

# 研究結果報告書

2014年1月25日

## 血管外膜および周囲組織による動脈硬化病変調節機構の解明と

### 新規動脈硬化治療法の開発

研究代表者 東京大学保健・健康推進本部 助教 田中 君枝

#### 【まとめ】

動脈硬化は日本人の主要な死因である心疾患、脳血管疾患の原因となる。動脈硬化病変は、傷害を受けた血管内皮細胞の炎症が血管外膜側に波及して進展すると考えられていた。しかし最近では、病変の進展に伴い血管外膜の微小血管が増殖し、病変の形成と進展に関与すると考えられている。この研究では、高脂血症モデルマウスを用い、病変局所の血管外膜微小血管増殖の調節による、動脈硬化治療の可能性について検討した。

#### 1. 研究の目的

##### 1-1

悪性新生物に続き日本人の死因の第2位、第3位を占める心疾患、脳血管疾患の主な原因は動脈硬化である。動脈硬化は生活習慣病と深い関連があり、加齢自体が危険因子の一つである。動脈硬化の成因を探り、新しい有効な治療法を開発することの重要性は、高齢化に伴いさらに増している。動脈硬化は、Rossの仮説において、血管内皮細胞の障害による炎症に始まり、炎症が外側に波及して拡大するとされている。一方で、動脈硬化病変の外膜側に、病変の進展

に伴い外膜微小血管の増殖が起こることも古くから報告されている。外膜微小血管は正常な状態では血管外膜側を栄養する血管であるが、動脈硬化病変の拡大に伴い増殖し、動脈硬化病変内に血管外膜側から侵入し、病変内部に炎症細胞や脂質を送り込む導管の役割を果たすと言われている。しかし、血管外膜および微小血管の機能は完全には解明されていない。この研究の目的は、動脈硬化病変を持つ血管の外膜に注目し、外膜側から内膜側に向かう動脈硬化調節機構を解明することである。

##### 1-2

研究には、動脈硬化モデルマウス（apolipoprotein E欠損マウス, ApoE-/-マウス）を用いる。動脈硬化病変において、病変局所の外膜微小血管を調節することにより、病変自体も調節されうるか、また、その際には外膜にはどのような変化が生じるのかを明らかにする。抗癌剤のような、血管新生抑制作用を持つ薬剤は、全身投与により副作用を生じる場合が多く、動脈硬化治療として血管新生抑制薬の全身投与が臨床応用されるとは考えにくい。そのためこの研究では、動脈硬化局所への投与によ

## る、動脈硬化抑制作用を検討する。

### 2. 研究方法と経過

#### 2-1 血管の観察方法

ApoE<sup>-/-</sup>マウスは動脈硬化モデルマウスであり、大動脈外膜に微小血管増殖も生じることが報告されていたが、組織標本で、免疫染色により数  $\mu\text{m}$  の外膜微小血管を可視化する場合、動脈硬化病変を持つ血管の外膜は炎症により非特異的反応が生じやすく、困難であった。研究代表者は、内皮細胞マーカーであるトマトレクチン（ビオチン付き）を、血管検体採取前に灌流して染色し、その後でパラフィン包埋し、組織切片を作成後にアビジン・ビオチン反応および Vector-Red (Vector) を用いて発色させることにより明瞭に描出する方法を考案した (Tanaka K, Atherosclerosis. 2011;215:2:366-73.)。本研究でもこの方法を用いて、外膜微小血管染色を行った。

#### 2-2 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの動脈硬化病変の観察

普通食投与にて飼育した ApoE<sup>-/-</sup>マウスの腹部大動脈の動脈硬化病変の自然経過を観察したところ、50 週令程度までの小さな動脈硬化病変には外膜微小血管を認めず、脂肪線条を持つような病変に進展してから（70 週令程度）増殖した外膜微小血管を認めた。このことから、血管新生抑制薬による外膜微小血管増殖抑制と動脈硬化病変への影響を検討するためには、動脈硬化病変がある程度形成された高齢のマウスを用いる必要があると考えられた。

#### 2-3 実験モデル

動脈硬化病変局所に薬剤を投与する実験方法として、後腹膜下の腹部大動脈周囲に、ジェルに混合した薬剤を注射針を用いて注入すること予定していたが、2-2 より、血管新生抑制薬による外膜微小血管抑制効果を観察するためには、高齢マウスを使用する必要があるが、開腹手術による侵襲に耐えられない可能性が考えられた。そこで、手術侵襲の少ない大腿動脈を実験に使用することを着想したが、高脂血症マウスで大腿動脈に微小血管増殖を伴う動脈硬化病変が自然に形成されるのか明らかでなかったため、7 週令から高脂肪食を投与した高齢 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大腿動脈を、2-1 に記載したビオチン付きトマトレクチン灌流による微小血管染色を施行した後に採取し、パラフィン包埋し、鼠径部より連続 40 断面の薄切スライドを作成して観察した。

