

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592125

研究課題名(和文) 動脈硬化性巣における新規血管新生調節因子バソヒビンの発現様式と病的意義の解明

研究課題名(英文) Expression and role of the novel angiogenic regulatory factor Vasohibin-1 in the carotid atherosclerotic plaques

研究代表者

吉田 和道 (Yoshida, Kazumichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90598921

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)：頸動脈プラークにおいて、新規血管新生調節因子であるバソヒビン-1は、正常血管内膜と比較して発現量は有意に多く、動脈硬化と関連する炎症性マーカー(ICAM-1、VCAM-1)の発現との間に強い相関関係がみられた。免疫組織学的検討では、血管内皮細胞に特異的な分子であるCD31と同じくプラーク内の新生血管内皮細胞に発現していることを確認した。本研究により、頸動脈プラークの不安定化にバソヒビン-1が強く関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：It was demonstrated in this study that the expression level of novel angiogenic regulatory factor Vasohibin-1 was significantly higher in carotid atherosclerotic plaque than normal vascular endothelium. There was also significant positive correlation in the expression level between Vasohibin-1 and atherosclerosis-related inflammation markers such as ICAM-1 and VCAM-1. Immunohistochemical investigation revealed that Vasohibin-1 was predominantly expressed in the neovascular endothelium of carotid plaques. These findings strongly suggested the contribution of Vasohibin-1 in the destabilization mechanism of carotid atherosclerosis.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：動脈硬化 不安定プラーク 頸動脈狭窄 プラーク内出血 血管新生調節因子 バソヒビン

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化性変化を基盤とする「アテローム血栓性脳梗塞」は、食生活の欧米化や高齢社会の到来により、わが国において近年急増している。従来、複数の無作為化臨床試験の結果により、狭窄率が治療方針決定の指針とされてきた。しかし、近年の動脈硬化症に関する基礎および臨床研究の知見より、頸動脈狭窄症と脳梗塞発症リスクの関連において、狭窄率のみでなく動脈硬化壁の性状も極めて大きな役割を果たすことが明らかとなってきた。

(2) 我々はこれまでに、MRI を用いたヒト頸動脈プラーク評価に関する臨床研究により、プラーク内出血・石灰化・線維性被膜などの動脈硬化巣を構成する要素が識別可能であること (AJNR 29:868-74:2008, J Neurosurg 109:1042-8:2008) MRI の T1 強調像において高信号に描出される動脈硬化巣は、新鮮なプラーク内出血を有する不安定プラークであり、狭窄率が低くとも薬物治療に抵抗して高率に脳梗塞を再発することを明らかにした (Neurosurgery 68:62-7:2011)。

(3) バソヒビン-1 とそのホモログであるバソヒビン-2 は、連携研究者である佐藤靖史らによって発見された新規血管新生調節因子である (Blood 113:4810-82009)。これまで主に悪性腫瘍を対象とする研究が進められており、バソヒビン-1 は血管新生に対して抑制的に、バソヒビン-2 は促進的に作用することが明らかにされている (J Clin Invest 114:898-907:2004)。動脈硬化巣における発現の詳細・役割は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

プラーク内出血は動脈硬化巣における脆弱な新生血管の破綻が原因であり、新生血管に対する促進・抑制の調節機能異常がプラークを不安定化させるプラーク内出血に強く関与していると推測される。本研究の目的は、将来的に不安定プラークの分子イメージングや分子標的治療薬の開発へ繋げるために、ヒト頸動脈摘出プラークにおけるバソヒビンの発現パターンを詳細に検討し、プラーク安定性との関連性を明らかにしすることである。

3. 研究の方法

(1) 頸動脈内膜剥離術を行った 12 名 (男性 11 名、女性 1 名、平均  $75.3 \pm 5.0$  歳) を対象とした。

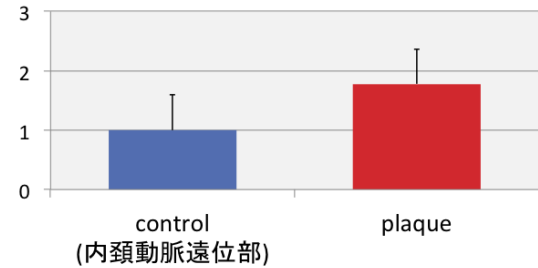
(2) 頸動脈内膜剥離術にて摘出した頸動脈プラークの標本のうち、最も内膜が肥厚した部位の mRNA を抽出し、バソヒビン-1、VEGF、ICAM-1、VCAM-1 の発現を  $\beta$ -actin を対照として quantitative real-time PCR (RT-PCR) にて評価を行った。比較対象として、摘出標本の内頸動脈遠位部側の、動脈硬化が見られない部位の内膜を用いた。

(3) 免疫組織染色を行い、頸動脈プラークにおけるバソヒビン-1 と CD31、ICAM-1 の発

現について検討した。

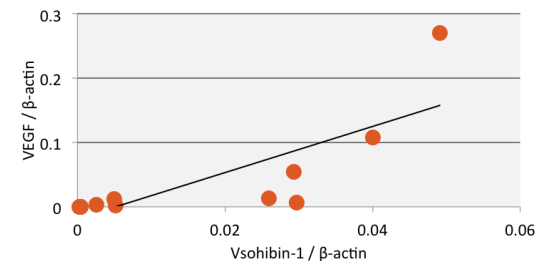
4. 研究成果

(1) RT-PCR の検討では、正常内膜と比較し、頸動脈プラーク内ではバソヒビン-1 の発現が 1.77 倍と、有意に亢進していた ( $p=0.018$ ) (図 1)。



