

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591084

研究課題名（和文）新規心血管作動性ペプチドによるマクロファージ泡沫化ならびに動脈硬化の制御

研究課題名（英文）Regulation of macrophage foam cell formation and atherosclerosis by novel regulatory peptides for cardiovascular system

研究代表者

宮崎 章 (MIYAZAKI AKIRA)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70253721

研究成果の概要（和文）：高脂肪食を負荷したアポ E 欠損マウスに、強力な血管収縮作用をもつ血管作動性物質であるウロテンシン II を持続皮下注すると、動脈硬化病変は 8 倍に増加した。ウロテンシン II 投与マウスから得た腹腔マクロファージの酸化 LDL によるコレステロールエステル蓄積（泡沫化）は、対照群の 7 倍に増加していた。同一の前駆体から派生する新規血管作動性物質として同定されたサリュースィン  $\alpha$ 、 $\beta$  をアポ E 欠損マウスに持続皮下注すると、動脈硬化病変形成はサリュースィン  $\alpha$  により 54% 抑制され、サリュースィン  $\beta$  により 2.6 倍促進した。腹腔マクロファージの泡沫化は、サリュースィン  $\alpha$  投与マウス由来の細胞で 68% 抑制され、サリュースィン  $\beta$  投与マウス由来の細胞で 2.6 倍に増加した。ウロテンシン II やサリュースィンは動脈硬化治療のあらたな標的分子として注目される。

研究成果の概要（英文）：Continuous subcutaneous infusion of urotensin II, a strong vasoconstrictor peptide, enhanced atherosclerotic lesions by 8-fold in fat-fed apoE-knockout mice. Analyses of peritoneal macrophages from urotensin II-treated mice revealed 7-fold increase in foam cell formation induced by oxidized LDL. Salusins are novel vasoregulatory peptides that derive from the same precursor. Development of atherosclerosis in apoE-KO mice was suppressed by 68% by continuous subcutaneous infusion of salusin- $\alpha$  but was 2.6-fold enhanced by salusin- $\beta$ . Peritoneal macrophages from salusin- $\alpha$ -treated mice revealed 68% reduction in foam cell formation induced by oxidized LDL whereas macrophages from salusin- $\beta$ -treated mice showed 2.6-fold increase in foam cell formation. Thus, urotensin II and salusins can be regarded as novel therapeutic targets for atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
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・代謝学

キーワード：動脈硬化, 血管作動性物質, マクロファージ, 高血圧

1. 研究開始当初の背景  
高血圧は動脈硬化を促進する重要なリスクファクターとして知られていたが、その分子機

構は明らかでなかった。我々は、最強の血管作動性物質として知られるウロテンシン II が培養ヒト単球由来マクロファージの泡沫化

(コレステロールエステル蓄積)を促進することを見いだした(Watanabe et al. Hypertension 2005)。その分子機構としては、細胞内コレステロールエステル化酵素であるアシルコエンザイム A : コレステロールアシルトランスフェラーゼ 1 (ACAT1)の発現増加が想定された。サリューシン $\alpha$ 、 $\beta$ は同一の前駆体から派生する新規血管作動性物質である。我々はこれまでに、培養ヒト単球マクロファージの泡沫化に対して、サリューシン $\alpha$ は抑制、サリューシン $\beta$ は促進することを報告した(Watanabe et al. Circulation 2008)。これらの結果から、種々の心血管作動性ペプチドには、血圧の調節のみならず、遺伝子発現制御を介してマクロファージの泡沫化、ひいては動脈硬化病変形成を制御する可能性が想定された。

## 2. 研究の目的

本研究では、ウロテンシン II やサリューシンなどの新規心血管作動性ペプチドに注目し、細胞レベルや個体レベルでの動脈硬化制御作用を検討した。これにより、動脈硬化性疾患に対するあらたな治療標的分子となる可能性、あるいはあらたなバイオマーカーとなる可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) ウロテンシン II の動脈硬化促進作用 ; 9 週齢のアポ E 欠損マウスに高脂肪食を負荷するとともに、オスミニポンプを用いてウロテンシン II を 4 週間持続的に皮下注射し、動脈硬化病変形成への効果を検討した。またアポ E 欠損マウスから腹腔マクロファージを採取し、酸化 LDL によるマクロファージの泡沫化ならびに泡沫化に関連した遺伝子発現に対するウロテンシン II の効果を検討した。さらに 9 週齢のアポ E 欠損マウスに高脂肪食を負荷するとともに、オスミニポンプを用いてウロテンシン II 受容体拮抗剤である 4-アミノキノリンを 8 週間単独投与し、動脈硬化病変抑制作用を検討した。

