

機関番号：24402

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590901

研究課題名 (和文) アンジオポエチンを介する血管新生の分子機構の解明と
その喘息治療への応用研究課題名 (英文) Elucidation of molecular mechanisms of angiogenesis mediated by
angiopoietins and its application for asthma therapy

研究代表者

金澤 博 (KANAZAWA HIROSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90332957

研究成果の概要 (和文)：血管新生調節因子として angiopoietin family (Ang) が注目されており、喘息病態下での機能解析を進めた。今回の検討において、Ang-1 は平滑筋細胞を含む血管の成熟・安定化に、Ang-2 は内皮細胞の遊走や血管の不安定化・リモデリングに作用することを示した。さらに喘息気道における Ang-2 の産生亢進を明らかにし、血管の不安定化や透過性の亢進および血管リモデリングの進展への関与を示した。

研究成果の概要 (英文)：Angiopoietin-1 has been shown to protect the adult vasculature against plasma leakage. In contrast, angiopoietin-2, an antagonist of angiopoietin-1, induces loosening of interactions between endothelial and perivascular support cells, and subsequently reduces vascular integrity. Thus, angiopoietin-1 and -2 may play complementary and coordinated roles in airway angiogenesis and microvascular remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで喘息気道に観察される病理学的特徴としての基底膜の肥厚・気管支平滑筋の肥大と増生・杯細胞の過形成・新生血管の形成等、気道リモデリングと総称される気道組織の再構築に関与する種々の成長因子についての研究を遂行し、気道リモデリングの分子機構についての研究を積極的に展開してきた。特に、気道リモデリングの一因を担う気道壁の血管新生に及ぼす VEGF の生理作用に注目し、その気管支喘息における

病態生理学的意義について検討してきたのである。このような検討を通して、VEGF が内因性の強力な血管内皮細胞増殖因子であり、かつ血管透過性誘導物質であるとの観点から、気管支粘膜の浮腫の形成のみならず、気道リモデリングの進展と維持に対して、極めて重要な役割を演じていることを詳細に示してきたのである (Kanazawa H, et al. Thorax 2002, Kanazawa H, et al. Ann Allergy Asthma Immunol 2005, Kanazawa H, et al. J Asthma 2006)。さらに、これらの

研究を進展させることにより、気道微小循環系の解剖学的・機能的異常の観点から、気管支喘息の新規病態生理を確立し、これらに関連した数多くの知見を欧米学術誌に報告してきた (Kanazawa H, et al. Chest 2002, Kanazawa H, et al. Chest 2007)。これまでの研究の過程から、VEGF の作用を修飾する因子の存在を確認し、VEGF との相互作用及び、これら修飾因子独自の生理作用を明らかにする過程において、アンジオポエチン・ファミリー (Ang) に関する基礎的・臨床的研究に着手した。

2. 研究の目的

当研究において、我々は、気道内の血管リモデリングの形成・進展に及ぼす Ang-1、Ang-2 の病態生理学的役割を明らかにすることを試みた。特に、様々な重症度を有する喘息患者の気道壁における微小循環系の量的及び機能的異常と Ang-1、Ang-2 の発現量との関連性を確立することを計画した。さらに、VEGF、Ang-1、Ang-2 の定量化された結果と個々の喘息患者の生理学的・病理学的検査から得られた所見とを詳細に比較検討することにより、VEGF と Ang-1、Ang-2 の相互関係を一層明らかにすることを試みた。このように、VEGF 過剰発現下における Ang-1、Ang-2 を基盤とする気管支喘息の新規病態生理を確立することを目的として研究を遂行するものである。また、Ang-1、Ang-2 の発現に及ぼす VEGF の役割や VEGF と Ang-1、Ang-2 の相互関係を介する新生血管の形成過程について分子生化学的手法を用いて、明らかにしてゆく。こうして、気管支壁における活発な血管新生と新たに形成された未熟な新生血管の内皮細胞機能異常・過剰な血管透過性亢進能に注目し、気管支喘息の新たな病態メカニズムを構築してゆく。そして、これらの結果を基に、気道壁の血管新生の制御をターゲットとする気管支喘息の新しい治療法の開拓や新規薬剤の開発に結びつけてゆくことを目的とした。

