

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660233

研究課題名(和文) 血管慢性炎症性変化の再構築による動脈硬化発症機序の時空間的解析

研究課題名(英文) Spatiotemporal exploration of vascular inflammation during the development of atherosclerosis

研究代表者

山脇 英之 (Yamawaki, Hideyuki)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：60399607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、心筋梗塞や脳梗塞など致死率の高い虚血性心・血管疾患の主要なリスク因子である大血管の動脈硬化症の時間・空間的制御機構を解明することを目的に実施し、その病態プロセス進展メカニズムの一端を明らかにした。具体的には、*in vitro*において白血球-内皮細胞間接着(炎症性反応)や血管内皮及び平滑筋の増殖と遊走を刺激するサイトカインを新たに同定することが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this project, I aimed to explore the mechanisms for the development of atherosclerosis that is a major risk for ischemic cardiovascular diseases including myocardial infarction and stroke. The major finding of this study is the identification of the novel cytokines that are responsible for the key pathological processes for the development of atherosclerosis including vascular inflammatory response, proliferation and migration.

研究分野：循環薬理学

キーワード：薬理学 血管 病態

1. 研究開始当初の背景

欧米先進諸国のみならず日本においても、大血管の動脈硬化症に起因する心筋梗塞・脳梗塞は死亡原因の中で上位に位置することから、その病態機序の全体像解明と治療薬開発に向けた有用なスクリーニング系の開発は急務である。このような大血管の動脈硬化症は、病理学的観点からは慢性炎症として捉えられてきたが、その時間・空間的制御機構の詳細についてはこれまで明らかにされていない。こういった現状に対する原因の1つとして、これまで動脈硬化症に対する病態解析モデルとして in vivo 動物モデルと in vitro 培養細胞系が主に用いられてきたことが挙げられる。そこで in vivo と in vitro の実験系を繋ぐことが可能である血管慢性炎症性変化の時間・空間的病態解析モデル(ex vivo)の作出が必要であると考えた。申請者はこれまで一貫して動脈硬化症、高血圧症などの病態機序解明を目指して、薬理学的側面(血管組織の収縮・弛緩機能解析)、生化学的側面(血管内皮・平滑筋細胞の炎症性シグナル解析)、そして組織・形態学的側面から基礎研究を行ってきた。その過程で、摘出血管組織の ex vivo 器官培養法を確立し、薬物・生理活性因子の血管組織の機能と形態に対する直接的かつ長期的作用を解析することを可能にした(Yamawaki et al., *Am J Physiol* 1999; *Eur J Pharmacol* 1999; *Life Sci* 2000; Morita and Yamawaki et al., *J Vet Med Sci* 2010; *Eur J Pharmacol*, 2011; *Vascul Pharmacol* 2012; Mukohda and Yamawaki et al., *Pharmacol Res* 2012; *J Vet Med Sci* 2012)。更に、血圧と血流(シアストレス)をそれぞれ独立してコントロールすることが可能である perfusion organ culture システムを確立した(Yamawaki et al., *Circulation* 2003; *J Clin Invest* 2005)。

2. 研究の目的

本研究課題は、申請者らが開発した血管組織の器官培養法を利用してそのメカニズム解明に迫る独創的かつ挑戦的研究提案である。具体的には、1) 摘出血管の器官培養の系に免疫系細胞、サイトカイン・増殖因子、酸化脂質など複数の因子を共処置することで初期炎症を誘導し、2) 炎症の慢性化のために血管外膜に栄養血管を再構築し、3) 更には血圧や血流など血行力学的要素も加える。このように ex vivo で動脈硬化症の主要病変である血管炎症性変化を再構築し、その時空間的制御機構を形態的、生化学的、機能的側面から検討することで、動脈硬化症の病態メカニズムの全貌解明に挑戦する。