(2) 糖尿病性網膜症とウロテンシン II の関連 ; 健常対照者 (n = 24)、網膜症のない糖尿病患者 (n = 36)、単純型糖尿病性網膜症患者 (n = 16)、増殖型糖尿病性網膜症 (n = 16) の血中ウロテンシン II 濃度を測定した。

(3) サリューシン $\alpha$ 、 $\beta$ の動脈硬化制御作用 ; 13 週齢のアポ E 欠損マウスにオスミニポンプを用いてサリューシン $\alpha$ または $\beta$ を 4-8 週間持続的に皮下注射し、動脈硬化病変形成への効果を検討した。またアポ E 欠損マウスから腹腔マクロファージを採取し、酸化 LDL による泡沫化ならびに泡沫化に関連した遺伝子発現に対するサリューシンの効果を検討した。

## 4. 研究成果

(1) ウロテンシン II を投与したアポ E 欠損マウスの大動脈動脈硬化病変は対照群の 8 倍に増加した。ウロテンシン II 投与マウスから得た腹腔マクロファージの酸化 LDL による泡沫化(細胞内コレステロールエステル蓄積)は、対照群の 7 倍に増加していた。ウロテンシン II 投与マウスから得た腹腔マクロファージのウェスタンブロット解析では、細胞内コレステロールエステル化酵素(ACAT1)、酸化 LDL を認識するスカベンジャー受容体 (CD36, SR-A) の発現が対照群に比し有意に増加していた。ウロテンシン II 受容体拮抗剤である 4-アミノキノリン単独投与により、アポ E 欠損マウスの大動脈動脈硬化病変は 43%抑制された。以上より、ウロテンシン II の動脈硬化促進作用が動物実験により明らかとなった(雑誌論文 8)。

(2) 血中ウロテンシン II 濃度は、健常対照者 (2.4 ng/mL)、網膜症のない糖尿病患者 (14.7 ng/mL)、単純型糖尿病性網膜症患者 (23.5 ng/mL)、増殖型糖尿病性網膜症 (32.0 ng/mL) と段階的に増加し、ウロテンシン II が糖尿病性網膜症の発症に関与している可能性が示唆された(雑誌論文 9)。

(3) サリューシン $\alpha$  投与によりアポ E 欠損マウスの血中コレステロールレベルは 15%低下し、大動脈動脈硬化病変形成は 54%抑制された。サリューシン $\alpha$  投与マウスから得た腹腔マクロファージの酸化 LDL による泡沫化は、対照群の 32%に減少していた。ウェスタンブロットでは、ACAT1 発現が対照群に比し有意に低下していた。

サリューシン $\beta$ の投与によりアポ E 欠損マウスの大動脈動脈硬化病変は対照群の 2.6 倍に増加した。サリューシン $\beta$  投与マウスから得た腹腔マクロファージの酸化 LDL による泡沫化は、対照群の 1.9 倍に増加していた。ウェスタンブロットでは、CD-36, SR-A, ACAT1 の発現が対照群に比し有意に増加していた。

以上より、サリューシン $\alpha$ の動脈硬化抑制作用、サリューシン $\beta$ の動脈硬化促進作用が動物実験により明らかとなった(雑誌論文 1)。

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9件)

1. Nagashima M, Watanabe T, Shiraishi Y, Morita R, Terasaki M, Arita S, Hongo S, Sato K, Shichiri M, Miyazaki A, Hirano T. Chronic infusion of salusin- $\alpha$  and salusin- $\beta$  exerts opposite effects on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010;212(1):70-77. 査読有
2. Yoshinaka Y, Shibata H, Kobayashi H, Kuriyama H, Shibuya K, Tanabe S, Watanabe T, Miyazaki A. A selective ACAT-1 inhibitor, K-604, stimulates collagen production in cultured smooth muscle cells and alters plaque phenotype in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis* 2010;213(1):85-91. 査読有
3. Ban Y, Watanabe T, Suguro T, Matsuyama T, Iso Y, Sakai T, Sato R, Idei T, Nakano Y, Ota H, Miyazaki A, Kato N, Hirano T, Ban Y, Kobayashi Y. Increased plasma urotensin-II and carotid atherosclerosis are associated with vascular dementia. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2009;16(3):179-187. 査読有
4. Hongo S, Watanabe T, Arita S, Kanome T, Kageyama H, Shioda S, Miyazaki A. Leptin modulates ACAT-1 expression and cholesterol efflux from human macrophages. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2009;297(2):E474-482. 査読有
5. Xu G, Watanabe T, Iso Y, Koba S, Sakai T, Nagashima M, Arita S, Hongo S, Ota H, Kobayashi Y, Miyazaki A, Hirano T. Preventive effects of heregulin- $\beta$ 1 on macrophage foam cell formation and atherosclerosis. *Circulation Research* 2009;105(5):500-510. 査読有
6. Watanabe T, Arita S, Shiraishi Y, Suguro T, Sakai T, Hongo S, Miyazaki A. Human Urotensin II promotes hypertension and atherosclerotic cardiovascular diseases (review). *Current Medicinal Chemistry* 2009;16(5):550-563. 査読有
7. Kanome T, Watanabe T, Nishio K, Takahashi K, Hongo S, Miyazaki A. Angiotensin II upregulates acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 via AT<sub>1</sub> receptor in human monocyte-macrophages. *Hypertension Research* 2008;31(9):1801-1810. 査読有

