

機関番号：18001

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590404

研究課題名（和文） 動脈硬化モデルマウスの病変形成にあたるうつ状態の影響

研究課題名（英文） Influence of depression and mental stress on the experimental atherogenesis in mice

研究代表者

加藤 誠也 (KATO SEIYA)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60268844

研究成果の概要（和文）：心血管病の発症機転に種々の危険因子の関与が指摘されるが、個々の危険因子の動脈硬化の発症、進展への作用機序は明らかではない。うつ状態や社会心理学的なストレスが循環器疾患の発症リスクを増す可能性については、いくつかの疫学的報告がなされているが、その細胞生物学的機序は明らかではなく、予防や治療法開発につながっていない。本研究課題では、ApoE knockout mouse の高脂肪食負荷による動脈硬化モデルを用い、実験心理学的な手法を用いてうつ状態やストレスの病変形成に対する影響やそのメカニズムについて検討した。比較的高齢の遺伝性易動脈硬化性マウスを用いて、肥満、糖尿病状態を誘導しうる HFD32 を投与し生活習慣病性リスクの亢進状態を模倣したモデルを構築し、強制水泳試験によるストレスを加えた群と対照群の体液性因子の変化や組織学的な病変形成を検討したところ、ストレス負荷により、血中コルチゾール値の増加や脾細胞のサイトカイン応答の変化が生じている可能性が示唆された。一方、組織学的な動脈硬化病変の変化を見出すには至らなかった。ストレスは、体液性因子の変動を介して動脈硬化病変の発症、進展に関する可能性はあるが、実際の病変形成過程において更に多因子が複合的に関与している可能性が予想される。

研究成果の概要（英文）：Various risk factors have been shown to be involved in human atherogenesis and onset of cardiovascular diseases. Epidemiological studies have revealed that depression and mental stress increase in the risks of cardiovascular diseases. However, cellular and molecular aspects regarding how depression and mental stress influence on the disease process, have not been fully investigated. In the present study, we tested the effect of psychological stress on atherogenesis using the experimental mouse model. Aged ApoE knockout mice were fed with high fat diet (HFD32) inducing obesity and insulin resistance, with or without adding the forced swimming test. Stress-overloaded group represented an increase in serum cortisol level and changes in cytokine (Th1/Th2) balance of the Con-A stimulated splenic cells. Thus psychological stress may influence on the alteration of some humoral factors that have been suggested their involvement in the atherosclerotic processes. However, no histological differences were observed on the degree of atherosclerotic area and plaque stability index, suggesting that complex factors would be involved in the atherogenetic process of the stress-suffered individuals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：動脈硬化、疾患モデル動物、うつ、ストレス、免疫、炎症

1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化症は、主要先進国の重要死因である心血管病、脳卒中の基礎疾患で、その発症進展においては生活習慣上の危険因子が存在する。高脂血症、高血圧、内臓性肥満やインスリン抵抗性等については、疫学的な立証だけではなく、培養細胞や動物モデルを用いた基礎的研究が進んでおり、リスクを是正するための食事、生活習慣の改善法や薬物治療の効果も科学的な根拠が得られている。また心理的社会的要因、たとえば Friedman と Rosenman の提唱した A 型性格、現代人特有のストレスやうつ状態、不眠等の精神衛生上の問題の存在についても指摘され、これらは独立して動脈硬化の危険因子となりうる事が示唆されている。ところが、このような行動心理学的なストレスがどのような血管細胞学的な機序で実際の動脈硬化病変の発症、進展に関与するかどうかの検討は十分に行われておらず、したがってより科学的な根拠に基づいた予防や治療法の開発には至っていない。

以前より我々は、血管壁細胞、特に動脈硬化早期の増殖反応の中心となる平滑筋細胞の形質転換機序を *in vitro* で解析し、静止型から増殖型への古典的形質転換が FGF 等の内因性増殖因子や培養微小環境に依存する事を報告してきた (Am J Pathol 1996, Connect Tissue Res 1998, Life Sci 2000 他)。また最近、古典型形質転換時に連動して、細胞内酸化ストレス亢進、MCP-1, IL-18 等のケモカイン、サイトカイン産生など炎症型形質転換を果たす可能性について報告した (Vasc Pharmacol 2007, Int J Mol Med, 2006)。代表的な動脈硬化モデル動物 ApoE KO mouse において Th1 サイトカインである INF-gamma の作用を抑制する可溶性 INF-gamma receptor の遺伝子導入を試み、プラークの容積減少と安定性増加、血管壁における炎症性蛋白 IL-1beta、MCP-1、ICAM-1 の発現低下など抗動脈硬化性を認めた (Circ Res, 2007, Hypertens Res, 2007)。これらの知見は、動脈硬化の発症、進展にかかわる細胞生理学的変化が、局所的あるいは systemic な炎症機転に強く影響される事を裏付けるものであり、また Ross の傷害反応仮説が炎症機転に帰結した事に対する実証の一部とも考えられる。一方、行動心理学的ストレスと疾患との関係については、ストレス学説の創始者である Selye(1936)が、当初より間脳-下垂体-副腎の内分泌系の活性化を

