

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590950

研究課題名（和文）

血管病変におけるNotchシグナルの役割の解析と制御による血管病治療の開発

研究課題名（英文） Regulation of Notch signal pathway in vascular lesions

研究代表者

竹下 享典 (KYOSUKE TAKESHITA)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70444403

研究成果の概要（和文）：発生期の臓器形成における多面的作用で知られる Notch シグナルであるが、動脈硬化など血管病における役割は不明であった。閉塞性動脈硬化症とパーヴァー病の患者の病理標本において、新生血管、平滑筋、炎症細胞に Notch1 受容体の発現が多く認められた(Surgery Today accepted)。Notch1 ヘテロ欠損マウス(全身および平滑筋特異的)の血管障害モデルにおける新生内膜の減少を認め、Notch1 は平滑筋の増殖、遊走能、アポトーシスに深く関わっていることを示した(Circulation2010)。さらに動脈硬化モデルである ApolipoproteinE ホモ欠損マウスに Notch シグナルを抑制する gamma-secretase 阻害薬を投与したところ炎症反応浸潤が抑制され、さらに動脈硬化巣も抑制された(Biochem Biophys Res Commun 2009)。Notch シグナルは血管病の病態に大きく関わり、治療標的となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Notch1 signaling plays pleiotropic roles in organogenesis in the developmental state. However, the pathophysiological role of Notch1 in vascular diseases has been unknown. Notch1 expression was evident in new vessels, inflammatory cells, and smooth muscle cells in arterial specimens from patients with arteriosclerosis obliterans and Buerger disease. We observed reduced neointimal formation followed by carotid artery injury in general and smooth muscle cell (SMC)-specific Notch1 heterozygous deficient mice. Notch1 signaling would be involved in proliferation, migration, and apoptosis of SMCs. We also testified the effects of Notch signal inhibitor, a gamma-secretase inhibitor (GSI: LY-411575) on suppression of atherosclerotic lesion in Apolipoprotein E deficient mice. Indeed GSI treatment suppressed infiltration of inflammatory cells and atherosclerotic lesion formation. Thus Notch1 signaling would be a potential target for vascular diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景
Notch 受容体は線虫からヒトに至るまで種を超えて保存された1回膜貫通型受容体である。

Notch シグナルの生理的作用はショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスの個体発生において精力的に解析され、多くの臓器で細

胞間相互作用を介して、細胞運命の決定を行い、殊に神経、体節形成に必須であると報告されている。申請者は血管内皮特異的 Notch1 欠損マウスの表現型より血管内皮 Notch 1 受容体は血管発生における血管リモデリング、細胞生存に重要であることを明らかにした (Takeshita K, *Circulation* 2005)。さらに血管内皮特異的 Notch1 ヘテロ欠損マウスの下肢虚血モデルにおいて成体の虚血病変における血管新生にも Notch1 受容体が重要であることを示した (Takeshita K, *Circulation Research* 2007)。これらの解析から個体発生のみならず、成体の血管病変における Notch 受容体の重要性が予想された。また、*in vitro* の検討で申請者は VEGF-PI3K axis と Notch シグナルのクロストークを報告した (Takeshita K, *Circulation Res* 2007)。このほかにも Notch シグナルは様々な細胞内シグナルとのクロストークを介して多彩な活性を呈する事が予想され、細胞内シグナル制御による新しい治療標的として期待された。