3. 研究の方法

第一に、喘息患者の気道壁における微小循環系の量的異常を非侵襲的に定量化する方法を確立する。我々は既に、肺血管内皮細胞の恒常性が種々の血管新生促進因子 (vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor, basic fibroblast growth factor 等) と抑制因子 (endostatin, angiostatin 等) のバランスにて規定されていることを明らかにしている。今回はさらに、VEGF の作用を修飾する因子として Ang-1、Ang-2 の気道内での定量化を試みる。即ち、肺摘出標本・肺生検標本を用いて、気道壁の新生血管の量的な程度 (血管の発芽の定量化も合わせて行う)

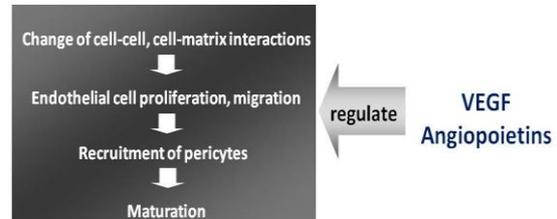
と VEGF、Ang-1、Ang-2 の蛋白質量・mRNA 量との関連性を検討する。この結果を基に、喘息患者の誘発喀痰中の Ang-1、Ang-2 の蛋白質量を測定し、肺生検標本中のこれら因子の発現量や新生血管の量的な程度との関連性を調べる。そして、誘発喀痰・マイクロサンプリング法から得られた検体の解析により、非侵襲的な血管新生の定量化法の確立を目指す。さらに、喘息患者の生理学的・臨床的指標とこれらの臨床検体中の Ang-1、Ang-2 の蛋白質量との相関性についても考察する。第二に、VEGF の作用を調節する因子として、Ang-1、Ang-2、Tie-2 の肺内局在、及びその生理作用について検討する。肺内の局在については、肺摘出標本・肺生検標本を用いて免疫組織学的に解析し、さらに VEGF との共存下での Ang-1、Ang-2 の生理作用を明らかにすることを目標とする。第三に、喘息患者の気道壁における微小循環系の機能的異常に及ぼす Ang-1、Ang-2 の生理的役割を明確なものとする。特に、喘息気道における新生血管の透過性亢進能を評価することを主眼とする。我々は既に、我々が考案した airway vascular permeability index (Kanazawa H, et al. Chest 2002) が気道の微小血管透過性の鋭敏な指標であることを明らかにしている。そこで、気道壁の Ang-1、Ang-2 量と気道の微小血管透過性が有意な関連性をもつかを検討する。さらに、喘息患者の運動負荷後の気道微小血管透過性の亢進がもたらす気道収縮反応の強度と気道壁の Ang-1、Ang-2 量との関連性についても検討する。次いで従来の喘息治療薬が、Ang-1、Ang-2 の蛋白質量・mRNA 量に与える薬理作用、及び気道壁の新生血管の量的な程度や気道の微小血管透過性能に与える作用を検討し、既存の抗喘息薬の枠組みでの有効な治療体系の再構築を目指す。第四に、喘息気道における新生血管の内皮細胞機能障害の評価の可能性についても検討を進めることを予定している。我々は既に、喘息患者に対する運動負荷により肺循環動態がダイナミックに変動し、肺血管内皮細胞に対する shear stress が有意に増加することを確認しており (Kanazawa H, et al. Respir Res 2007, Kanazawa H, et al. Respiriology in press)、新生血管の内皮細胞にこのような過度の shear stress 負荷が加わった際の内皮細胞の反応応答を明らかにする方針である。まず前段階の検討として、喘息気道の新生血管の内皮細胞の細胞生化学的特性を確立する。特に血管内皮細胞表面マーカーについては網羅的に評価し、正常肺組織の血管内皮細胞との細胞生化学的特性の差異を明確にする。このような結果を背景に運動負荷試験を行い、shear stress に対しての細胞応答の差異を、血管内皮細胞障害により誘導される末梢血中の内皮細胞表面

