

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24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790382

研究課題名（和文） 動脈硬化巣形成における造血幹細胞とトロンビン切断型オステオポンチンの役割

研究課題名（英文） The functional role of thrombin cleaved osteopontin for the pathogenesis of atherosclerosis

研究代表者

倉田 美恵（KURATA MIE）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80423440

研究成果の概要（和文）：粥状動脈硬化巣に豊富に発現しているオステオポンチン（fOPN）が凝固亢進状態でトロンビンによって切断されトロンビン切断型 OPN（trOPN）に変化することに着目し、幹細胞マーカーを持つ血管新生を伴う粥状動脈硬化巣内に trOPN が存在し、粥状動脈硬化巣が機械的に破壊されると trOPN の血中濃度は上昇することを明らかにした。さらに、trOPN は濃度依存的にマウス腹腔マクロファージに炎症性サイトカインの発現を誘導し、その効果は fOPN よりも強かった。これらのことから trOPN は血栓形成状態の診断マーカーになるのみならず治療介入の対象となりうると思われた。

研究成果の概要（英文）：Osteopontin (OPN) which produced in atherosclerotic lesions is cleaved by activated thrombin. We clarified that prevalence of trOPN around intra-plaque vessels which is characterized CD34, recognized as one of the stem cell markers, positive luminal structures. Furthermore, we confirmed that after the mechanical damage of an unstable atherosclerotic plaque increased plasma levels of trOPN. In vitro study, GST-fused recombinant trOPN induced various inflammatory cytokines stronger than fOPN, from mouse resident peritoneal macrophages in a dose dependent manner. These findings suggested that trOPN has a potential not only to be a novel biomarker that reflects the atherothrombotic status in ischemic stroke, but also to be a therapeutic target to suppress the inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症、粥状動脈硬化、オステオポンチン、トロンビン切断型オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 粥状動脈硬化の発症・進展に関与する血液幹細胞と粥状動脈硬化巣内血管新生

急性心筋梗塞や脳梗塞の病態は不安定な粥状動脈硬化の破綻と深く関与している。不安定な粥状動脈硬化の病理学的特徴として脂質に富む遍在性粥状動脈硬化、菲薄な線維性被膜、被膜における高度の炎症性細胞の浸潤と平滑筋細胞の減少、豊富な血管新生や粥状動脈硬化巣内出血、が挙げられる。病変構成細胞のなかには骨髄由来の造血幹細胞の存在が報告されており、血管新生にも促進的に働くことが推測される。しかし、何が造血幹細胞を動脈硬化巣内に動員するのか、また、動員後の細胞の機能を規定する因子については不明なことが多い。

(2) 動脈硬化巣における炎症性サイトカインオステオポンチンの役割

細胞外マトリックスでありサイトカインとしての作用も持つ分泌蛋白 オステオポンチン (OPN) は、動脈硬化巣では内皮細胞・中膜平滑筋細胞・マクロファージ・Tリンパ球などにより産生され、細胞の接着、遊走、血管新生、細胞増殖を誘導し、動脈硬化を進展させる。申請者らは以前より OPN の機能に注目して解析を行っており、本態性高血圧患者において頸動脈硬化と血漿 OPN 濃度に相関があり、OPN 濃度は CRP とアルドステロン濃度で規定されること、また、炎症惹起ホルモンであるアルドステロンを負荷することで腎線維芽細胞における OPN の過剰発現とコラーゲン産生が惹起されることを明らかにした。OPN は RGD モチーフを持ち、これが $\alpha v \beta 3$ を主とするインテグリンに結合して機能を発揮するが、同時にトロンビン切断部位を持ち、切断された OPN (trOPN) においては全長型 OPN とは別のインテグリンに親和性を示す機能的結合部位が露出して新たな機能を発揮する。この trOPN が造血幹細胞の遊走と分化・増殖の調節因子であり、かつ骨髄内にて幹細胞 niche 形成に不可欠であることが最近報告された。しかし、動脈硬化巣における trOPN の存在意義は未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではヒト動脈硬化巣における trOPN の存在の証明と血中濃度測定の意義を明らかにしたうえで、動脈硬化巣において、fOPN と trOPN が造血幹細胞の動員、血管新生、粥状動脈硬化巣の成長にどのように関与するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

臨床研究に関しては、ヘルシンキ宣言に基

づき、事前に愛媛大学倫理委員会の承認を得て行った。個人情報保護法に基づき、データ管理において個人が特定されないよう、独自のエントリー番号を作成した。

すべての動物実験は愛媛大学動物実験委員会の承認を得た後、実施した。麻酔が必要な場合は、ジエチルエーテルの吸入あるいはペントバルビタール (40mg/kg) の腹腔内投与を行った。また、すべての遺伝子組換え実験は愛媛大学総合科学研究支援センター遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た後、実施した。