2. 研究の目的

未だ有効な治療法の模索が続いている動脈硬化、新生内膜病変、バージャー病について Notch 受容体の役割を解析して、この知見をもとに Notch シグナルの制御による血管病治療について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は血管内皮の Notch1 受容体が細胞機能に重要であること、そして個体発生における血管発生のみならず成体、殊に虚血病変における血管新生において重要であることをこれまでミュータントマウスを用いて解析し、血管病変における Notch1 受容体の重要性について検討を続けてきた (Takeshita K, *Circ* 2005, *Circ Res* 2007)。しかし、Notch1 シグナルの血管病変における役割は定かでない。これを明らかにするために、まず、ヒト血管病変の病理組織における Notch 関連遺伝子の発現を検討した。更に Notch1 のミュータントマウスに血管障害モデルを作製し、動脈硬化初期病変である新生内膜増殖について病理学的に評価した。単離平滑筋細胞の生理機能についても評価した。また、動脈硬化モデルである Apolipoprotein E 欠損マウスに Notch シグナル阻害薬 (gamma-secretase 阻害薬 (GSI): LY-411575) を投与し、動脈硬化病変抑制効果を検討した。

1. ヒト血管病変病理標本における Notch 関連分子発現の解析。
2. Notch1 遺伝子改変マウスにおける血管障害モデルの新生内膜病変の解析。

3. Notch シグナル阻害薬の動脈硬化モデル (Apolipoprotein E 欠損マウス) への影響の検討。

4. 研究成果

(1) Notch 受容体には 4 つのホモログが存在するが、平滑筋においては Notch1 と Notch3 が認められる。そこで DCA により切除したヒト冠動脈動脈硬化部位について Notch1 と Notch3 受容体の免疫組織染色を行ったところ発現はいずれも増加していた。



図 1 冠動脈硬化病変の Notch1、Notch3 の発現

さらに閉塞性動脈硬化症、バージャー病患者の検体において Notch シグナル関連蛋白の発現を検討した (Surgeon Today accepted)。両疾患群において、新生血管の内皮と中膜平滑筋に Notch1 受容体及びリガンドの Jagged-1 陽性細胞を認めた (図 1 に Notch1 の発現を示した)。

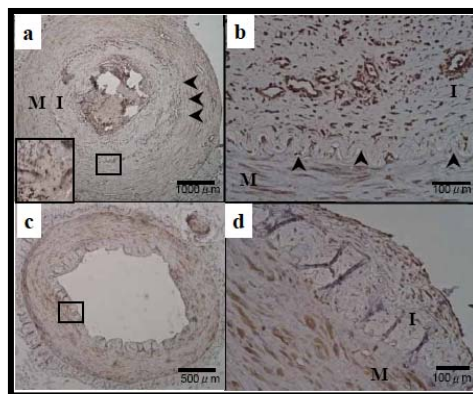


図 2 Notch1 受容体の発現

バージャー病患者の血管 (a40 倍, b400 倍 矢頭が示すように内弾性板周囲に新生血管と炎症細胞の集簇を認める) と閉塞性動脈硬化症患者の血管 (c40 倍, d400 倍) I: 内膜 M: 中膜 いずれの標本でも炎症細胞、中膜の平滑筋、新生毛細血管にシグナルを認める。

Notch 受容体のリガンドである Jagged-1、下流の転写因子である HES-1 の発現も Notch1 の発現にほぼ一致したものであり、Notch シグナルの活性化が予想された。バージャー病罹患動脈では、閉塞性動脈硬化症罹患動脈と比較して、内膜中の炎症細胞により多く

Notch1 及び Jagged-1 陽性細胞を認めた (Notch1 (%): 8.4 ± 0.76 versus 1.3 ± 0.43 , $P < .001$; Jagged-1(%): 9.3 ± 1.1 versus 5.2 ± 1.1 , $P = .03$)。

これらの検討から、Notch シグナルは血管平滑筋細胞、内皮細胞、炎症細胞の機能を制御して、血管病変において重要な役割を果たすと予想された。

(2)このように血管病の進行に Notch1 受容体が関与していると予想された。

更に内膜増殖の実験モデルである、頸動脈結紮による障害モデルを Notch1 欠損マウス(全身ヘテロマウスと平滑筋特異的ヘテロ欠損マウス)、Notch3 欠損マウスについて作成した(Circulation 2010)。Notch1 欠損マウスにおいてのみ内膜増殖は抑制されていた。

