

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591082

研究課題名(和文)血管内皮増殖因子Cの動脈硬化における役割と心血管イベントとの関連

研究課題名(英文)The relationships of vascular endothelial growth factor-C with atherosclerosis and cardiovascular events

## 研究代表者

和田 啓道(Wada, Hiromichi)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・展開医療研究部・研究室長(先端医療技術開発)

研究者番号：20416209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにリンパ管新生因子VEGF-Cが脂質異常、動脈硬化と密接に関連することを報告してきた。ヒト頸動脈プラークにおける血管新生・リンパ管新生を検討したところ、リンパ管はほとんど認められなかった。しかし動脈硬化の動物モデルに合成VEGF-C蛋白を投与しても明らかな変化を認めなかった。ヒト頸動脈プラークのマクロファージ形質指標とVEGF-Cレベルは相関しなかった。閉塞性動脈硬化症患者、薬剤溶出性ステント留置患者において血清VEGF-Cレベルが低い方が心血管イベントを発症しやすいことが明らかとなった。未だメカニズムは不明ながら、VEGF-Cが新たな心血管リスク指標になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C), a lymphangiogenic factor, is closely associated with dyslipidemia and atherosclerosis. Immunohistochemistry in human carotid atheromatous plaque revealed that lymphatics were rare in the plaque. However, an administration of recombinant VEGF-C protein did not affect the plaque size in the mouse model of atherosclerosis. On the other hand, serum levels of VEGF-C were inversely associated with future cardiovascular events not only in patients with arteriosclerosis obliterans, but also in those receiving coronary drug-eluting stent implantation. These findings suggest that a low VEGF-C value may serve as a predictor of cardiovascular events.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 心血管病

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満は、脂質異常や高血圧などの危険因子の発症に主要な役割を果たしている( )。これらの危険因子は動脈硬化の進展や心血管イベントの発症に寄与する( )。しかしながら、肥満から動脈硬化や心血管イベントを発症する直接の機序については充分には解明されていない。

(2) 脂肪組織の増生には脂肪新生(adipogenesis)と血管新生(angiogenesis)が深く関与している( )。血管新生の主たる経路は血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) が VEGF 受容体 2 を介するシグナル伝達である( )。VEGF-A は脂肪組織の血管新生活性の多くの部分を占めることが報告されている( )。さらに、肥満において血管新生が脂肪新生に必要な不可欠であることは、抗 VEGF-A 中和抗体の投与により、血管新生のみならず脂肪新生まで抑制されることにより証明された( )。肥満者の血中 VEGF-A レベルはやせた人と比べて高値であることが知られている( )。また、血中 VEGF-A レベルは body mass index (BMI) と正の相関を示し、この相関はインスリン感受性とは独立している( )。しかしながら、一般住民を対象とした横断研究の結果、血中 VEGF-A レベルと動脈硬化発症の関連はわずかであった( )。

(3) 血管内皮増殖因子 C (VEGF-C) は VEGF-A のホモログのひとつである。VEGF-C は VEGF 受容体 3 を介しリンパ管新生(lymphangiogenesis)において主要な役割を果たしている。Vegfc 遺伝子を欠失させるとリンパ管が完全に消失し、胎生致死となる( )。逆に VEGF-C をマウスの皮膚に過剰発現させるとリンパ管が過剰に形成される( )。臨床の現場において、血中 VEGF-C レベルは肺癌や胃癌を有する患者において上昇しており、リンパ節転移や遠隔転移に関連している可能性が示唆されている( )。また、血中 VEGF-C レベルは VEGF-A と同じく、肥満者において上昇している( )。しかしながら、血中 VEGF-C レベルと、体組成、脂質・代謝プロファイルなどの臨床指標、及び、動脈硬化との関連は不明である。

(4) 我々は、京都医療センターの健診受診者の内、いかなる内服治療も受けていない連続する 423 名について横断研究を施行し、血中 VEGF-A、VEGF-C レベルを測定した( )。その結果、年齢と性別で調整した後、VEGF-A レベルと VEGF-C レベルは共に BMI、腹囲と有意な正の相関を認めたと、VEGF-C よりも VEGF-A の方がそれらの肥満指標との相関が強かった。反対に、VEGF-C は総コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、non-HDL コレステロールに対して、VEGF-A よりも強い有意な相関を認めた。興味深いこ

とに、ステップワイズ回帰分析の結果、VEGF-A の独立した規定因子が BMI と年齢であったのに対し、VEGF-C の強い独立した規定因子は年齢、中性脂肪、non-HDL コレステロールであった( )。すなわち、VEGF-A が体重過多そのものに相関しているのに対して、VEGF-C は脂質異常と密接に相関していることが明らかとなった。

