

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17934

研究課題名(和文)流れずり応力に伴うNox応答を標的とした頸動脈狭窄症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new treatments for carotid stenosis targeted Nox family proteins responded by shear stress

研究代表者

西村 中 (Ataru, Nishimura)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90452755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：培養血管内皮細胞においてNox4のmRNA発現は層流と比較して乱流において有意な上昇を認めた。Nox4のknock downを行うとMCP-1のmRNA発現が上昇した。内皮細胞を高血糖下に培養すると、Nox4は定常状態ではグルコース濃度の上昇に応じてmRNAの発現上昇を認めたが乱流負荷時はこの変化は緩やかであった。一方MCP-1は定常状態ではグルコース濃度に伴う発現の変化は認めなかったが乱流負荷後はグルコース濃度に伴う発現の上昇を認めた。これらの結果からNox4は頸動脈において乱流がある部位でのMCP-1の発現上昇に伴う炎症抑制作用があり、高血糖下ではこの効果が減弱する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤における先行研究において、我々は流れずり応力によるNox4の変化が、血管壁における炎症を抑制し保護的に作用する可能性を示したが、本研究においても同様の結果が得られ、頸動脈狭窄におけるプラーク破綻に対し、Nox4が抑制的に働く可能性が示唆された。またこの血管炎症抑制効果は高血糖など動脈硬化の危険因子がある際に、減弱する可能性も示唆された。動物モデルにおいてこれを支持するデータは得られなかったが、Nox4を賦活することによる脳梗塞予防効果を目指した新規治療法が期待される。

研究成果の概要(英文)：In cultured brain endothelial cell under shear stress condition, Nox4 was significantly upregulated by laminar flow compared with turbulent flow. The mRNA expression of MCP-1, a key molecule participating in chronic vascular inflammation, was significantly upregulated in Nox4-knockdown endothelial cells. Nox4 was unregulated in high glucose and no-flow condition, but this change was slow in high glucose and turbulent flow condition. On the other hand, MCP-1 was not changed in high glucose and no-flow condition, but upregulated in high glucose and turbulent flow condition. Collectively, Nox4 may reduce the inflammation of carotid artery through the downregulation of MCP-1 and this effect is diminished in hyperglycemia.

研究分野：脳血管障害

キーワード：頸動脈狭窄症 流れずり応力 Noxファミリータンパク質

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳血管障害は、先進国における永続的な障害をきたす原因の第 1 位であり、欧米ではその約 20%が頸動脈狭窄症に由来するとされる。本邦においても生活習慣病を有する患者数が増加したことにより、動脈硬化を背景とした頸動脈狭窄症の罹患率は上昇している。頸動脈狭窄症による脳梗塞の主な原因は脂質成分の多い不安定なアテローム性プラークの破綻とそれに伴う血栓形成である。重篤な脳梗塞を予防するために、動脈硬化性プラークの不安定化とその破綻を抑制することは重要である。

動脈硬化性プラークの進展に関して、流れずり応力との関連が注目されている。流れずり応力は健常血管では内皮細胞において NO 産生に寄与しており、血管を保護するように働いている。この血管の恒常性を保つ範囲を超えたり流れずり応力が、病的な変化をもたらすものと考えられている。例えば冠動脈疾患に関して、流れずり応力の低い血管壁においてはプラークが形成されやすく、一方、流れずり応力の局所的な上昇はプラークの破綻に関係していることが報告されている。しかし頸動脈プラークに対する流れずり応力の影響についての報告は少なく、未解明である。

申請者はこれまで、脳虚血病態および脳動脈瘤における NADPH oxidase (Nox) ファミリータンパク質の役割についての研究を行ってきた。Nox ファミリータンパク質は活性酸素種の産生に特化した酵素であり、5 つの Nox ファミリータンパク質 (Nox1-5) のうち、Nox1、Nox2 および Nox4 が心血管系細胞に発現し、心血管疾患に重要な役割を果たしていることが報告されている。これまでの研究で、Nox4 が急性期脳虚血に関しては、脳血管ペリサイトにおいて炎症を増強することで脳梗塞を増悪させることを報告した (Nishimura A, *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016)。一方、脳動脈瘤においては、Nox ファミリータンパク質の中でも Nox4 が流れずり応力に伴う動脈瘤壁の炎症に対して保護的に作用する (論文作成中) ことを明らかにしてきた。