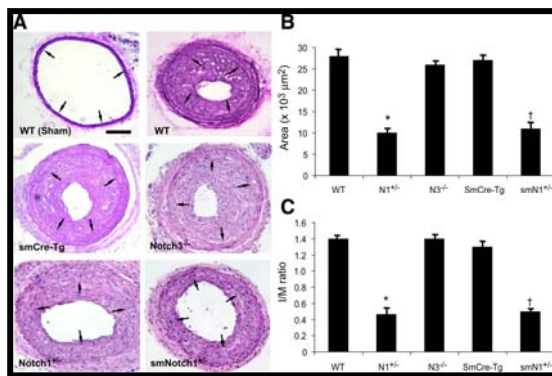


図3 頸動脈結紮後の内膜増殖 Notch1 欠損マウス(全身ヘテロマウスと平滑筋特異的ヘテロ欠損マウス)においてのみ内膜増殖は抑制された。矢印は内弾性板。A.血管の病理像、B.内膜面積 C.内膜/中膜比それぞれの定量データ。

一方、大動脈から単離した平滑筋は、同マウス由来のものは増殖、遊走能は抑制され、アポトーシスが亢進していた。Notch1 受容体の重要な下流の転写因子である CHF-1 欠損マウス由来の平滑筋は Notch1 を過剰発現させても、その遊走能は rescue されなかった。平滑筋 Notch1 受容体は、増殖、遊走能、生存を制御して内膜増殖に関与すると考えられた。

(3)更に動脈硬化モデルである Apolipoprotein E 欠損マウスに Notch シグナルを抑制する gamma-secretase 阻害薬(GSI: LY-411575)を投与して病変形成の抑制を確認した(BBRC2009)。

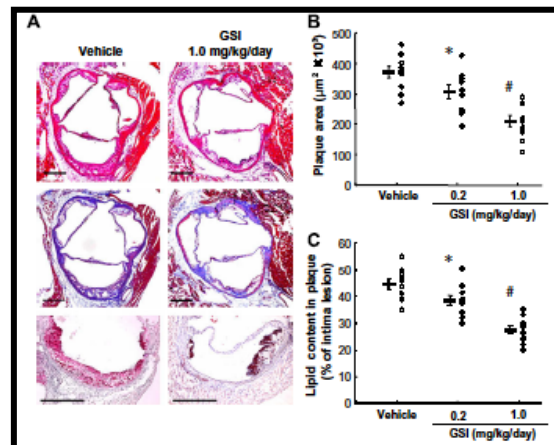


図4 Apolipoprotein E 欠損マウスの大動脈洞の動脈硬化病変は GSI 投与により抑制された。A.血管の病理像、B.プラーク面積 C.プラーク/中膜比それぞれの定量データ。

GSI 投与は血管の Notch1 の活性化を抑制し、更には炎症細胞浸潤も抑制した。単離した単球においても、接着能、遊走能の低下を確認した。

このように GSI 投与による Notch シグナルの抑制は炎症細胞(単球)の接着能、遊走能を抑制して、さらには動脈硬化病変を減少させた。

以上の結果より Notch1 シグナルは、血管病における平滑筋と炎症細胞の活性化を介して血管病を促進するため、治療標的の有力な候補として挙げられる。

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 20 件)

① Cheng XW, Kuzuya M, Huang Z, Li P, Takeshita K, Hirashiki A, Shi GP, Okumura K, Murohara T. Inhibition of mineralocorticoid receptor is a renoprotective effect of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor pitavastatin. J Hypertens. 査読あり 2011 ;29(3):542-52.

② Hayashi M, *Takeshita K, Inden Y, Ishii H, Cheng XW, Yamamoto K, Murohara T. Platelet activation and induction of tissue factor in acute and chronic atrial fibrillation:

involvement of mononuclear cell-platelet interaction. *Thromb Res.* 査読あり 2011;128(6):e113-8.