マーカーの濃度変化として捉えることにより、微小循環の内皮細胞機能障害の非侵襲的定量化法として位置づける。我々は、既に shear stress 負荷に対する気道内でのトロンビン活性化現象が、喘息気道のみにおいて確認されることを明らかにしており、さらに活性化トロンビンが basic fibroblast growth factor (bFGF) の誘導を介して、気道リモデリングの形成・進展に関与していることを明らかにしている (Kanazawa H, et al. Ann Allergy Asthma Immunol 2005)。今回は、この方法を用いて、気道壁の Ang-1、Ang-2 量と血管内皮細胞機能障害の程度との関連性も合わせて検討する。

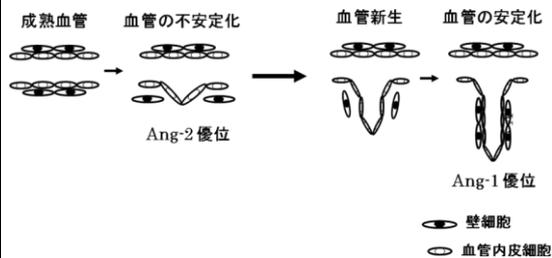
4. 研究成果

血管内皮細胞は、血管透過性の制御、抗血栓性の維持、血管緊張の制御機能をもち、生体の恒常性を維持するのに極めて重要な細胞である。一方、悪性腫瘍や慢性炎症性疾患など様々な病的状況下においては、通常殆んど増殖しないとされている血管内皮細胞が活発に増殖して新しい血管ネットワークを形成し、さらに、それぞれの病態の進展に関連して血管新生が誘導されるという現象が観察される。この血管新生という現象の過程の中心をなすものは、血管内皮細胞の発生・増殖・分化とプログラム化された細胞死であると考えられる。今回の研究において我々は、気管支喘息において、VEGF により刺激された肺血管内皮細胞が気道における血管新生の中心的な役割を演ずるという知見を明らかにした。つまり、気道の構成細胞の一つとしての肺血管内皮細胞に焦点を絞り、喘息の病態生理における役割を基礎的・臨床的に明らかにしたのである。そして、こうして得られた知見をさらに発展させ、VEGF の血管新生促進作用を調節する因子としてアンジオポエチン・ファミリー (Ang) に注目し、研究をさらに推し進めた。そして、Ang-1、Ang-2 に関して、血管内皮細胞に対するこれらの因子の生理活性を分子生化学的に明らかにした。両因子はともに血管内皮細胞に発現するレセプター (Tie-2) のリガンドであり、Tie-2 チロシンキナーゼに対して、Ang-1 は自己リン酸化を誘導するのに対し、Ang-2 は結合するが自己リン酸化を誘導せず、Ang-1 に阻害的に作用する。つまり、Ang-1 は平滑筋細胞を含む血管の成熟・安定化に、Ang-2 は内皮細胞の遊走や血管の不安定化・リモデリングに作用するという可能性が想定される。そこで今回、我々は、気道の血管新生に及ぼす Ang の生理作用に注目し、喘息病態下での

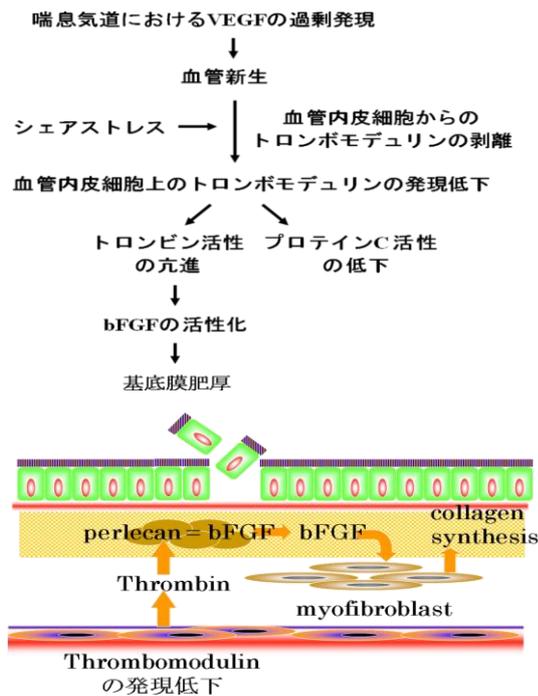
VEGF 過剰発現時における Ang-1、Ang-2 と VEGF との相互作用による血管新生の分子機構を明らかにした。一般に、血管新生の過程では血管内皮細胞の ①発芽、②遊走・増殖、③管腔形成が段階的に行われるとされているが、喘息気道では、血管は既に血管内皮細胞と壁細胞・平滑筋細胞によって成熟した構築をとっており、そこから血管が新生するものと考えられる。