これらの結果より炎症を中心とした頸動脈プラークの病態においても、流れずり応力を基とした Nox ファミリータンパク質が重要な役割を担っていることが予想され、これが動脈硬化性プラークの不安定化とその破綻における上流のシグナルであるならば、これを標的として阻害することが、将来的な脳梗塞の予防的治療になりうるものとして期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、流れずり応力に伴う頸動脈プラークの不安定化や破綻における NADPH oxidase との関係性を解明し、これを予防するための Nox ファミリータンパク質を標的とした新たな治療法を開発することである。

頸動脈プラークの不安定化や破綻における流れずり応力との関連はいまだ解明されておらず、特に重要な機能をもった内皮細胞における分子メカニズムについては不明な点が多い。病態の中心は血管壁における炎症と考えられ、その中でも近年心血管疾患で注目されている NADPH oxidase はその上流のシグナルに位置している可能性がある。本研究では頸動脈プラークにおける流れずり応力の影響と、それによる NADPH oxidase ファミリータンパク質の役割を解明することで、これをターゲットとした頸動脈プラークの不安定化や破綻を予防するための革新的な治療法に繋がるものとして大きな意義があると考えている。

3. 研究の方法

頸動脈プラークの不安定化や破綻と流れずり応力との関係を解析し、これに関わる NADPH oxidase の役割とこれをターゲットとした治療法を開発するために以下のような実験を計画した。

1) 培養マウス血管内皮細胞を用いた流れずり応力と Nox ファミリータンパク質の発現変化の解析

培養マウス血管内皮細胞に対する流れずり応力負荷

培養マウス血管内皮細胞に対し、壁ずり応力負荷装置 (平行平板型、回転円錐型) を用いて流れずり応力負荷を行う。平行平板型では層流負荷による、単純な wall shear stress の影響を評価し、回転円錐型では乱流を生じることで、血流の乱れによる影響を評価する。

Nox ファミリータンパク質の mRNA 発現解析

上記の負荷を行った細胞に対し、負荷後 6 時間、24 時間後のサンプルを採取する。このサンプルから mRNA およびタンパクを抽出する。これを用いて Nox ファミリータンパク質 (Nox1-5) の発現を PCR, real-time PCR, ウェスタンブロットにより解析する。

2) マウス頸動脈狭窄モデルを用いた流れずり応力と Nox ファミリータンパク質の発現変化の解析

マウス頸動脈狭窄モデルの作成

マウスの頸動脈狭窄モデルを作成する (Chen et al. *Circulation Research* 2015)。具体的には頸部正中切開後に右総頸動脈を周囲組織から剥離し露出する。内頸動脈分岐部から 1 mm のところに遠位部狭窄を、そこから、3 mm 近位部に近位部狭窄を作成する。狭窄は、150 μm の針を総頸動脈と一緒に 6-0 ナイロン糸にて結紮し、後から針を結紮から引き抜くことにより完

成する。左総頸動脈は、剥離露出までとして sham 手術とする。

サンプルは術後 2 週、4 週、7 週、11 週において採取を行う。

頸動脈狭窄組織サンプルにおける Nox ファミリータンパク質の発現解析

採取した頸動脈サンプルから mRNA およびタンパクを抽出する。これを用いて Nox ファミリータンパク質 (Nox1-5) の発現を PCR、real-time PCR、ウエスタンブロットにより解析する。