(1) ヒト動脈硬化巣における trOPN の存在と血中濃度測定の意義。

① ヒト動脈硬化組織における trOPN の存在の証明のため、頸部頸動脈狭窄症例から摘出された動脈硬化組織を用いて免疫染色を行った。

② また、血中 trOPN 濃度の測定の意義を明らかにするために頸部頸動脈狭窄患者で当院もしくは関連病院の脳神経外科にて頸動脈ステント拡張術を受けた患者 (90 人) と、その対照群を症候性臓器障害がなく、内服治療を行っていない本態性高血圧患者 (23 人) の安静時血中 trOPN 濃度を測定し比較した。

③ 更にステント拡張術を受けた患者の中で 36 人は術前虚血症状の有無によって 2 群に分け、拡張術前、後の血液検査と MRI 拡張強調画像による術後新規脳虚血信号の有無、末梢保護デバイス内の血栓量を比較検討した。

(2) fOPN, trOPN の機能の差異を検討した。

C57/BL6 から採取した 腹腔常在マクロファージにコムギ胚芽無細胞蛋白合成系で作成した fOPN, trOPN を負荷し、その反応の差異を検討した。

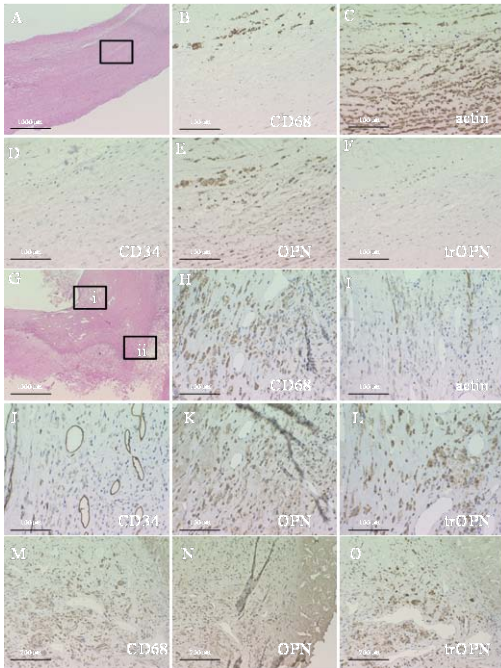
(3) ApoE^{-/-}OPN^{-/-}マウスを用いた in vivo における動脈硬化巣形成修飾の解析を行った。

動脈硬化モデルマウスである C57BL/6 -ApoE^{-/-} マウスに C57BL/6-OPN^{-/-}マウスをかけあわせ、ApoE^{-/-}OPN^{-/-}マウスを作成し、高脂肪食にて飼育した後に動脈硬化巣のサイズ、新生血管密度の差異について病理組織学的に検討した。

4. 研究成果

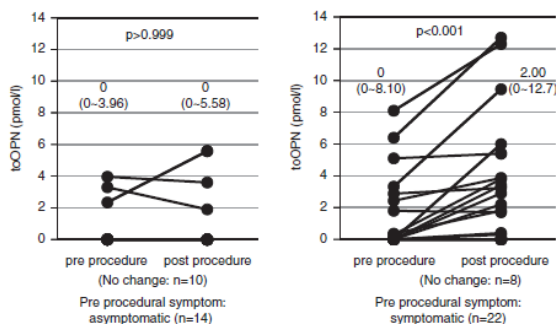
(1) ①ヒト動脈硬化巣における trOPN の存在の証明 ヒト動脈硬化巣を緩衝ホルマリンで固定後パラフィン包埋し HE 染色、エラストイカマッソン染色、免疫染色 (マクロファージ: CD68、平滑筋細胞: SMA、メモリーT細胞: CD45RO、新生血管内皮: CD34、fOPN: 抗 OPN 抗体、trOPN: 抗 trOPN 抗体) にて免疫

染色を行った。線維性肥厚は見られるが動脈硬化巣内の出血や新生血管は見られない早期病変では平滑筋細胞と同一の局在で fOPN を認めたものの trOPN は認められなかった (図 1A~F)。一方、粥状動脈硬化巣内出血を伴ういわゆる不安定な形態をもった動脈硬化巣において、CD34 陽性の新生血管が豊富な部位で trOPN がその周辺の細胞外基質と CD68 陽性細胞と同じ局在にて観察された (図 1G



~O)。図 1 粥状動脈硬化巣内新生血管周囲に trOPN が認められた

- ② 本態性高血圧患者群と比較すると頸動脈狭窄患者群の安静時 trOPN 濃度は優位に高かった。
- ③ 更に頸動脈ステント留置前・後の血中濃度の比較では術前に無症候であった群では

