 を刺激し、その培養上清で内皮を刺激した。その後、内皮が発現する TLR2, 4 mRNA 発現を PCR で調べた。LPS 刺激により THP-1 が培養上清に分泌するサイトカインを Bio-Plex サイトカインアッセイ法で調べた。

4. 研究成果

(1) **内皮の増殖と粥状硬化発症との関連** : 層流に比べ乱流は内皮の増殖と単球接着を共に増加させたが、この乱流による増殖と単球接着増加は共に内皮の増殖を抑制する p21 遺伝子の導入により抑制された(図1)。この結果は p21 単独、あるいは p21 による内皮の増殖抑制が内皮への単球接着を抑制する可能性を示唆する。しかし、p21 発現と内皮への単球接着との関連や、内皮増殖と内皮への単球接着の関連機構に關する報告は全くない。

この関連の有無およびその機構を調べるために我々は遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、内皮の増殖と単球接着をリンクする候補因子として Thioredoxin interacting protein (TXNIP)、Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5)、Chemokine (C-XC motif) ligand 10 (CXCL10)、Selectin L (SELL)が見つかった。TXNIP は抗酸化作用の強い Thioredoxin (TRX)と結合してその機能を抑制して微小環境を酸化方向へ導く。内皮の TXNIP mRNA と蛋白発現は増殖の高い乱流性ずり応力下で高く、増殖の低い層流性ずり応力下では低かった。この層流と乱流の TXNIP mRNA 発現の差は SiRNA で内皮の p21 発現を抑制して内皮の増殖を回復すると消失した。さらに、乱流による内皮の TXNIP mRNA と蛋白発現誘導は遺伝子導入による p21 強発現によって有意に抑制された。以上の結果は、①内皮の増殖は内皮のレドックスバランス機構に影響を及ぼす事、②p21 は直接、または内皮の増殖抑制機能を介して間接的に内皮のレドックスバランスに影響を与える事、③この機構に TXNIP 発現調節が関与する事を示唆する。

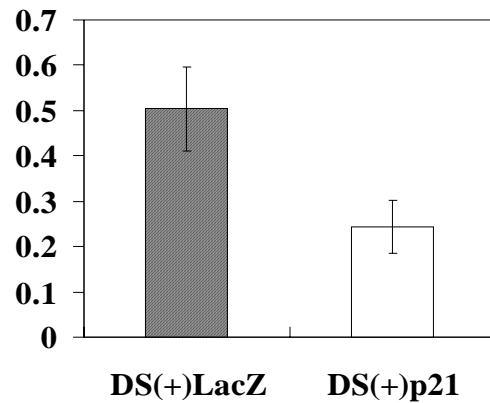
TXNIP は MAP3K を介して内皮の VCAM-1 発現を誘導すると報告されている。我々の実験では、乱流による内皮の VCAM-1 発現誘導は p21 遺伝子導入により有意に抑制された。

以上の結果から以下の事が考えられる。層流下においては、内皮に p21 が発現しているのので、この p21 が直接、または内皮の増殖抑制作用を介して間接的に TXNIP 発現を抑制して内皮のレドックスバランスを抗酸化状態に維持し、その結果内皮の VCAM-1 発現が抑制されて、内皮への単球接着が阻止され、血管壁微小環境は抗粥状硬化性となる。しかし、乱流下においては、p21 による前述の機構が働かず、TXNIP が発現して内皮細胞は酸化状態になり、内皮は VCAM-1 を発現して単球を接着させ、粥状硬化へ進むと思われる。

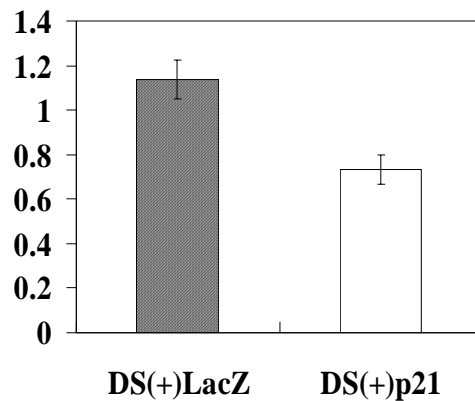
CCL5, CXCL10, SELL は病巣への白血球遊走を媒介するが、乱流下内皮のこれらの発現も p21 導入で抑制された。上記 VCAM-1 と CCL5 発現は酸化状態で亢進すると考えられている。よって我々の結果は、p21 または p21 による増殖抑制は内皮の TXNIP 発現を抑制し、TRX 作用を亢進させて微小環境を抗酸化状態に変え、その結果、内皮の接着因子発現や白血球遊走因子分泌を抑えて単球接着を抑制する事を示唆する。以上の p21 の作用機構は我々が始めて明らかにし、論文で報告した。

図 1

^3H -thymidin uptake



Monocyte adhesion



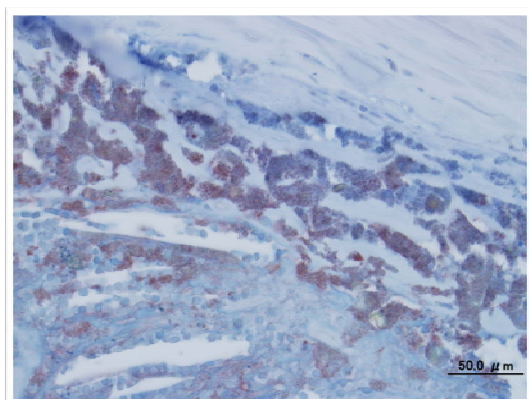
DS:乱流、(+):TNF-alpha 添加、LacZ:対照遺伝子

(2) Pg と粥状硬化発症の関連機構 :

①歯周病菌蛋白がヒト粥状硬化病巣に存在するか否を検討 ; Pg 外膜に局在する r40kDa 蛋白 (r40K) は Pg の生存に必要な Hemin 結合活性を有し、他に thioredoxin 活性、上皮細胞表面への接着能などを有して Pg の重要な機能を担う。この r40K に対する特異抗体を用いて Pg がヒト粥状硬化に存在するか否かを検討した。二重染色の結果、1) Pg 由来 r40K は主にマクロファージの細胞質に存在した(図 2)。2) ギムザ染色でマクロファージの脂質はメタクロマジーを呈して青く染色される。脂質を含有するマクロファージと脂質を含有しないマクロファージが共に r40K を含有した。3) Atheroma は高頻度に r40K を認め、14/17 症例 (82%) , 18/25 検体 (72%) に陽性反応を見た。4) マクロファージの少ない線維の多い硬い Atheroma には r40K は認めない傾向を示し、柔らかい Atheroma に多い傾向を見た。5) r40K は 30 歳以下では認めず、40 歳以上で出現し、80

歳までは加齢とともに発現頻度と強さが増加した。6) Fatty streakにはr40Kは認めがたく、存在しても土程度であった。7) DITにはr40Kは認めなかった。8) 冠動脈の粥状硬化にはr40Kは認めず、同一人物において大動脈の粥状硬化にr40Kを認めても、また冠動脈にCD68陽性のマクロファージを認めてもr40Kは認めなかった。9) Western blottingではr40kDa蛋白は認めなかったが、一人のAtheromaに37kDaと44kDa蛋白を認めた。また、AtheromaとDITの検体8個全部に50kDaの蛋白を認めた。これらの蛋白発現の意味は現在まだ解らない。10) DIT, Fatty streak, Atheromaを含む13検体全部にPgのr40K遺伝子および16s rRNAを認めなかった。

図2：ヒト大動脈粥状硬化におけるPg-r40kDa蛋白の存在



青：Pg-r40K, 赤：CD68

②Pgにより活性化した単球の内皮への作用；1) Pg-LPS(1-2 microgram/ml)で培養内皮を24時間刺激すると内皮のTLR4 mRNA発現が軽度に進んだが、TLR2 mRNAは発現が誘導されなかった。2) しかし、Pg-LPSで6時間THP1を刺激してその培養液中で内皮を3,6時間培養すると内皮のTLR2 mRNAが有意に発現した。対照としてTHP1 conditioned mediumではなく、Pg-LPSのみを添加した通常の培養液、またはPg-LPS無添加の培養液で内皮を培養した。3) Pg-LPSでTHP1を刺激後、その培養液を捨て、THP1をPBSで3回洗ってPg-LPSを除去した。その後このTHP1を通常の培養液で6時間培養後、この培養液で内皮を培養して内皮のTLR2 mRNA発現を調べた。対照はPg-LPSで刺激しないTHP1細胞の培養液を用いた。この結果、内皮のTLR2 mRNAが発現した。以上の結果は、Pg-LPS刺激によってTHP1は何らかの物質を産生して培養液に分泌し、その物質が内皮を刺激してTLR2 mRNAを発現させた事を示唆する。そこで、内皮にTLR2 mRNAを発現させる物質

が、Pg-LPSで刺激したTHP1の培養液中に存在するか否かをBio-Plexサイトカインアッセイ法で網羅的に検討した。培養液中にはIL-8, IFN gamma, MCP-1, MIP-1bが高濃度にTHP1から分泌されていた。

以上の結果は、Pg-LPSは単独では内皮のTLR2 mRNAを発現させないが、Pg-LPSで刺激されたマクロファージが分泌するサイトカインは内皮にTLR2 mRNAを発現させる可能性を示唆する。

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1件)

- ①Hiyo Obikane, Yoshimitsu Abiko, Hikaru Ueno, Yoshiaki Kusumi, Mariko Esumi, Masako Mitsumata: Effect of endothelial cell proliferation on atherogenesis: A role of p21^{Sdi/Cip/Waf1} in monocyte adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis*, 査読有、Vol212、2010、pp116-122.

[学会発表] (計7件)

- ①高橋理恵、三俣昌子(発表者)他、：歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis*)はヒト粥状硬化に存在するか？第100回日本病理学会総会、2011年4月28-30日、横浜。
- ②楠美嘉晃(発表者)、三俣昌子他：歯周病菌*Porphyromonas gingivalis*(PG)由来LPSと動脈硬化—ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のTLR2の発現。第100回日本病理学会総会、2011年、4月28-30日、横浜。
- ③楠美嘉晃、江角真理子、三俣昌子他：歯周病菌*Porphyromonas gingivalis*由来LPSと動脈硬化—内皮細胞TRL受容体の発現—。第15回血管病理研究会。2010年、10月23日、東京都。
- ④三俣昌子、安孫子宜光他：歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis*)はヒト粥状硬化に存在するか？学術フロンティア推進事業年次発表会、2010年、10月23日、松戸。
- ⑤H Obikane, Y Abiko, H Ueno, N Fukuda, T Matsumoto, M Mitsumata: Correlation of endothelial proliferation with monocyte adhesion under laminar or disturbed shear stress. XV International Symposium on Atherosclerosis, 2009年、6月14-16日、Boston。
- ⑥Hiyo Obikane, Yoshimitsu Abiko, Hikaru Ueno, Yoshiaki Kusumi, Noboru Fukuda, Taro Matsumoto, Mariko Esumi, Tatsuo Yamamoto, Masako Mitsumata: Correlation of endothelial proliferation with

monocyte adhesion under laminar or disturbed shear stress. The 14th Meeting on Thrombosis & Rheology., 2009 年, 3 月 14 日、東京.

- ⑦Obikane H, Abiko Y, Ueno H, Kusumi Y, Esumi M, Yamamoto T, Mitsuamta M: Correlation of endothelial proliferation with monocyte adhesion under laminar or disturbed shear stress. 15th International Vascular Biology Meeting, Sydney 2008 年, 6 月 1-5、Australia。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三俣 昌子 (MITSUMATA MASAKO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40064589

(2) 研究分担者

江角 真理子 (ESUMI MARIKO)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：30167291

楠美 嘉晃 (KUSUMI YOSHIAKI)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：60186393

安孫子 宜光 (ABIKO YOSHIMITSU)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：70050086

(3) 連携研究者

東 浩介 (AZUMA KOUSUKE)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：40420830