つまり、喘息気道における血管新生では、Ang-1、Ang-2 の発現量の相対的な変化、及びこれらの発現のタイミングの相違により、Tie-2 受容体のシグナルが遮断されて壁細胞が脱落するというステップが誘導されたり、一方、Tie-2 受容体の活性化を介して壁細胞によって周囲を取り囲まれ成熟血管となるという過程が想定され、これらの過程は Ang の巧妙なバランスによって調節されていると考えられる。



このように、喘息気道における血管新生の全ての段階において中核的役割を果たしているのが VEGF と Ang であると考えられ、これらの相互関係の解明は極めて重要な知見を我々に与えてくれるものと考えられる。さらに、新生血管の内皮細胞の機能的異常に対する Ang-1、Ang-2 の生理的役割についても明らかにし、喘息病態における Ang の病態生理学的意義についての新しい理論を構築した。つまり、血管新生を引き金とする気道リモデリングの全容を明らかにした。このように、喘息治療における新規治療ターゲットとして肺血管内皮細胞のアポトーシス誘導療法の可能性を切り開いた。



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 Kanazawa H, Tochino Y, Ichimaru Y, Kyoh S, Asai K, Hirata K. Potential roles of pentosidine on age- and disease-related impairment of pulmonary functions in asthmatic patients. J Allergy and Clin Immunol (in press). 査読有
- ② Kobayashi D, Tochino Y, Kanazawa H, Ichimaru Y, Kyoh S, Asai K, Hirata K. Comparison of alveolar nitric oxide concentrations using two different methods for the assessment of small airways inflammation in asthma. Respirology (in press). 査読有
- ③ Yoshikawa T, Kanazawa H. Phenotypic differences between asymptomatic airway hyperresponsiveness and remission of asthma. Respir Med 2011; 105: 24-30. 査読有
- ④ Watanabe T, Asai K, Fujimoto H, Tanaka H, Kanazawa H, Hirata K. Increased levels of high mobility group box 1 and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in induced sputum from asthmatic patients. Respir Med 2011; 105: 519-525. 査読有
- ⑤ Yoshikawa T, Kanazawa H, Tanaka J, Yamamoto T, Fujimoto S. Gene polymorphism of epidermal growth factor receptor and airway hyperresponsiveness in

young allergic subjects without respiratory symptoms. Med Sci Monit 2010; 16: CR163-171. 査読有

- ⑥ Kanazawa H, Kyoh S, Asai K, Hirata K. Validity of measurement of two specific biomarkers for the assessment of small airways inflammation in asthma. J Asthma 2010; 47: 1-7. 査読有
- ⑦ Kanazawa H, Kodama T, Asai K, Matsumura S, Hirata K. Increased levels of Nε-(Carboxy methyl) Lysine in epithelial lining fluid from peripheral airways in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a pilot study. Clin Sci 2010; 119: 143-149. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 金澤 博, JGL2009 から見た成人喘息治療、日本アレルギー学会春季臨床大会、2010年5月29日、京都国際会議場
- ② 金澤 博, COPDにおける気道および肺血管リモデリング、日本アレルギー学会秋季大会、2010年11月26日、東京国際フォーラム
- ③ 金澤 博, Mechanisms of corticosteroid resistance in smoking asthmatic patients: potential roles of angiotensin-2, 日本呼吸器学会総会、2010年4月24日、東京国際フォーラム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 博 (KANAZAWA HIROSHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90332957

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし