

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 5月20日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590315
 研究課題名（和文） 血管の恒常性破綻と病的血管リモデリングの分子基盤に関する病理学的解析
 研究課題名（英文） Pathological studies on molecular basis of failure of vascular homeostasis and pathological vascular remodeling.
 研究代表者
 中川 和憲（NAKAGAWA KAZUNORI）
 九州大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号：50217668

研究成果の概要（和文）：

動脈硬化、血管炎、血管新生病（腫瘍・糖尿病）に関する病的血管リモデリングの分子病態の検討を行った。その結果、脈管新生関連分子のみならず、炎症・自然免疫、さらには腫瘍特性にかかわる様々な分子が、血管を構成する細胞シグナルを遺伝子発現・タンパク化学レベルで統御していることが判明した。この恒常性の破綻が、細胞機能修飾をもたらし血管の正常性を失わせ、病的血管リモデリングに至ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the molecular basis of pathological vascular remodeling, we investigated on atherosclerosis, vasculitis, and angiogenic diseases (tumor, diabetes mellitus). We found that, various factors, which concerned with angio- and lymph-angiogenesis, inflammation, innate immunity, control the vascular integrity by genetic and biochemical level. The failure of vascular homeostasis lead to loss of vascular integrity and modification of cell function, result in pathological vascular remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012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：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学、発現制御、循環器、血管新生、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の成り立ちについては、内皮機能の傷害に端を発する「傷害反応説」が動脈硬化の進展を説明するものとして受け入れられている。一方、病理形態学的視点から組織を

丹念に観察すると血管への脂質の沈着やその酸化ストレスが血管の傷害の端緒ではないかとの疑問に突き当たる。これは「沈着反応説」として古くに指摘されていたが、進展に関わる「傷害反応説」の検証の一方で、「沈着反応

説」の科学的検討は置き去りにされ、動脈硬化の発症機転に関する議論は決着していない。慢性炎症過程は、炎症・免疫を基盤としたものと想定されるが、その分子機序は不明な点が多い。さらに、正常人に比べ機能破綻しているとされる糖尿病患者の血管についても微小構造変化や傷害・機能修飾機転の分子病態は、未だ正確に把握されていない。このほか、血管新生は、腫瘍、動脈硬化内膜内などにあって、病的血管リモデリングとして認められ、新生血管自体が病因として、組織や臓器の機能障害を招来する。ただ、一方で腫瘍内新生血管は、病因以外に、腫瘍の休眠誘導による治療標的や、抗ガン剤のデリバリールートとしての意義も注目されている。したがって、病態の理解と治療戦略構築には、血管の機能・成熟性などリモデリングの質的理解が求められる時代になった。従って、血管の恒常性の破綻に伴う血管リモデリングの分子基盤の理解が、現代医学の重要課題になっている。

2. 研究の目的

血管構造と機能における恒常性の破綻は、病的血管リモデリングとして、わが国の死因上位の循環器関連疾患の重要な基礎病態である。ゆえに本研究では、「病的血管リモデリングの分子機構」の解明のため、「*in vitro*」での実験的考証（血管を構成する細胞のシグナル伝達と細胞機能修飾変化）」や、「*in vivo*」での組織化学的变化（剖検人体標本等による病理組織化学的解析等）」から、病的血管の分子病態のエビデンスの集積・融合をはかり、EBMに基づく病的血管の治療、予防法の構築を指向する。

3. 研究の方法

(1) アテローム動脈硬化血管の発生初期病態、とくに前粥腫病変の成り立ちに注目し、若年者（15歳から49歳まで）の剖検症例（43例）の右冠状動脈の凍結切片を用いて、免疫組織化学的な蛋白発現と動脈硬化の進展との関連を病理形態学的に検討した。

(2) 内皮細胞機能の修飾の分子病態解析として、培養細胞血管内皮 (HUVEC) を用いた Twist1 発現制御の経路の解析を行った。また虚血下肢マウスモデルにて FGF-2 遺伝子導入による下肢脱落救済過程での Twist1 の動態解析を施行した。

(3) 腫瘍と脈管リモデリングの分子連関について以下を検討した。腫瘍増殖・転移の標的経路として注目されている STAT3 経路について、HUVEC および腫瘍細胞（肺腺癌 A549, H157）における血管作動性に関連した細胞機能（増殖、凝固示標、血管新生因子発現）への影響を検討した。

また、扁平上皮におけるリンパ管内皮マーカーのポドプラニン発現と脈管リモデリングへの影響について、発現導入細胞株、発現ノックダウン株を用いて細胞内シグナル機序を解析した。

(4) マウスに NOD1 特異的リガンドを経口ないし腹腔内投与し、血管の病理組織学的評価と遺伝子発現動態を検討した。

(5) 内皮細胞 (HUVEC、皮膚毛細血管内皮、大動脈内皮) を用いて、アンジオポエチン/Tie-2 系や機能不明の Tie1 系と VEGF 系のシグナル連関を細胞生物学的および生化学的に評価した。

4. 研究成果

(1) アテローム動脈硬化血管の発生初期病態、とくに前粥腫病変においては内膜の肥厚、脂肪沈着の増加、泡沫細胞の増加を認めた。一方、内膜平滑筋細胞 (SMC) の数は、DIT や早期病変と比較して有意な増加はなく、ヒトのアテローム性動脈硬化の早期・中期病変は、マウスモデルと違い SMC の増加でなく密度低下により形成されることが判明した。

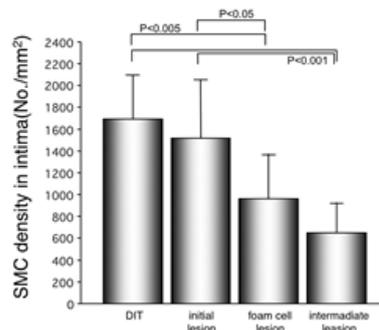


図1. 動脈硬化度と内膜内平滑筋密度

(2) 血管新生関連因子 VEGF、VEGF-C が、それぞれ内皮細胞において、腫瘍細胞で上皮間葉移行など細胞の形質変化をもたらす転写因子 Twist-1 の発現を亢進させた。これらは VEGF-R1、VEGF-R3 経路により行われ、これには細胞内の PKC や PI3K 等が介在していた。なお、R2 経路はこうした発現亢進にまったく寄与していなかった。

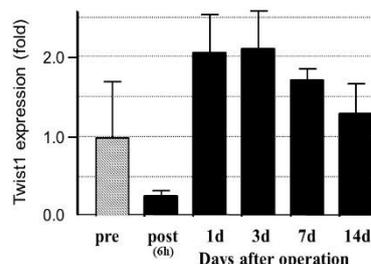


図2. マウス重症虚血下肢での Twist-1 発現

また、マウス重症虚血下肢モデルでの Twist-1 発現は、直後には低値を示すものの、術後 1 日以降の血管新生の初期段階でこれら因子にシンクロシ誘導されており、内皮細胞の虚血耐性や血管新生、リンパ管新生などに重要な役割を果たすことが示唆された (図 2)。

(3) STAT3 阻害剤 Cucurbitacin I は、血液凝固の開始因子である組織因子 (TF) 発現を誘導するほか、血管新生因子 VEGF による TF 発現誘導に相乗効果をもたらした。このことから、恒常的 STAT3 シグナルが、抗血栓的機能の維持に重要な役割を果たしうることが示唆された。

ポドプランニンが扁平上皮癌に発現した場合、JNK のリン酸化亢進を介して VEGF-C 発現低下が起こり、リンパ節転移が抑制される一方、発現が陰性化すると転移リスクが増すことが示唆された (図 3)。

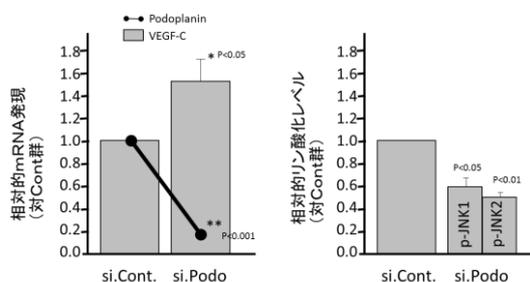


図 3 ポドプランニン発現低下は、JNK のリン酸化レベルを下げ VEGF-C 発現を亢進する。

(4) 動脈での NOD 系活性化は、大動脈根部と冠動脈起始部に部位特異的に肉芽腫性汎動脈炎を誘発した。また、炎症性サイトカイン、ケモカインや MMP 群の遺伝子発現の誘導が観察された。このことから、自然免疫が特定の動脈炎症のといった血管のリモデリングの引き金として働き、関連因子の誘導をおこし分子病態形成に至ることが判明した。

(5) 内皮細胞に発現する Tie ファミリーについて、Tie1 シグナルが血管内皮細胞での VEGF による p42/44 MAPK (ERK1/2) シグナルに影響し、内皮細胞の成長因子下流でシグナルの感受性制御に関わる可能性を示唆した。これよりリガンドも発見されておらず機能不明だった Tie1 の生理学的役割の一端をはじめて明らかにできた。

Tie2 に関して、血管の成熟安定化 (周皮細胞を伴う血管構造維持) 制御に、Tie2 の細胞外領域の可溶性変換 (シェディング) によるシグナル制御の存在を明らかにした。このシェディング機構は、(i) 低分子型、(ii) 高分子型生成の 2 経路存在し、前者には PKC-MMP14 系関連、後者には ADAM9 が深く関与し、種々の病態に伴う微小環境変化へ対応した内皮細

胞の機能修飾機構として働いていた。以上のように、内皮-周皮細胞間の情報伝達に重要な Tie-2/Ang シグナルは、複数の受容体分解制御機構により感受性制御がタンパクレベルで行われていることが明らかになった。

また、増殖性網膜症や黄斑浮腫を伴う糖尿病患者では非糖尿病患者比で可溶性 Tie2 が有意に高値であった。このことから、Tie2 の可溶性変換が、実際の血管の成熟安定化制御により病態形成に関わることが判明した。

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 6 件)

- ① Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusuhara K, Fujimoto Y, Fukase K, Sueishi K, Hara T. Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5):1093-9, 2011. (査読有).
DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.216325.
- ② Suzuki H, Onimaru M, Koga T, Takeshita M, Yano T, Maehara Y, Nakamura S, Sueishi K. High podoplanin expression in cancer cells predicts lower incidence of nodal metastasis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract.* 207(2):111-5, 2011. (査読有).
DOI: 10.1016/j.prp.2010.11.006.
- ③ Sugiyama M, Kakeji Y, Tsujitani S, Harada Y, Onimaru M, Yoshida K, Tanaka S, Emi Y, Morita M, Morodomi Y, Hasegawa M, Maehara Y, Yonemitsu Y. Antagonism of VEGF by genetically engineered dendritic cells is essential to induce antitumor immunity against malignant ascitis. *Mol Cancer Ther.* 10(3):540-9, 2011. (査読有).
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0479.
- ④ Suzuki H, Onimaru M, Yonemitsu Y, Maehara Y, Nakamura S, Sueishi K. Podoplanin in cancer cells is experimentally able to attenuate prolymphangiogenic and lymphogenous metastatic potentials of lung squamous cancer cells. *Mol Cancer.* 9:287, 2010. (査読有).
DOI: 10.1186/1476-4598-9-287.
- ⑤ Hasegawa Y, Kinoh H, Iwadate Y, Onimaru M, Ueda Y, Harada Y, Saito S, Furuya A, Saegusa T, Morodomi Y, Hasegawa M, Saito S, Aoki I, Saeki N,

Yonemitsu Y. Urokinase-Targeted Fusion by Oncolytic Sendai Virus Eradicates Orthotopic Glioblastomas by Pronounced Synergy With Interferon-beta Gene. *Mol Ther*, 18(10):1778-86, 2010. (査読有). DOI: 10.1038/mt.2010.138.