#### 2-4 血管新生阻害薬の局所投与

2-3 の観察の結果より、大腿動脈を用いて観察を行うこととした。血管新生抑制作用を持つ、成長因子阻害薬であるスラミンを、ポリ乳酸 (PLA) に含有させて徐放化した (スラミン+PLA)。7 週令から高脂肪食を投与した 40 週令 ApoE<sup>-/-</sup>マウスの右大腿動脈周囲に、Pluronic F-127 gel 50 $\mu\text{l}$  と混合して粘性を持たせたスラミン+PLA (スラミン含有量 1.1 $\mu\text{g}$ ) を、25G 針を用いて注入した。左大腿動脈周囲には、gel 50 $\mu\text{l}$  のみを投与した。10 週間後に 2-1 の微小血管染色を行ったのち左右大腿動脈を採取してパラフィン包埋し、鼠径部より 100 $\mu\text{m}$  おき 5 断面の切片を作成し、病変の有無と外膜微小血管を観察した。右大腿動脈周囲にスラ

ミンを含有しない PLA のみ、左大腿動脈周囲に gel のみを投与する群も作成した。

### 2-5 免疫染色

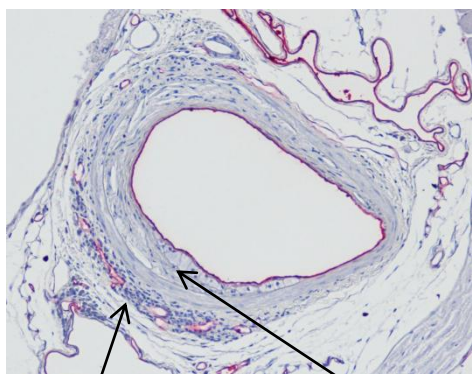
作成した組織標本を用い、抗 CD3 抗体 (T 細胞マーカー)、抗 Mac3 抗体 (マクロファージマーカー)、抗 b-FGF (fibroblast growth factor) 抗体、抗 PDGF (platelet derived factor) 抗体、抗 P2Y6 抗体 (プリン受容体) を用いた免疫染色を行った。

## 3. 研究結果

### 3-1 ApoE-/-マウスの大腿動脈に自然発症する動脈硬化病変

48-52 週令 ApoE-/-マウス (n=5) の両側大腿動脈 (n=10) を観察したところ、6 つの大腿動脈に、動脈硬化病変と増殖した外膜微小血管を認めた。これより、高齢 ApoE-/-マウスの大腿動脈では、機械的な血管傷害を加えなくても、動脈硬化病変が形成され外膜微小血管増殖を伴うことが確認された。

#### 52 週令 ApoE-/-マウス大腿動脈



外膜微小血管 (赤) 動脈硬化病変

### 3-2 スラミン投与による外膜微小血管と動脈硬化病変の形成抑制

40 週令 ApoE-/-マウス (n=12) の右大腿動脈周囲にスラミン+PLA、左大腿動脈に

gel のみを投与し、10 週間後に観察した。1本の血管につき 5 断面ずつ、病変の有無について観察したところ、右 (スラミン+PLA 投与側) の病変形成が抑制されており、病変面積も小さかった。

### 左大腿動脈 (gel のみ投与) 病変の有無

(○=動脈硬化病変有)

Mouse	断面				
	1	2	3	4	5
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	○	○	—	—	—
6	○	—	—	—	—
7	○	○	○	○	—
8	○	—	—	—	—
9	○	○	—	—	○
10	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—

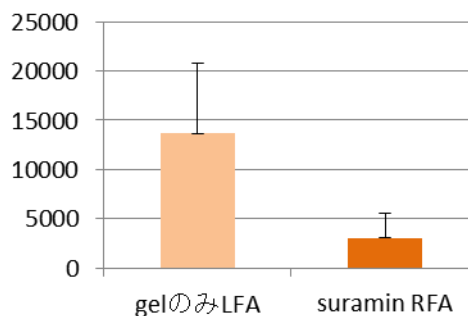
### 右大腿動脈 (スラミン+PLA 投与)