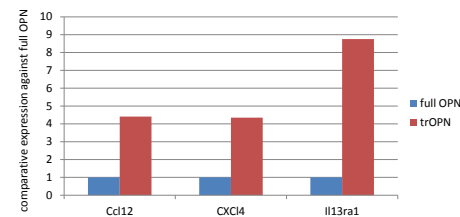


血中濃度に変化はなかったが、有症候であった群では術後に優位に上昇した (図 2)。図 2 trOPN は有症候性患者においてステント留置術後に上昇する

以上のことから、trOPN は新生血管周囲の

CD68 陽性細胞と共存し、新生血管を伴わない CD68 陽性細胞には認められないことを見いだした。このことは新生血管と trOPN との関係を示唆する所見である。さらに、粥状動脈硬化巣の機械的な破壊によって trOPN の血中濃度が上昇し、新規の脳虚血性病変の出現に関係があることを明らかにした (業績論文 1))

(2) 腹腔マクロファージに上記 fOPN, trOPN を負荷したところ、CCL12, CXCL14 などのケモカインや IL13 受容体遺伝子の発現が濃度依存性に上昇し、その程度は fOPN よりも trOPN が強かった。このことは、trOPN は fOPN



とは異なる機序で炎症を惹起していることを示唆している (学会発表 4)、5))。

図 3 trOPN によるケモカインの遺伝子発現は fOPN より強い

(3) ApoE^{-/-}OPN^{-/-}マウスを用いた in vivo における粥腫形成修飾の解析

平成 22 年度には ApoE ノックアウトマウスに OPN ノックアウトマウスとかけあわせたダブルノックアウトマウス (DKO) の作成に成功した。平成 23 年度には ApoE^{-/-}マウス、DKO マウスを高脂肪食で 8 週、12 週、24 週飼育し、大動脈の動脈硬化巣のサイズ、新生血管の密度を評価した。両系統とも週令を経るに伴い動脈硬化巣のサイズは増大し、系統間に優位な差はなかった。更に、組織学的に新生血管密度を評価したものの、その数は両群共に少なく、有意差はなかった。その原因として、マウスはヒトと異なり生理的に大動脈周囲の栄養血管を持たず、動脈硬化巣を形成してもヒトと同じ表現形を呈すとは限らないことが考えられた。今後 trOPN の血管新生に対する影響を明らかにするために vitro の血管新生の系を構築し検証していく予定である。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文] (計 3 件)

1) **Kurata M**, Okura T, Kumon Y, Tagawa M, Watanabe H, Nakahara T, Tatsuhiko M, Higaki J, Nose M. Plasma thrombin-cleaved osteopontin elevation after carotid artery stenting in symptomatic ischemic stroke patients.

Hypertens Res. 2 巻 207-212, 2012. (査読有り)

2) Irita J, Okura T, Jotoku M, Nagao T, Enomoto D, **Kurata M**, Desilva VR, Miyoshi K, Matsui Y, Uede T, Denhardt DT, Rittiling SR, Higaki J. Osteopontin deficiency protects against aldosterone-induced inflammation, oxidative stress, and interstitial fibrosis in the kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2011; 301: F833-F844. (査読有り)

3) **Kurata M**, Okura T, Irita J, Enomoto D, Nagao T, Jotoku M, Miyoshi K, Desilva VR, Higaki J. Angiotensin II receptor blockade with valsartan decreases plasma osteopontin levels in patients with essential hypertension. *J Hum Hypert.* 25 巻 334-339, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1) **Kurata M**, Okura T, Watanabe H, Kumon Y, Tagawa M, Shimazu Y, Aoba T, Nose M, and Higaki J.

Vulnerable Plaque in Atherosclerosis is Characterized by Microvasculature Involving the Vessels Derived from "Vasa Vasorum Interna".

The 61th Annual Scientific Session of the American College of Cardiology, Chicago, March 24-27, 2012,

2) **Kurata M**, Okura T, Watanabe H, Kumon Y, Tagawa M, Shimazu Y, Aoba T, Nose M, and Higaki J.

Vulnerable Plaque in Atherosclerosis is Characterized by Microvasculature Involving the Vessels Derived from "Vasa vasorum Intern".

第 76 回日本循環器学会総会. 2012. 3. 16~18

3) **倉田美恵**、大蔵隆文、入田純、長尾知明、榎本大次郎、檜垣實男. 有症候性脳虚血患者においてトロンビン切断型オステオポンチンは頸動脈ステント留置後に上昇する. 第 34 回 日本高血圧学会総会. 2011. 10. 20-22

4) **Kurata M**, Okura T, Watanabe H, Kumon Y, Tagawa M, Higaki J, Nose M. Intra-plaque vessel density, inflammatory cells and existence of thrombin-cleaved form of osteopontin are the risk factors for symptomatic stroke. *The 79th European Atherosclerosis Society Congress, Gothenburg, Sweden, 26-29 June, 2011.* 2011

5) **Kurata M**, Okura T, Tanaka Y, Miyazaki T, Nagao T, Irita J, Fujino T, Higaki J, and Nose M. Inflammatory Cytokine Expression in the Macrophage Cell Line in Response to Thrombin Cleaved Osteopontin.

The 23rds Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Vanvouver, Canada, September 26-30, 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 美恵 (KURATA MIE)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 80423440