指摘しており、また同じ頃、ホメオスタシスの定義で著明な Cannon(1927)もストレスの共通性質として副腎皮質刺激ホルモン(ATCH)を挙げている。コルチゾールは最も代表的なストレスホルモンであり、生活習慣的危険因子でもある糖質脂質の代謝、そして炎症や免疫担当細胞の機能に深い関連がある。またカテコールアミンやレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の活性化も血管壁代謝を動脈硬化性形質へ導く可能性が高い。更に、上述した性格分類について Morris(1980)等は外見上 B 型性格を示すが、実際にはストレスを内に秘めているにも関わらず温和、従順な行動様式を示す C 型性格を定義し、NK 細胞の活性低下、melanoma 等の悪性疾患の発症、進展との関連を指摘している。したがって、行動心理学的ストレスは、systemic な内分泌系、免疫系作用を介して、全身性の炎症機転、血管壁の炎症機転、そして血管壁細胞の機能変化を引き起こし動脈硬化性疾患のリスクとして作用する可能性が予感される。しかし、このような仮説を証明ないし発展させる為には、科学的に定量、定性が可能な行動心理学的ストレス下における動脈硬化度の変化や血管壁細胞の機能変化を評価する実験系の構築が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「動脈硬化モデル動物において、慢性的な行動心理学的ストレス状態下での組織病変の変化と全身性、局所性の炎症機転との関係を明らかにする」事である。

3. 研究の方法

(1) 強制水泳試験法を用いたマウスのストレス状態モデルの作製

1 日数回、直径 95cm の円形プール中央に径 10-20cm のプラットホームを設置、プールに放たれた被験体の逃避行動をうながす訓練を 1 週間、反復した。この訓練を繰り返す事により逃避訓練反復により良好な学習効果を示す Winner (100%逃避) と Loser (行動的絶望状態に陥り不動反応を示す) に分類され、後者がヒトのうつ状態の良いモデルである事が立証されているが、今回は行動試験後に動脈硬化誘導食を追加したため、行動試験の有無の 2 群をストレス群、非ストレス群として比較検討した。ストレスモデル動物で変動しうる内分泌代謝因子としては血漿中コルチゾール (ELISA 法) を測定した。

(2) 危険因子重複下の動脈硬化モデルマウスの作製

遺伝的動脈硬化モデルマウスである Apo E Knockout mouse の主として中高齢世代を用い、obesity や insulin resistance を誘発することが知られている高脂肪食 HFD32 を投与した。マウスは食餌、給水制限は行わない状態で飼育し各群の体重を経時的にモニターした。これらの動物実験に関しては、平成 18 年 6 月に改正された「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を遵守し、日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、文部科学省研究振興局ライフサイエンス課の指導による「研究機関等における適正な動物実験等の実施に向けた基本的考え方について」（平成 18 年 6 月）等の通達に沿って立案し、琉球大学動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

(3) 検体の採取

安楽死したマウスは心腔血を採取後、無菌的に脾臓を採取し免疫学的実験に用いた。更に 4%PFA/PBS にて灌流固定後に心臓と大動脈を一塊として摘出し、一晚同溶液で追加固定した。実体顕微鏡下で大動脈弓以下を切離、この部位は Oil red-O 脂肪染色を施行し scan される脂質沈着範囲を画像解析した。心臓から上行大動脈に至る部分は 20% ショ糖溶液に置換後、OCT compound で包埋し、凍結切片を作製し病理組織学的検索に用いた。

(4) 免疫学的実験

血清を分離し ELISA 法で Th1/Th2 サイトカイン (INF-gamma, IL-13) を測定した。また脾細胞を分離し 10%FCS 加 RPMI1640 培地で維持し、ConA 刺激を行い上清を用いて同様に ELISA 法で Th1/Th2 サイトカインを測定した。これに先立ち flowcytometry で脾細胞の CD4/CD8 比等を検討した。

