

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860565

研究課題名(和文) 活性型第X凝固因子によるマクロファージ活性化を介した新しい動脈硬化進展機序の解明

研究課題名(英文) Activated Factor X - Protease-Activated Receptors Signaling Promotes Vascular Inflammation and Atherosclerosis

研究代表者

原 知也 (HARA, Tomoya)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：00644577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：FXaの受容体(PAR-1とPAR-2)は動脈硬化血管で増加する。Rivaroxaban(FXa阻害薬)やPAR-2の欠損が、ApoE欠損マウスにおける大動脈の炎症や動脈硬化病変の形成を抑制する。特にマクロファージを中心とした骨髄由来細胞のPAR-2が、大動脈の炎症や動脈硬化病変の形成に関与する。FXa - PAR-2経路は、マクロファージを中心とした血管構成細胞の炎症反応を促進する。

研究成果の概要(英文)：FXa-PARs signaling participates in the development of vascular inflammation. Results of our study suggests that this signaling pathway serves as a potential therapeutic target for atherosclerosis.

研究分野：動脈硬化

キーワード：マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は世界的な規模で急速に増加している。動脈硬化に基づく虚血性心疾患や脳血管障害は、生命予後の悪化や生活の質の低下、ならびに医療経済上の負担を招いており、現代の人類にとって、最大の健康問題のひとつとなっている。一般的に、「動脈硬化性疾患は、マクロファージを中心とした慢性炎症を基盤として発症する」という考え方が広く受け入れられている。しかしながら、マクロファージを中心とした慢性炎症を惹起するメカニズムについては、十分に明らかになっておらず、予防方法や治療方法の開発についても、十分確立されたとは言えない。

以前より、血液凝固反応と炎症反応の間には密接な連関が存在することが示唆されていたが、近年の研究により、血液凝固因子は血栓形成に関与するのみならず、様々な細胞・経路を介して炎症を惹起することが明らかとなった。凝固因子と炎症反応のクロストークの中心的な役割を担うと推定されているのが、protease-activated receptor (PAR)である。現在4種類のPARs (PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4) がクローニングされているが、PARs は血管内皮細胞や血小板をはじめとした全身の組織・臓器で発現しており、多彩な生理作用を示すことが示唆されている。様々な血液凝固因子の中で、トロンビンや活性化凝固第X因子 (FXa) が PARs のリガンドとして作用することが知られている。血管内皮細胞においては、凝固因子が PARs を介して炎症を惹起することが指摘されている (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23:931-9)。

しかしながら、これまでのところ、凝固因子によるマクロファージの活性化を介した炎症反応と動脈硬化病変の形成に関しては検討されていない。また、マクロファージにおける PARs の発現の有無や役割に関しては十分な検討がなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、「活性型第 X 凝固因子 (FXa) が、マクロファージにおける炎症を惹起し、動脈硬化病変を形成する」という仮説をたて、その分子メカニズムを解明し、動脈硬化性疾患に対する新たな治療戦略の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、動脈硬化に対する凝固因子と PARs の役割を明らかにするため、以下の実験を行う。

### (1) トロンビンや FXa によるマクロファージ活性化の検討 (in vitro)

マウスのマクロファージ系培養細胞である RAW264.7 細胞を用い、FXa による、マクロファージからの炎症性物質の発現 (活性化) を、PAR-2 との関連性を含めて解析する。凝固因子 - PARs シグナルの炎症性サイトカイン発現 (マクロファージ活性化) における役割を多面的に検討するため、実験を行う。また、野生型マウスと PARs 欠損マウスから、チオグリコレート刺激によって、腹腔内マクロファージを採取し、PAR-2 のアゴニストを作用させる。炎症性物質 (MCP-1 や MMP-9 など) の発現は定量的 RT-PCR (qPCR) や Western blotting などで検討する。( 実験・解析の一部は平成 27 年度にも、引き続き行なう )

### (2) PAR-2 シグナルの動脈硬化病変形成における役割の検討 (in vivo)

#### FXa 阻害薬投与マウス

動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスに生後 8 週から西洋食および FXa 因子阻害薬を 20 週間与え、動脈硬化病変を誘導する。病理組織学的手法を用いて、大動脈の動脈硬化病変の多寡 (Sudan 染色など) や、マクロファージ浸潤の程度 (免疫組織染色など)、さらに、qPCR や Western blotting など、様々な分子生物学的手法を用いて、新規経口抗凝固薬の有無や違いによる炎症および動脈硬化形成の性状・程度を比較する。

#### PAR-2/ApoE 両遺伝子欠損マウスと ApoE 単独欠損マウス

PAR-2 欠損マウスと ApoE 欠損マウスを交配し、二重欠損マウスを作製する。西洋食負荷によって誘導される動脈硬化病変の大きさやプラーク性状、炎症性物質の発現などを通常の ApoE 欠損マウスと比較検討する。( 実験・解析の一部は平成 27 年度にも、引き続き行なう )

#### 骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスと骨髄特異的 PAR-2 発現マウスを用いた検討

FXa が PAR-2 を介してマクロファージを活性化し、炎症を惹起して動脈硬化病変形成に重要な役割を果たすという仮説を証明するため、Table 2 に示す組み合わせの骨髄移植を行い、骨髄特異的 PAR-2 欠損マウスと骨髄特異的 PAR-2 発現マウスを作製し、西洋食負荷下での動脈硬化性変化の程度・性状を、同時に作製する各コントロール用骨髄移植マウスと比較する。動脈硬化病変の多寡や、分子生物学的機序は、計画 2-(1) と同様に解析を行なう。