(5) 動脈硬化と VEGF-C の関連を明らかにするため、apolipoprotein E (apoE) 欠損マウスを用いてパイロット実験を行った。6 週齢の雄 apoE 欠損マウスに高脂肪食または正常食を与えて、16 週後に、大動脈起始部の凍結切片を作成し、動脈硬化の程度と VEGF-A、VEGF-C の発現レベルを比較検討した。その結果、高脂肪食マウスでは著明な動脈硬化が認められ、正常食ではわずかに動脈硬化が認められるのみであった。興味深いことに、VEGF-A 陽性細胞数と VEGF-C 陽性細胞数は正常食群では同程度であったが、高脂肪食群では VEGF-C 陽性細胞のみが正常食群と比較して有意に増加していた。さらに、このモデルにおいて血中 VEGF-A レベルは正常食群と高脂肪食群の間で有意差がなかったが VEGF-C レベルは高脂肪食群で有意に上昇していた。

(6) 我々は冠動脈疾患疑いで待機的に冠動脈造影を施行された連続する 759 名の横断研究を行い、正常冠動脈群、1 枝病変群、多枝もしくは左主幹部病変(重症冠動脈疾患)群に分類した。その結果、血清 VEGF-A、高感度 CRP レベルは、3 群間で有意差がなかったが、VEGF-C レベルは意外にも、冠動脈疾患重症度に従ってむしろ有意に低下していた。

(7) 治療抵抗性高血圧(refractory hypertension)患者の血中 VEGF-C レベルは上昇しており、マクロファージの VEGF-C/VEGF 受容体 3 シグナル伝達は細胞外液量と血圧の恒常性維持に主要な役割を果たしている( )。マウスに可溶性 VEGF 受容体 3 を投与して VEGF-C を中和すると高食塩食負荷による血圧上昇が亢進する( )。すなわち、マクロファージから分泌される VEGF-C は高食塩食負荷に対して代償的に増加していると考えられる。VEGF-C はリンパ管新生を誘導し、間質液のドレナージや免疫機能、炎症に関与している。したがって、血圧調節の場合と同じように、「未だ冠動脈疾患を有さないような脂質異常においては、動脈硬化性プラークの形成・拡大に対して、脂質や炎症細胞をドレナージするために、マクロファージからの VEGF-C 分泌は、代償的に亢進している」可能性がある。これに対して「重症冠動脈疾患患者においては、このマクロファージの代償機構が破綻しており、VEGF-C を充分に分泌できなくなっている」可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) 動脈硬化における VEGF-C とリンパ管新生の役割を単球/マクロファージとの関連において、動物実験、臨床研究の両面から検討する。

(2) 血清 VEGF-C レベルの臨床応用の可能性を検討するため、VEGF-C レベルと心血管イベント発症の関連を単施設研究で明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 動物実験レベルで動脈硬化における VEGF-C の役割を検討するために、ApoE 欠損マウスに高脂肪食を負荷して、合成 VEGF-C、VEGF-A、VEGFR-2、VEGFR-3 蛋白、または生食を投与して、大動脈のサンプルを確保した。Oil Red O 染色してプラークの面積を定量化、比較検討した。

(2) 臨床研究レベルでヒト頸動脈プラークにおける血管新生・リンパ管新生のバランスを免疫染色法により検討した。頸動脈プラークにおけるマクロファージの形質と血清 VEGF-C レベルの関連を検討するため、マクロファージ形質マーカーの発現レベルと血清 VEGF-C レベルの関連を検討した。

(3) ハイリスク患者である閉塞性動脈硬化症患者の血清 VEGF-C レベルと心血管イベントの関連を検討した。また、別のハイリスク群である冠動脈疾患に薬剤溶出性ステントを留置された患者における VEGF-C レベルと心血管イベントの関連を検討した。

## 4. 研究成果

(1) ApoE 欠損マウスに高脂肪食を負荷した動脈硬化モデルに、合成 VEGF-C、VEGF-A、VEGFR-2、VEGFR-3 蛋白、または生食を投与した大動脈サンプルのプラーク面積を比較した。しかしながら、各群間に有意差を認めなかった。VEGF-C を外的に導入することで動脈硬化の進展を抑制できるかどうかについては更なる検討が必要である。

(2) ヒト頸動脈プラークにおける血管内皮およびリンパ管の染色を行った結果、プラークにはリンパ管がほとんど認められなかった。しかしながら、プラークにおける M1 マクロファージ形質の指標 (TNF- $\alpha$ 、IL-6)、M2 マクロファージ形質の指標 (IL-10) の mRNA レベルと血清 VEGF-C レベルの相関を検討したところ、いずれも有意な相関を認めなかった。マクロファージの形質・機能と血中 VEGF-C レベルの関連についても更なる検討が必要である。

(3) 209 名の閉塞性動脈硬化症患者を登録し、血中 VEGF-C、VEGF-A、高感度 CRP レベル

を測定した。最大で 4 年間追跡調査した結果、VEGF-C レベルのみが、年齢、性別、危険因子で調整した後でも、将来の心血管イベント発症と有意に逆相関していた。また、冠動脈疾患に対して薬剤溶出性ステント留置治療を行われた 443 名の血中 VEGF-C、VEGF-A、高感度 CRP レベルを測定して最大 3 年間追跡調査した。その結果、やはり、VEGF-C レベルのみが、将来の心血管イベント発症と独立した逆相関を認めた。すなわち、低 VEGF-C 値はハイリスク患者における将来の心血管イベント予知マーカーとして役立つ可能性が 2 つのコホートで示唆された。