(5) 病理組織学的検討

動脈硬化度については、大動脈弓部以下の fatty streak 領域の Oil red-O (脂肪) 染色陽性 area の面積計測と aortic sinus 部から作製した凍結切片を HE 染色、Oil red-O (脂肪) 染色、Sirius red (膠原線維) 染色で観察し、内膜中膜比 (I/M 比) の測定を行った。更に抗平滑筋 actin、MOMA-2、CD34、CD3 (CD4/8) 抗体を用いた免疫染色で病変部の細胞を同定し、それぞれの陽性 area 面積から plaque stability index を算出した。

4. 研究成果

20 週齢メス ApoE KO mouse 24 匹をストレス状態の誘導 (1 週間) および高脂肪食 HFD32 (4 週間) 投与の有無により 4 群とし、25 週

齢の時点で血清採取、組織検索を施行した。体重は高脂肪食負荷のみならず、興味深いことにストレス状態誘導群で増加する傾向にあり、今後、ストレスとメタボリック症候群との関連を研究するモデルへの応用も期待出来る。血清コルチゾール値の増加は普通食のうつ状態誘導群で非うつ状態誘導群よりも高値を示し、代表的なストレスホルモンであると認識されている点に合致する所見であった (但し、予備実験では、ストレス負荷状態でむしろコルチゾールの低値を示す個体が散見された。正常の日内変動の失調や継続したストレスによるコルチゾール産生系の消耗等の可能性も否定出来ない)。また高脂肪食群ではストレスの有無によるコルチゾール値の差異は認めなかった事は、Apo E knockout mouse に一層の脂質負荷を加えたためにストレスによるコルチゾール産生系への影響がマスクされた可能性がある。

次に脾細胞を回収し flowcytometry で解析、ストレスの有無での CD4/CD8 比の変化は明らかではない事を確認した。引き続き ConA 刺激後、培養液中のサイトカインを ELISA 法で検討した。高脂肪食投与の有無にかかわらず Th1 サイトカインの INF-gamma の増加を認め、一方、Th2 サイトカイン IL-13 値には変化を認めず、うつ状態誘導群ではリンパ球の反応性が Th1 側にシフトしている可能性が示唆された。

大動脈を採取し Oil-red O 染色陽性範囲の評価、また大動脈入口部の凍結連続切片を作製し動脈硬化度をコンピューター画像解析したが、4 群のマウス間で有意差は得られなかった。また動脈硬化病変の性状の変化を知る指標として plaque stability index を算出したが、やはり有意差は見いだせなかった。

動脈硬化病変の形成において全身性あるいは局所性の炎症反応や免疫学的機序が重要な役割を果たしている可能性については多数の報告があるが、いまだその全容は明らかではない。ApoE Knockout 等の動脈硬化性マウスにおいても、獲得免疫の Th1/Th2 バランスの変化と病変形成との関連が指摘されているが、やはり動脈硬化のステージや様相に応じた Th1/Th2 バランスの変化を明確に説明するには至っていない。今回の研究で、ストレス下の動物において免疫系にも影響しうるコルチゾールや、マイトゲン刺激下の脾細胞の応答性の変化が見られた点は、ストレス性刺激には動脈硬化病変の形成を修飾しうる体液性変化を生じる可能性があることを示唆している。一方、組織学的検索については、全大動脈、大動脈入口部の動脈硬化度判定に加えて、組織の性状 (plaque stability

index) についても検討したが、現在まで有意な組織学的な差異を見いだせていない。研究協力者の事前の検討により今回用いた方法によるストレスの効果持続は約1ヶ月間と予想されており、比較的短期間で終了する実験系を構築した点、ApoE knockout mouse における動脈硬化素因がより強力で、心理学的なストレスやその下流に存在すると思われる体液性、免疫系の変化による影響がマスクされた可能性は考慮しなくてはならないであろう。あるいは、実際の動脈硬化の形成が、より多因子性である事を示す結果ではないかと考えたい。