頸動脈狭窄組織サンプルにおける Nox ファミリータンパク質の病理組織学的検討

採取した頸動脈サンプルから凍結切片を作成する。これを用いて Nox ファミリータンパク質 (Nox1-5) の発現とその分布を蛍光免疫染色にて解析する。またどの細胞に発現しているか調べるため、内皮細胞、血管平滑筋細胞、炎症細胞や細胞外マトリックスなどのマーカーとの蛍光二重染色を行う。

Nox ファミリータンパク質のノックアウトマウスを用いた頸動脈狭窄モデルの作成

心血管系細胞に発現する Nox ファミリータンパク質である Nox1、2、4 のノックアウトマウスを用いて頸動脈狭窄モデルを作成する。コントロールとして野生型マウスに対する頸動脈狭窄モデルを用いる。採取した頸動脈サンプルから mRNA およびタンパクを抽出する。これを用いて Nox ファミリータンパク質 (Nox1-5) の発現を PCR、real-time PCR、ウエスタンブロットにより解析する。

3) 頸動脈狭窄症手術患者のプラーク標本採取と Nox ファミリータンパク質発現の解析

頸動脈狭窄症に対する頸動脈内膜剥離術 (CEA) を施行する患者における病変の評価および病理学的評価を行う。不安定プラークおよびプラーク破綻の判定は、術前の MRI、頸動脈エコーを基に診断する。CEA の際に摘出した頸動脈プラーク摘出サンプルを用いて mRNA、タンパク質の発現解析および Nox ファミリータンパク質に関する組織学的検討を行う。

4) マウス頸動脈狭窄モデルに対する Nox 阻害薬を用いた不安定化・破綻抑制効果の検討

NADPH oxidase 阻害薬であるの阻害剤である VAS2870 (Enzo Life Science, Japan) および GKT137831 (Genkyotex S.A., Switzerland) を用いる。マウス頸動脈狭窄モデル作成 11 週後に Nox 阻害薬を投与する。コントロールとして、Nox 阻害薬非投与群を用いる。手術施行後 3 ヶ月にマウスを安楽死させ、頸動脈サンプルを採取し、狭窄のサイズ、狭窄率、プラークの病理学的評価による不安定プラークやプラーク破綻の評価を行う。

4. 研究成果

培養血管内皮細胞に対するずり応力負荷の結果、Nox4 における mRNA 発現は層流では有意な変化は認めなかったものの、乱流において有意な上昇を認めた。また Nox1 および Nox2 についてはいずれの刺激でも有意な変化は認めなかった。Nox4 の knock down を行うと血管における炎症を惹起する MCP-1 の mRNA 発現が上昇した。血管内皮細胞を高血糖下に培養し、乱流刺激を行うと、Nox4 に関しては定常状態ではグルコース濃度の上昇に応じて mRNA の発現上昇を認めたが、乱流負荷時はグルコース濃度の上昇に伴う Nox4 発現の上昇は緩やかであった。一方 MCP-1 の発現は定常状態ではグルコース濃度に伴う発現の変化は認めなかったが、乱流負荷後はグルコース濃度に伴う発現の上昇を認めた。これらの結果から Nox4 は頸動脈において乱流がある部位での MCP-1 の発現上昇に伴う炎症を抑制する作用があり、高血糖下ではこの効果が減弱する可能性が示唆された。マウス頸動脈狭窄モデルについては安定した頸動脈狭窄病変が作成されず、十分な解析ができなかった。

脳動脈瘤における先行研究において、我々は流れずり応力による Nox4 の変化が、血管壁における炎症を抑制し保護的に作用する可能性を示したが、本研究においても同様の結果が得られ、頸動脈狭窄におけるプラーク破綻に対し、Nox4 が抑制的に働く可能性が示唆された。またこの血管炎症抑制効果は高血糖など動脈硬化の危険因子がある際に、減弱する可能性も示唆された。動物モデルにおいてこれを支持するデータは得られなかったが、Nox4 を賦活することによる脳梗塞予防効果を目指した新規治療法が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	奥田 智裕 (Okuda Tomohiro)	九州大学大学院医学研究院・脳神経外科・大学院生	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関