## <引用文献>

- Must A, et al. JAMA 1999; 282: 1523-1529.  
Abate N. J Diabetes Complications 2000 14: 154-174.  
Crandall DL, et al. Microcirculation 1997; 4: 211-232.  
Lohela M, et al. Curr Opin Cell Biol 2009; 21: 154-165.  
Hausman GJ, et al. J Anim Sci 2004; 82: 925-934.  
Nishimura S, et al. Diabetes 2007; 56: 1517-1526.  
Silha JV, et al. Int J Obes (Lond) 2005; 29: 1308-1314.  
Loebig M, et al. PLoS One 2010; 5: e12610.  
Sandhofer A, et al. Atherosclerosis 2009; 206: 265-269.  
Karkkainen MJ, et al. Nat Immunol 2004; 5: 74-80.  
Jeltsch M, et al. Science 1997; 276: 1423-1425.  
Tamura M, et al. Cancer 2003; 9: 1217-1222.  
Wang TB, et al. World J Gastroenterol 2007; 13: 1794-1797.  
Wada H, et al. PLoS ONE 2011; 6(12): e29351.  
Machnik A, et al. Nat Med 2009; 15: 545-552.

## 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 0 件)

[学会発表](計 11 件)

Nobutoyo Masunaga, Hironichi Wada, Masaharu Akao, Shuichi Ura, Akira Yamada, Mitsuru Abe, Mitsuru Ishii, Takashi Unoki, Moritake Iguchi, Yugo Yamashita, Yasuhiro Hamatani, Hisashi Ogawa, Daisuke Takagi, Noriko Asahara3, Akira Shimatsu, Koji

Hasegawa. Serum Vascular Endothelial Growth Factor-C Levels Inversely Associated with Risk of Cardiovascular Events in Arteriosclerotic Obliterans. 第79回日本循環器学会学術集会 2015年04月24~26日 大阪

Takashi Unoki, Hiromichi Wada, Masaharu Akao, Shuichi Ura, Akira Yamada, Yugo Yamashita, Yasuhiro Hamatani, Nobutoyo Masunaga, Mitsuru Ishii, Mitsuru Abe, Moritake Iguchi, Hisashi Ogawa, Daisuke Takagi, Noriko Asahara, Akira Shimatsu, Koji Hasegawa. Pre-procedural Serum Vascular Endothelial Growth Factor-C Levels Inversely Associated with Risk of Cardiac and Cerebrovascular Events after Drug-eluting Stent Implantation. 第79回日本循環器学会学術集会 2015年04月24~26日 大阪

Takashi Unoki, Hiromichi Wada, Masaharu Akao, Shuichi Ura, Akira Yamada, Kensuke Takabayashi, Yugo Yamashita, Yasuhiro Hamatani, Nobutoyo Masunaga, Mitsuru Ishii, Moritake Iguchi, Hisashi Ogawa, Daisuke Takagi, Noriko Satoh-Asahara, Akira Shimatsu, and Koji Hasegawa. Serum Vascular Endothelial Growth Factor-C Levels are Inversely Associated with the Risk of Cardiac and Cerebrovascular Events Following Drug-eluting Stent Implantation. American Heart Association Scientific Sessions Nov 16-19, 2014, Chicago, Illinois, USA

Nobutoyo Masunaga, Hiromichi Wada, Masaharu Akao, Shuichi Ura, Akira Yamada, Mitsuru Abe, Mitsuru Ishii, Takashi Unoki, Moritake Iguchi, Yugo Yamashita, Yasuhuro Hamatani, Hisashi Ogawa, Daisuke Takagi, Noriko Satoh-Asahara, Akira Shimatsu, and Koji Hasegawa. Serum Vascular Endothelial Growth Factor-C Levels are Inversely Associated With Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With Arteriosclerotic Obliterans. American Heart Association Scientific Sessions Nov 16-19, 2014, Chicago, Illinois, USA

Takashi Unoki, Hiromichi Wada, Masaharu Akao, Shuichi Ura, Kensuke Takabayashi, Yugo Yamashita, Yasuhiro Hamatani, Nobutoyo Masunaga, Mitsuru

Ishii, Mitsuru Abe, Moritake Iguchi, Hisashi Ogawa, Noriko Satoh-Asahara, Akira Shimatsu, Koji Hasegawa. Inverse Association of Vascular Endothelial Growth Factor-C With the Risk of Restenosis and Cardiovascular Events After Drug-Eluting Stent Implantation. American Heart Association Scientific Sessions Nov 16-20, 2013, Dallas, Texas, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.hosp.go.jp/~kyotolan/html/guide/medicalinfo/clinicalresearch/expand/translational.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 啓道 (WADA, Hiromichi)  
独立行政法人国立病院機構・京都医療センター臨床研究センター・展開医療研究部・研究室長(先端医療技術開発)  
研究者番号：20416209

### (2) 研究分担者

佐藤 哲子 (SATO, Noriko)  
独立行政法人国立病院機構・京都医療センター臨床研究センター・糖尿病研究部・研究室長(臨床代謝栄養)  
研究者番号：80373512