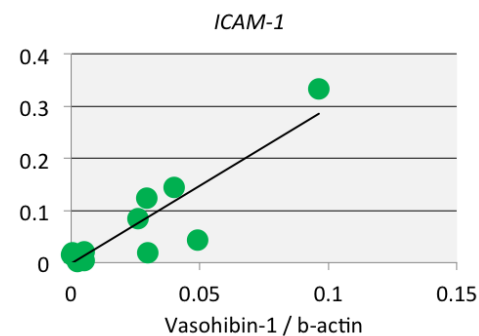
(図 1 バソヒビン-1 の発現)

またバソヒビン-1 の発現は VEGF の発現と相関し ( $r=0.788$ ,  $p=0.004$ ) (図 2)、CD31 の発現とも相関しており ( $r=0.99$ ,  $p<0.001$ )、バソヒビン-1 の発現がプラーク内の新生血管の増生を反映しているものと思われた。

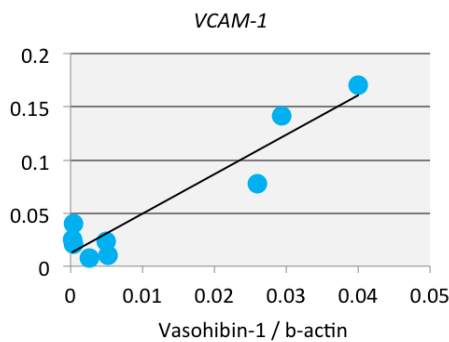


(図 2 バソヒビン-1 と VEGF)

(2) バソヒビン-1 は ICAM-1 と正の相関 ( $r=0.55$ ,  $p=0.077$ ) があり (図 3)、VCAM-1 も同様に優位に相関が見られ ( $r=0.927$ ,  $p<0.001$ ) (図 4)、プラーク内の炎症を反映しているものと思われた。

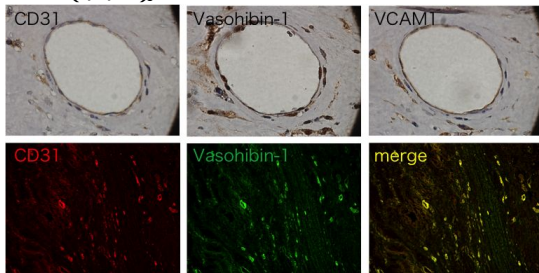


(図 3 バソヒビン-1 と ICAM-1)



(図4 バソヒビン-1とVCAM-1)

(3) 免疫組織染色では、バソヒビン-1はプラーク内の新生血管の内皮細胞に局在しており、CD31, ICAM-1とほぼ同部位に局在していた(図5)。



(図5 免疫組織染色)

#### (4) 研究成果のまとめ

RT-PCR法による頸動脈プラークにおけるバソヒビン-1の検討により、正常の血管内膜に発現しているバソヒビン-1と比較して有意に多く発現していた。また、ICAM-1、VCAM-1といった動脈硬化と関連する各種の炎症性マーカーの発現との関連を検討したところ、バソヒビン-1の発現と強い相関関係がみられ、バソヒビン-1と動脈硬化との関連が強く示唆された。バソヒビン-1の頸動脈プラーク内での発現部位に関する免疫組織学的手法による検討では、血管内皮細胞に特異的な分子であるCD31と同じくプラーク内の新生血管内皮細胞に発現していることが確認された。

本研究により、頸動脈狭窄症のプラークにおいて、新生血管内皮細胞を中心にバソヒビン-1の発現が亢進していることを明らかにし、プラークの不安定化にバソヒビン-1が強く関与している可能性が示唆された。

なお、バソヒビン-2についても同様に頸動脈動脈硬化薬における発現を検討したが、免疫染色において発現が十分に見られず、RNAの定量評価においても十分な発現量が見られなかった。

今後、プラークの不安定化の程度とバソヒビン-1の発現量および発現部位の関係を解明することにより、不安定プラークの分子イメージングおよび分子標的薬のターゲットとしてのバソヒビン-1の有用性を検証したい。

## 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1件)

Fukumitsu R, Minami M, Yoshida K, Nagata M, Yasui M, Higuchi S, Fujikawa R, Ikedo T, Yamagata S, Sato Y, Arai H, Yokode M, Miyamoto S. Expression of Vasohibin-1 in Human Carotid Atherosclerotic Plaque. 査読有 J Atheroscler Thromb. 2015 Apr 3. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計3件)

吉田 和道、福光 龍、頸動脈動脈硬化薬におけるVasohibin-1、-2の発現と病的意義について、第8回バソヒビン研究会、2013年3月2日「ラフォーレ蔵王(山形)」

福光 龍、吉田 和道、頸動脈動脈硬化薬におけるVasohibinの発現、第9回バソヒビン研究会、2014年1月11日「ラフォーレ蔵王(山形)」

福光 龍、吉田 和道、南 学、佐藤靖史、宮本 享、頸動脈プラークにおける血管新生抑制因子vasohibin-1の発現について、第73回日本脳神経外科学会総会、2014年10月9日「グランドプリンスホテル新高輪(東京)」

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 和道 (YOSHIDA, Kazumichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  
研究者番号：90598921

(2)研究分担者

荒井 秀典 (ARAI, Hidenori)  
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号：60232021

(3)連携研究者

岡田 知久 (OKADA, Tomohisa)  
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  
研究者番号：30321607

(4)連携研究者

佐藤 靖史 (SATO, Yasufumi)  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：50178779

(5)連携研究者

高木 康志 (TAKAGI, Yasushi)  
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号：40312227