③ Kikuchi R, *Takeshita K, Uchida Y, Kondo M, Cheng XW, Nakayama T, Yamamoto K, Matsushita T, Liao JK, Murohara T. Pitavastatin-induced angiogenesis and arteriogenesis is mediated by Notch1 in a murine hindlimb ischemia model without induction of VEGF. *Lab Invest.* 査読あり 2011;91(5):691-703.

④ Kurebayashi N, Yoshikawa D, Ishii H, Sato B, Ando H, Takeshita K, Amano T, Murohara T. Impact of the low- to high-density lipoprotein cholesterol ratio on composition of angiographically ambiguous left main coronary artery plaque. *Circ J.* 査読あり 2011;75(8):1960-7.

⑤ Okumura T, Hirashiki A, Yamada S, Cheng XW, Takeshita K, Murohara T. Association between cardiopulmonary exercise and dobutamine stress testing in ambulatory patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: A comparison with peak VO₂ and VE/VCO₂ slope. *Int J Cardiol.* 査読あり 2011 Jun 2.

⑥ Shibata R, Ouchi N, Kikuchi R, Takahashi R, Takeshita K, Kataoka Y, Ohashi K, Ikeda N, Kihara S, Murohara T. Circulating omentin is associated with coronary artery disease in men. *Atherosclerosis.* 査読あり 2011;219(2):811-4.

⑦ *Takeshita K, Inden Y, Murohara T. Coincidental finding of isolated congenital double-orifice mitral valve in two adult patients. *Eur J Echocardiogr.* 査読あり 2011;12(3):E26.

⑧ Tanaka M, Ishii H, Kasuga H, Takeshita K, Yoshikawa D, Amano T, Murohara T. Ankle

brachial pressure index but not brachial-ankle pulse wave velocity is a strong predictor of systemic atherosclerotic morbidity and mortality in patients on maintenance hemodialysis. *Atherosclerosis.* 査読あり 2011;219(2):643-7.

⑨ Yoshikawa D, Ishii H, Kurebayashi N, Sato B, Hayakawa S, Takeshita K, Amano T, Uetani T, Yamada S, Murohara T. Association of cardiorespiratory fitness with characteristics of coronary plaque: Assessment using integrated backscatter intravascular ultrasound and optical coherence tomography. *Int J Cardiol.* 2011 査読あり May 31.

⑩ 菊地良介, 竹下享典, 山本晃士, 松本祐之, 松下正. 高コレステロール治療薬(スタチン)による Notch シグナルを介した血管新生メカニズムの解明. らぼ: 社団法人愛知県臨床衛生検査技師会誌. 査読なし 2011;62(2):9-14.

⑪ 住田佳陽, 平敷安希博, 奥村貴裕, 篠田典宏, 河野裕治, 諸岡貴子, 竹下享典, 松本祐之, 山田純生, 室原豊明. 拡張型心筋症における副交感神経活性の検討. 心臓リハビリテーション. 査読なし 2011;16(2):197-201.

⑫ Ii M, Takeshita K, Ibusuki K, Luedemann C, Wecker A, Eaton E, Thorne T, Asahara T, Liao JK, Losordo DW. Notch Signaling Regulates Endothelial Progenitor Cell Activity During Recovery From Arterial Injury in Hypercholesterolemic Mice. *Circulation.* 査読あり 2010;121:1104-12.

⑬ Koyasu M, Ishii H, Watarai M, Takeshita K, Amano T, Yoshikawa D, Matsubara T, Murohara T. Impact of acarbose on carotid intima-media thickness in patients with newly diagnosed impaired glucose tolerance or mild

type 2 diabetes mellitus: A one-year, prospective, randomized, open-label, parallel-group study in Japanese adults with established coronary artery disease. Clin Ther. 査読あり 2010 ;32(9):1610-7.

⑭ Nishizawa T, Cheng XW, Nagata K, Hirashiki A, Takeshita K, Izawa H, Shi GP, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T. Ca(2+) channel blocker benidipine promotes coronary angiogenesis and reduces both left-ventricular diastolic stiffness and mortality in hypertensive rats. J Hypertens. 査読あり 2010 ;28(7):1515-26.