病変の有無

Mouse	断面				
	1	2	3	4	5
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
6	○	○	—	—	—
7	—	—	—	—	—
8	○	○	—	—	—
9	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—

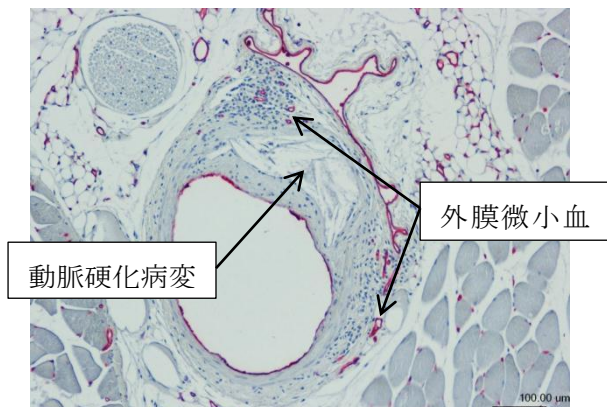
カイ二乗検定 P<0.05

### 動脈硬化病変の面積 (μm<sup>2</sup>)

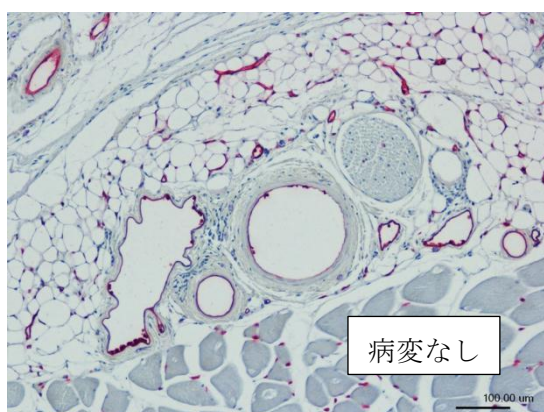


(LFA: 左大腿動脈, RFA: 右大腿動脈)

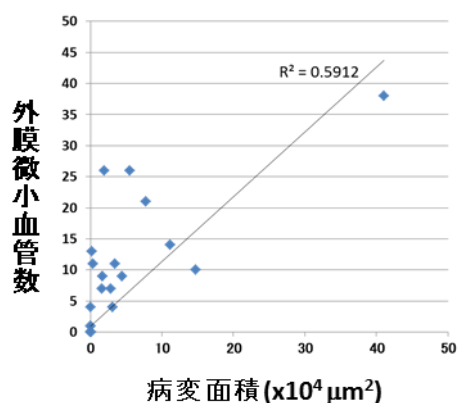
### 左大腿動脈 (gel のみ投与)



### 右大腿動脈 (スラミン+PLA 投与)



外膜微小血管数と病変面積には正の相関が認められた。(R<sup>2</sup>=0.5912)



右大腿動脈にスラミンを含有しないPLA、左大腿動脈に gel のみを投与した群では、このような差は認めなかった。

以上より、スラミンにより、血管外膜微

小血管の増殖が抑制され、動脈硬化病変の形成と拡大も抑制される可能性が示された。

### 3-3 微小血管周囲の炎症細胞の集積

外膜微小血管の周囲には、抗 CD3 陽性細胞 (T 細胞)、抗 Mac3 陽性細胞 (マクロファージ) のなど炎症細胞の集積を認めた。

### 3-4 スラミンの多様な作用

スラミンは b-FGF 作用阻害による血管新生抑制の他、平滑筋細胞増殖に関与する PDGF や、動脈硬化と関連するプリン受容体 P2Y6 を抑制する作用も持つとされている。40 週令 ApoE<sup>-/-</sup>マウス的大腿動脈をこれらの抗体を用いて免疫染色したところ、特に動脈硬化病変部位で、PDGF や P2Y6 の発現も認めた。これより、スラミンの病変抑制作用には、血管新生抑制以外の作用も影響している可能性があると考えられた。

## 4. 今後の課題

以上のように、血管新生抑制作用を持つ薬剤の局所投与により、血管外膜微小血管増殖と動脈硬化病変の形成と拡大が抑制される可能性が示された。しかし、スラミンによる他の成長因子の抑制作用も関与している可能性がある。今後、血管新生抑制作用を持つ他の薬剤でも検討する必要がある。

## 5. 研究成果の公表方法

この研究結果は、American Heart Association Scientific Session 2012(2012 年 11 月ロサンゼルスで開催)、第 77 回日本循環器学会学術集会 (2013 年 3 月横浜で開催) で発表した。現在、学術誌への投稿準備中である。