8. Shiraishi Y, Watanabe T, Suguro T, Kato R, Hongo S, Itabe H, Miyazaki A, Hirano T, Adachi M. Chronic urotensin II infusion enhances macrophage foam cell formation and atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Journal of Hypertension* 2008;26(10):1955-1965. 査読有

9. Suguro T, Watanabe T, Kodate S, Xu G, Hirano T, Adachi M, Miyazaki A. Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Science* 2008;115(11):327-334. 査読有

[学会発表] (計11件)

1. 渡部琢也・有田茂子・長嶋理晴・平野 勉・宮崎 章・他4名 : Preventive effects of heregulin- $\beta$ 1 on macrophage foam cell formation and atherosclerosis. 第42回日本動脈硬化学会学術集会 (岐阜, 2010. 7)
2. 長嶋理晴・渡部琢也・宮崎 章・平野 勉 : Chronic infusion of salusin- $\alpha$  and - $\beta$  exerts opposite effects on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-knockout mice. 第41回日本動脈硬化学会学術集会 (下関, 2009. 7)
3. 本郷茂樹・渡部琢也・有田茂子・金山朱里・宮崎 章 : ヒトマクロファージからのコレステロール搬出に対するレプチンの抑制作用. 第51回日本脂質生化学会 (名古屋, 2009. 7)
4. Watanabe T, Nagashima M, Arita S, Hongo S, Shichiri M, Hirano T, Miyazaki A. Opposite effects of salusins on the development of atherosclerotic plaques. *American Heart Association Scientific Sessions 2009 (Orlando, 2009. 11)*
5. 勝呂俊昭・渡部琢也・宮崎 章・平野 勉・他2名 : 血漿ウロテンシン II(UII)濃度の増加と糖尿病性網膜症との関連. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会 (東京, 2008. 5)
6. 伴 良行・渡部琢也・宮崎 章・他10名 : ウロテンシンIIの血中レベルの増加は血管性認知症の危険因子である. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会 (東京, 2008. 5)
7. 宮崎 章・本郷茂樹・渡部琢也 : ヒト単球由来マクロファージの泡沫化に対するサルベシン $\alpha$ および $\beta$ の相反作用. 第50回日本脂

質生化学会（徳島, 2008. 6）

8. 勝呂俊昭・渡部琢也・宮崎 章・平野 勉  
他 2 名：血漿ウロテンシン II(UII)濃度の増加  
と糖尿病性網膜症および頸動脈硬化との関連.  
第 40 回日本動脈硬化学会学術集会（つくば,  
2008. 7）

9. 伴 良行・渡部琢也・宮崎 章・他 7 名：  
ウロテンシン II の血中レベルの増加は血管性  
認知症の危険因子である. 第 40 回日本動脈硬  
化学会学術集会（つくば, 2008. 7）

10. Watanabe T, Arita S, Hongo S, Miyazaki A,  
他 6 名：Preventive effects of heregulin- $\beta_1$  on  
macrophage foam cell formation and  
atherosclerosis. American Heart Association  
Scientific Sessions 2008 (New Orleans, 2008. 11)

11. 渡部琢也・有田茂子・本郷茂樹・宮崎  
章：新規血管作動性物質サリュースン $\alpha$ およ  
び $\beta$ のマクロファージ泡沫化および動脈硬  
化に対する相反作用. 第81回日本生化学会大  
会、第31回日本分子生物学会年会合同大会  
（神戸, 2008. 12）

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮崎 章 (MIYAZAKI AKIRA)  
昭和大学・医学部・教授  
研究者番号：70253721

##### (2) 研究分担者

渡部 琢也 (WATANABE TAKUYA)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：30297014

##### (3) 研究分担者

平野 勉 (HIRANO TSUTOMU)  
昭和大学・医学部・教授  
研究者番号：00167010

##### (4) 連携研究者

七里 眞義 (SHICHIRI MASAYOSHI)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号：10206097