心理学的なストレスと細胞生物学的な動脈硬化性機序をつなぐ研究報告は国内外とも稀であり、まだまだ研究の余地は広い。心血管病の危険因子としての心理学的なストレスの意義を明らかにするために有用な実験系の構築とその解析にむけて引き続き精進する所存である。今後の課題として、今回、十分に区別して評価し得なかったうつ状態とストレス状態についても実験心理学を専攻する研究協力者との連携を更に深め、心血管病リスクとしての意義についての解析を進める必要があると考える。また今回は研究対象とはしなかったが、血栓線溶系の変化も心血管イベントの発症につながる重要な要素で、かつ臨床的にも想定しやすい事例であり、解析と予防、治療法の開発が望まれる。今回の研究をサポート頂いた文部科学省、日本学術振興会に深謝致します。

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8件)

①加藤誠也, 松本裕文, 仲西貴也. 若年者の動脈硬化病変. *Cardiac Practice* 2011、査読無、22巻、6-11

②Wang KY, Tanimoto A, Guo X, Yamada S, Shimajiri S, Murata Y, Ding Y, Tsutsui M, Kato S, Watanabe T, Ohtsu H, Hirano K, Kohno K, Sasaguri Y. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in apolipoprotein e knockout mice independently of serum cholesterol level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*、査読有、2011、31巻、800-807

③Takemiya K, Hisashi Kai H, Yasukawa H, Tahara N, Kato S, Imaizumi T. Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for pulmonary hypertension rats. *Basic Res Cardiol*、査読有、2010、

105巻、409-417

④Okamoto M, Azuma K, Hoshino T, Imaoka H, Ikeda J, Kinoshita T, Takamori S, Ohshima K, Edakuni N, Kato S, Iwanaga T, Aizawa H. Correlation of decreased survival and IL-18 in bone metastasis. *Intern Med*、査読有、48巻、2009、763-773

⑤Imaoka H, Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, Sawada M, Takei S, Kinoshita T, Kawayama T, Kato S, Aizawa H. Endogenous and Exogenous Thioredoxin 1 Prevents Goblet Cell Hyperplasia in a Chronic Antigen Exposure Asthma Model. *Allergol Int*、査読有、2009、58巻、403-410

⑥Kudo H, Kai, H, Koga M, Takayama N, Mori T, Ikeda A, Yasuoka S, Kajimoto H, Mifune H, Kato S, Hirooka Y, Imaizumi T. Exaggerated Blood Pressure Variability Superimposed on Hypertension Aggravates Cardiac Remodeling in Rats via Angiotensin II-Mediated Chronic Inflammation. *Hypertension*、査読有、54巻、2009、832-838

⑦Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kato S, Iwasaki H, Watanabe K, Aizawa H. IL-18 production and pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*、査読有、2008、31巻、287-297, 2008

⑧Fukushima S, Kato S, Maeda M, Shigemori M. Caspase-9 pathway activation by inhibiting endogenous fibroblast growth factor signaling in human glioma cells. *Int J Oncol*、査読有、2008、32巻、467-473

[学会発表] (計4件)

①Lin YH, Chiba S, Matayoshi, Arakaki K, Matsumoto H, Nakanishi T, Arakawa F, Oshima K, Sugama K, Kato S. MODIFICATION OF IL-4 MEDIATED VASCULAR CELL-CELL INTERACTION AND PHENOTYPES USING CELL-SELECTIVE MOUSE IL-4 AGONIST. 第56回日本病理学会秋期特別総会 International Poster Session 2010年11月25日(北九州市)

②Lin YH, Chiba S, Matayoshi S, Arakaki K, Matsumoto H, Nakanishi T, Arakawa F, Oshima K, Sugama K, Kato S. Altered IL-4 effects by cellular interaction between vascular smooth muscle cells and macrophages: an in vitro study. 第12回沖縄血管病態研究会 2010年11月12日(宜

野湾市)

③Matafolau HT, Matsubara H, Arakaki K, Kinjo T, Kato S. Lysophosphatidic acid differentially modulates vascular smooth muscle phenotype. 第98回日本病理学会総会 2009年5月1日(京都市)

④Matafolau HT, Matsubara H, Arakaki K, Kinjo T, Kato S. Lysophosphatidic acid, a component of the mildly-oxidized low density lipoprotein, modulates multifarious aspects of vascular smooth muscle cell phenotype. 第10回沖縄血管病態研究会 2008年11月7日(那覇市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 誠也 (KATO SEIYA)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60268844

(2) 研究協力者

新垣 和也 (ARAKAKI KAZUNARI)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70509091

土江 伸誉 (DOE NOBUTAKA)

兵庫医科大学・先端医学研究所・非常勤講師

研究者番号：00434879