この実験により、骨髄由来細胞 (マクロファージ) の PAR-2 の動脈硬化病変形成における役割が明らかになる ( 骨髄の置換率検討など、骨髄移植に関する予備実験は平成 26 年度から行う )

### (3) マクロファージの PAR-2 活性化にお

## るシグナル伝達系の解析

PAR-2 による細胞内シグナル伝達は、共役する G 蛋白を介することが報告されているが、それ以降の、特にマクロファージにおける詳細なメカニズムに関しては、十分知られていない。そこで、本研究では、実験計画 1 に示したマクロファージの活性化を検討する系に、様々なシグナル伝達経路の阻害剤を作用させて、関与する経路をスクリーニングし、その上で、関連因子を siRNA でノックダウンすることで、その経路の関与を確認する。さらに、各シグナル伝達系の reporter を用いた reporter assay などを併用し、総合的に関連シグナル伝達系を検討する。これらの実験は、PAR-2 制御による、動脈硬化性疾患の治療や予防方法の開発を視野に入れた際、非常に重要である。

## 4. 研究成果

(1) 活性型第 X 凝固因子(FXa)によるマクロファージ活性化の検討を *in vitro* で検討した。マウスのマクロファージ系培養細胞である RAW264.7 細胞や、野生型マウスの腹腔内マクロファージを用いて定量的 RT-PCR 法で検討した。その結果、FXa がマクロファージに作用し、炎症性物質の発現を亢進させることを明らかにした。また、FXa の作用受容体である protease-activated receptor(PAR)-1 や PAR-2 に対する選択的アゴニストを投与したところ、同様に炎症性物質の発現が亢進した。このことから、FXa が PAR をシグナルを介して炎症性サイトカインの発現を促進するという新規の知見を得た。

(2) 動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスに生後 8 週から西洋食および FXa 因子阻害薬又は偽薬を 20 週間与え、動脈硬化の形成を比較した。病理組織学的解析にて、FXa 因子阻害薬により大動脈の動脈硬化病変の形成が抑制され、動脈硬化薬におけるマクロファージ浸潤やコラーゲン分解が有意に抑制された。また FXa 因子阻害薬の投与群では大動脈壁における炎症性物質の発現が有意に抑制された。このことから、生体内において FXa が動脈硬化の形成や不安定化、動脈の慢性炎症に寄与するとの新規の知見を得た。

(3) PAR-2 欠損マウスと ApoE 欠損マウスを交配し、二重欠損マウスを作製し、西洋食負荷によって誘導される動脈硬化病変の大きさやプラーク性状、炎症性物質の発現などを通常の ApoE 欠損マウスと比較検討した。その結果、二重欠損マウスでは有意に動脈硬化の形成や不安定化、大動脈壁の炎症が少なかった。このことから、FXa の作用受容体である PAR-2 のシグナルが動脈硬化の形成や不安定化、動脈の慢性炎症に寄

与するとの新規の知見を得た。

## 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 1 件)

Tomoya Hara, Daiju Fukuda, Kimie Tanaka, Yasutomi Higashikuni, Yoichiro Hirata, Sachiko Nishimoto, Shusuke Yagi, Hirotsugu Yamada, Takeshi Soeki, Tetsuzo Wakatsuki, Michio Shimabukuro, Masataka Sata. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2015 Oct;242(2):639-646. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.023. (査読有)

[学会発表](計 5 件)

Tomoya Hara, Daiju Fukuda, Kimie Tanaka, Yasutomi Higashikuni, Yoichiro Hirata, Shusuke Yagi, Takeshi Soeki, Michio Shimabukuro, Masataka Sata. Critical Role of Bone Marrow Protease-Activated Receptor-2 in the Pathogenesis of Vascular Inflammation and Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice 第 80 回日本循環器学会学術集会 国際会議場(宮城県仙台市) 2016/03/20

原 知也, 福田大受, 田中君枝, 東邦康智, 平田陽一郎, 八木秀介, 添木 武, 鳥袋充生, 佐田政隆. プロテアーゼ活性化受容体 2 によるマクロファージ活性化を介した新しい動脈硬化進展機序の検討 第 45 回日本心臓血管作動物質学会 国際会議場(徳島県徳島市) 2016/02/06

原 知也, 福田大受, 田中君枝, 東邦康智, 平田陽一郎, 八木秀介, 添木 武, 鳥袋充生, 佐田政隆. FXa - PAR-2 経路は血管の慢性炎症を惹起し動脈硬化を促進する 第 19 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 国際会議場(兵庫県神戸市) 2015/12/11

Tomoya Hara, Daiju Fukuda, Kimie Tanaka, Yasutomi Higashikuni, Yoichiro Hirata, Sachiko Nishimoto, Shusuke Yagi, Hirotsugu Yamada, Takeshi Soeki, Tetsuzo Wakatsuki, Michio Shimabukuro, Masataka Sata. Inhibition of Activated Factor X Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis in ApoE-deficient Mice 第 79 回日本循環器学会学術集会 国際会議場(大阪府大阪市)

2015/04/25

Tomoya Hara, Daiju Fukuda, Kimie Tanaka, Yasutomi Higashikuni, Yoichiro Hirata, Sachiko Nishimoto, Shusuke Yagi, Hirotsugu Yamada, Takeshi Soeki, Tetsuzo Wakatsuki, Michio Shimabukuro, Masataka Sata . Inhibition of Activated Factor X Attenuates Neointima Formation after Wire-Mediated Vascular Injury 第 79 回日本循環器学会学術集会国際会議場（大阪府大阪市） 2015/04/25

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

原 知也 (HARA, Tomoya)  
徳島大学・病院・医員  
研究者番号 : 00644577