- ⑥ Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Fujii T, Sueishi K. An Autocrine Linkage Between Matrix Metalloproteinase-14 and Tie-2 Via Ectodomain Shedding Modulates Angiopoietin-1-Dependent Function in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(4):818-26, 2010. (査読有). DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.201111.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Tsukube T, Yagi N, Hoshino M, Nakashima Y, Nakagawa K, Nakamae K, Haraguchi T, Matsukawa R, Kozawa S, Okita Y: High - Resolution Visualization of Three-Dimensional Anatomical Imaging in Dissecting Aortic Wall via Synchrotron Phase Contrast X-ray Imaging. 第 77 回日本循環器学会学術集会(2013 年 3 月 16 日、東京)
- ② 鬼丸満穂:血管内皮細胞における Tie-1 による VEGF-A シグナル制御. 第 18 回九州血液血管研究会 (2011 年 11 月 05 日、福岡)
- ③ Onimaru M, Yonemitsu Y, Sueishi K. Vascular endothelial growth factor dependent p42/44 MAPK (ERK1/2) activation are regulated by Tie-1 in endothelial cells, 第 19 回日本血管生物医学学会学術集会 (2011 年 12 月 09 日、東京)
- ④ Onimaru M, Yonemitsu Y, Murakami Y, Ikeda Y, Sueishi K: PKC-MMP-14 Axis Regulates Endothelial Soluble Tie-2 (sTie-2) Production: Involvement of sTie-2 in Diabetes Mellitus-Associated Vascular Complications, American Heart Association Scientific Sessions, 2011(2011.11.13. Orlando, USA)
- ⑤ 鬼丸満穂、米満吉和、居石克夫: 血管内皮細胞における VEGF-A シグナルと Tie-1 との相互作用に関する分子病理学的検討, 第 52 回日本脈管学会総会 (2011 年 10 月 21 日、岐阜市)
- ⑥ Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Sueishi K: Identification of soluble-form extracellular Tie-2 with full

functional domains: involvement of TIMP-insensitive ADAM9 in its production in endothelial cells, The XXIII International Society on Thrombosis and Haemostasis (2011.07.26. Kyoto, JAPAN)

- ⑦ 鬼丸満穂、米満吉和、居石克夫: 血管内皮細胞における VEGF-A シグナルと Tie-1 との相互作用に関する分子病理学的検討. 第 34 回日本分子生物学会年会(2011 年 12 月 15 日、横浜)
- ⑧ 鬼丸満穂、米満吉和、居石克夫: 血管内皮細胞における Tie-2 可溶性変換機構への ADAM9 の関与, 第 18 回日本血管生物医学学会総会 (2010 年 12 月 02 日、大阪市)
- ⑨ 鬼丸満穂: 血管内皮細胞における Tie-2 可溶性変換機構への ADAM9 の関与, 九州血液血管研究会 (2010 年 11 月 27 日、福岡)
- ⑩ 鬼丸満穂、米満吉和、居石克夫: 血管内皮細胞における Tie-2 可溶性変換機構への ADAM9 の関与, 第 51 回日本脈管学会総会 (2010 年 10 月 15 日、旭川市)
- ⑪ 鈴木華子、鬼丸満穂、古賀孝臣、竹下正文、矢野篤次郎、前原喜彦、中村誠司、居石克夫: 扁平上皮細胞癌における Podoplanin の発現とリンパ節転移との病理学的検討. 第 51 回日本脈管学会総会 (2010 年 10 月 14 日、旭川市)

[図書] (計 1 件)

- ① 鬼丸満穂、米満吉和. 朝倉書店. 血管生物医学事典. 2011. 500 ページ (pp225-227, pp388-390.) 日本血管生物医学学会編

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 和憲 (NAKAGAWA KAZUNORI)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 50217668

(2) 研究分担者

古賀 孝臣 (KOGA TAKAOMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 70380615
岡野 慎士 (OKANO SHINJI)
九州大学・大学病院・臨床助教
研究者番号: 10380429
鬼丸 満穂 (ONIMARU MITSUHO)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 00380626

(3) 連携研究者

居石 克夫 (SUEISHI KATSUO)
国立病院機構福岡東医療センター
研究者番号: 70108710