3. 研究の方法

器官培養の系で慢性炎症性変化を構築する

(1) 白血球-内皮細胞間の接着を再現する: 動脈硬化症の初期病変は血管内皮の炎症性反応である(Ross *N Engl J Med* 340: 115-126, 1999; Libby *Nature* 420: 868-874, 2002.)。すなわち、傷害を受けた内皮細胞が

炎症性サイトカインを放出し、これがオートクライン的に作用して内皮細胞に接着因子が発現誘導される。また、同時にケモカインも放出され単球・マクロファージが内皮細胞に遊走し接着する。そこでまず、血管内皮を軽く擦ることにより傷つける、炎症性サイトカイン TNF- α とケモカイン MCP-1等を処置する、単球・マクロファージ(THP-1細胞)を co-culture する、これら3つの処置で白血球-内皮細胞間接着の ex vivo での再現を試みる。

(2) 単球・マクロファージによる酸化脂質の貪食と、内膜下への遊走を再現する: 次に培養液中に酸化 LDL、脂肪酸等を処置し、高脂血症状態にする。(1)で接着した単球・マクロファージが脂質を貪食するのか確認する。脂質を貪食した白血球が内膜下に侵入するには、血管透過性が亢進することが必要であるので、プロスタノイド、ヒスタミン、VEGF等を処置する。

(3) 中膜平滑筋細胞の内膜への遊走・増殖: 新生内膜(プラーク)の形成には、内膜下への白血球の侵入とともに、中膜平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖が必要である。そこで、平滑筋の遊走・増殖を刺激する細胞増殖因子 PDGF および胎児血清(FBS)等を処置し、中膜平滑筋の遊走と内膜での増殖の再現を試みる。

(4) 血管周囲外膜に栄養血管を再構築する: 動脈硬化症は慢性炎症性疾患であり、炎症の慢性化のためには血管新生が重要である。実際に動脈硬化血管では血管周囲外膜に血管新生が認められ、内膜病巣部に対する栄養血管として機能する。血管新生は主に内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成により構築される。そこで、外膜における血管新生を刺激するために、1)マトリゲル(新田ゼラチン社製)中に血管組織を静置し、2)血管内皮細胞と co-culture する、そして3)内皮細胞の増殖・遊走を刺激する VEGF, FGF 等の処置を行い、外膜栄養血管の再構築を試みる。

この時、 といった因子の組み合わせが(1)(2)(3)(4)の過程を ex vivo で最も効率よく再現するのかと、それらに最適な処置時間を主に組織・形態学的アプローチから条件検討する。そして、生化学的側面から血管内皮、平滑筋、免疫系細胞においてこういったシグナル因子(MAPキナーゼ、NF- κ B、Akt、JAK/STAT等)活性化が炎症性変化の再現により重要であるかをウエスタンブロッティング、転写活性測定(レポーターアッセイ)などにより同定する。更に、機能的側面から血管系本来の生理機能である収縮・弛緩作用がそれぞれの過程で経時的にどのように変化するのかを薬理的に検討し明らかにする。

Ex vivo の器官培養系に血行力学的パラメーターを加え、立体的に再構築する生体における血管は常に血行力学的パラメーター(血圧、シアストレス、ストレッチ

チ etc)にさらされており、動脈硬化症の進展にも大きな影響を与えることから、これらの影響を検討する。

(5) 血圧: 高血圧は動脈硬化症の主要なリスク因子の1つである。したがって、perfusion organ culture システムを用いて、器官培養血管に圧を負荷する(60 mmHg の低灌流圧から 180 mmHg の高灌流圧までを検討)。培養液として上記で条件検討した様々な因子を含むものを使用し、圧負荷が動脈硬化症進展の各プロセス((1)から(4)参照)に及ぼす影響を検討する。