⑮奥村貴裕, 平敷安希博, 住田佳陽, 清水優子, 河野裕治, 竹下享典, 山田純生, 室原豊明. 特発性拡張型心筋症患者における Exercise Oscillatory Ventilation に関する検討. 心臓リハビリテーション. 査読あり 2010;15(1):120-5.

⑯ Aoyama T, *Takeshita K, Kikuchi R, Yamamoto K, Cheng XW, Liao JK, Murohara T. gamma-Secretase inhibitor reduces diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり 2009;383(2):216-21.

⑰Cheng XW, Okumura K, Kuzuya M, Jin Z, Nagata K, Obata K, Inoue A, Hirashiki A, Takeshita K, Unno K, Harada K, Shi GP, Yokota M, Murohara T. Mechanism of diastolic stiffening of the failing myocardium and its prevention by angiotensin receptor and calcium channel blockers. J Cardiovasc Pharmacol. 査読あり 2009;54(1):47-56.

⑱*Takeshita K, #Li Y(equal contribution), Liu PY, Satoh M, Oyama N, Mukai Y, Chin MT, Krebs L, Kotlikoff MI, Radtke F, Gridley T, Liao JK. Smooth muscle Notch1 mediates neointimal formation after vascular injury.

Circulation. 査読あり 2009;119(20):2686-92.

⑲Yamamoto K, Shibayama S, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J. A novel cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases adipose-derived and vascular PAI-1 expression in vivo. Thromb Res. 査読あり 2009;124(5):644-5

⑳ Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J. Stress-induced PAI-1 expression is suppressed by pitavastatin in vivo. Int J Hematol. 査読あり 2009;89(4):553-4.

[学会発表] (計4件)

① Association of A Fat-Derived Hormone Omentin with Coronary Artery Disease in Men
Rei Shibata, Noriyuki Ouchi, Ryosuke Kikuchi, Ryotaro Takahashi, Kyosuke Takeshita, Yoshiyuki Kataoka, Koji Ohashi, Nobuo Ikeda, and Toyoaki Murohara
2011.11.12-16, American Heart Association, Orlando(USA)

② Prognostic Value of Heart Rate Recovery Testing in Addition to Brain Natriuretic Peptide Levels in Ambulatory Patients with Nonischemic Dilated Cardiomyopathy
Akihiro Hirashiki, Norihiro Shinoda, Takahiro Okumura, Yuji Kono, Xian W Cheng, Kyosuke Takeshita, Sumio Yamada, and Toyoaki Murohara
2011.11.12-16, American Heart Association, Orlando(USA)

③ Midkine Deteriorates Atherosclerosis by its Proinflammatory, Angiogenic and Anti-Apoptotic Functions in Apolipoprotein-E Knockout Mice
Yoshio Takemoto, Mitsuru Horiba, Masahide Harada, Kyosuke Takeshita, Toyoaki Murohara, Kenji Kadomatsu, Itsuo Kodama, and Kaichiro Kamiya

2011.11.12-16, American Heart Association,
Orlando(USA)

④Impact of Mild to Moderate Renal Dysfunction
on Left Ventricular Relaxation Function and
Prognosis in Ambulatory Patients with
Nonischemic Dilated Cardiomyopathy

Kei Ohshima, Akihiro Hirashiki, Takahiro
Okumura, Kyosuke Takeshita, Xian W Cheng,
Mutsuharu Hayashi, Yasuko Bando, and Toyoaki
Murohara

2011.11.12-16, American Heart Association,
Orlando(USA)

[その他]

ホームページ等

[http://www.athero.org/commentaries/com
m923.asp](http://www.athero.org/commentaries/com
m923.asp)

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹下 享典 (Kyosuke Takeshita)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70444403

(2)研究分担者

成 憲武 (Xian Wu Cheng)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30378228

(3)連携研究者

室原 豊明 (Toyoaki Murohara)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90299503