(6) 血流(シーアストレス): 動脈硬化症は、血管分岐部など血流が乱れる部位(遅くて乱流)に頻発する一方で、steady laminar flow(早い層流)部では、おこりにくい(Berk *Circulation* 117:1082-1089, 2008.)。またエクササイズ(運動)による血流増加は動脈硬化発症に対して保護的に働くことが知られている。したがって次に、灌流圧を一定に維持(平均 100 mmHg)した状態で、低速(0.4 dyn/cm²)の乱流(リバースフロー)を perfusion organ culture システムで負荷する。ここでも、培養液として条件検討した様々な因子を含むものを使用し、シーアストレスが動脈硬化症進展の各プロセス((1)から(4)参照)に及ぼす影響を検討する。

(7) 血圧とシーアストレスの同時負荷: 高血圧(平均灌流圧 180 mmHg)状態で低速の乱流を負荷し、動脈硬化症の各プロセスに及ぼす影響を(5)(6)と同様に検討する。

この時、上記(5)-(7)において、どういった血行力学的パラメーター及び各因子との組み合わせが *ex vivo* で最も効率よく血管炎症性変化を再現するのに適しているのかと、その最適な処置時間を主に組織・形態学的アプローチから検討する。そして、生化学的側面から血管内皮、平滑筋においてどういったシグナル因子活性化が重要であるかを同定すると同時に、機能的側面から血管の収縮・弛緩作用が経時的にどのように変化するのも薬理的に明らかにする。

4. 研究成果

研究の方法(1)に関して、*in vitro* において白血球-内皮細胞間接着を刺激するサイトカインを新たに同定することが出来た(学会発表3)。(3)に関して、血管平滑筋の増殖と遊走を刺激する新たなサイトカインをいくつか同定することができた(学会発表2、3、5)。(4)に関しては神経栄養因子としても知られ動脈硬化血管の外膜に強く発現することが知られている brain-derived neurotrophic factor (BDNF)が血管内皮細胞において活性酸素種の産生を介して血管新生を促進することを初めて明らかにした(発表論文1:学会発表4、6、7)。同様に BDNF が血管平滑筋細胞において増殖を刺激する

可能性が示された(学会発表1)。

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)

1. Usui T, Naruo A, Okada M, Hayabe Y, and Yamawaki H. Brain-derived neurotrophic factor promotes angiogenic tube formation through generation of oxidative stress in human vascular endothelial cells. *Acta Physiol (Oxf)*, 査読有, 211: 385-394, 2014. With Editorial commentary.

[学会発表](計 7件)

1. Otani K, Okada M, Yamawaki H. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells. The 88th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2015/03/18 (Nagoya Congress Center, Nagoya).

2. Sekiguchi A, Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. Effects of fatty acid-binding protein(FABP)4 on proliferation of vascular smooth muscle cell. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2014/3/19 (Sendai International Center, Sendai).

3. Hayabe Y, Usui T, Okada M, and Yamawaki H. Nesfatin-1, a novel adipocytokine, stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2014/3/19 (Sendai International Center, Sendai).

4. Yamawaki H. Brain-derived neurotrophic factor promotes angiogenesis via oxidative stress in human vascular endothelial cells: Implication for atherogenesis? 第39回日本微小循環学会総会(AKPS 研究集会共催)招待講演). 2014/2/7 (北里大学白金キャンパス、東京).

5. 國本秀瑞垂、高井瑞穂、岡田宗善、山脇英之. アディポサイトカイン chemerin は血管平滑筋細胞の増殖及び遊走を促進する. 第23回日本循環薬理学会. 2013/12/6 (福岡大学、福岡).

6. 臼井達哉、成尾明浩、岡田宗善、山脇英之. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)は酸化ストレス産生を介して血管新生を促進する. 第156回日本獣医学学会学術集会. 2013/9/20 (岐阜大学、岐阜).

7. 臼井達哉、成尾明浩、岡田宗善、山脇英之 . Brain- derived neurotrophic factor (BDNF) による血管新生制御メカニズムの解明. 北里大学第 26 回バイオサイエンスフォーラム. 2013/8/9 (北里大学相模原キャンパス、神奈川).

〔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

北里大学獣医薬理学研究室ホームページ
<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山脇 英之 (Yamawaki Hideyuki)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：60399607

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：