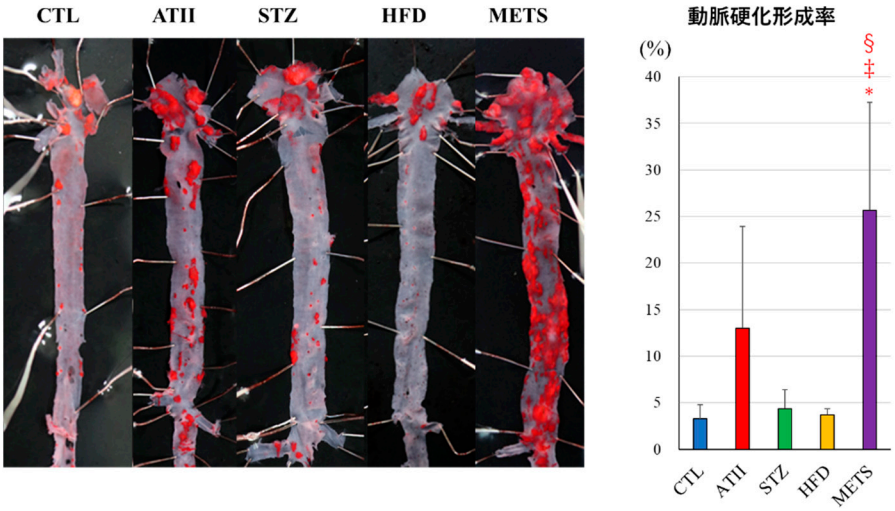
181　アテローム性動脈硬化症の新規診断、治療薬の開発	末松　保憲

【目的】アテローム性動脈硬化症は致死性心血管疾患を引き起こす。アテローム性動脈硬化症の研究は臨床的ニーズのある研究である。高血圧症、糖尿病、脂質異常症はアテローム性動脈硬化症のリスク因子であり、それぞれ個別のアテローム性動脈硬化症への関わりについては多く研究されてきた。しかし、メタボリック症候群におけるアテローム性動脈硬化症の病態生理については、あまり報告がない。本研究は、メタボリック症候群におけるアテローム性動脈硬化症の発生機序について解明し、関わる血管内皮細胞受容体やリガンドを特定することで、アテローム性動脈硬化症の診断薬、治療薬を開発していくことを目的とした。

【方法】12 週雄性アポ E ノックアウトマウスに 12 週間高脂肪食を負荷して、脂質異常症の病態を作製した。更に 12 週時から浸透圧ポンプを用いて、0.7 mg/kg/day アンジオテンシンⅡの持続皮下投与を 12 週間行い、高血圧症の病態を作製した。また、18 週時に 80 mg/kg ストレプトゾトシンを腹腔内投与することで、2 型糖尿病の病態を作製し、メタボリック症候群モデル（METS 群）とした。この他、コントロール（CTL 群）、アンジオテンシンⅡ（ATⅡ群）、ストレプトゾトシン（STZ 群）、高脂肪食（HFD 群）の単独投与モデルも作製し、その違いを評価した。主要評価項目はアテローム性動脈硬化症であり、摘出した大動脈をオイルレッド O 染色して評価した。また大動脈の組織学的な評価も行った。その他の評価項目としては、体重、非観血的血圧、血糖値、血中脂質パラメーター、その他の肝機能や腎機能等の血液検査を行った。経胸壁心エコー検査で心機能も評価した。これらの評価項目が CTL 群と比較して、疾患モデルにより異なるかどうかを評価した。

【結果】体重は HFD 群と METS 群の 2 群で経時的に増加しており、高脂肪食の影響と考えられた。血圧は ATⅡ群での上昇はなかったが、METS 群で上昇していた。血糖値は STZ 群を含めて、いずれの群でも有意差を認めず、ストレプトゾトシン 80 mg/kg は血糖値を上昇させるには、今回のマウス群では低用量であった。血液検査では HFD 群の AST、ALT、LDH といった肝機能が上昇しており、脂肪肝が考えられた。METS 群でも肝機能増悪を認めたが、有意な上昇ではなかった。脂質パラメーターでは HFD 群で有意差を認めなかった、METS 群で LDL-C、HDL-C が有意に増加した。主要評価項目である動脈硬化形成率の図を示した。仮説通り、METS 群で高く、次に高いのは ATⅡ群であった。また、大動脈の組織学的評価では、特に細胞間接着分子 1 のメッセンジャーRNA 発現量が METS 群で増加しており、今後のアテローム性動脈硬化症の診断薬、治療薬の開発に活用できる可能性が示唆された。

各群における動脈硬化形成率の違い



181. アテローム性動脈硬化症の新規診断、治療薬の開発

末松　保憲

福岡大学 医学部 心臓・血管内科学

Key words：動脈硬化モデルマウス，メタボリック症候群，細胞間接着分子 1

緒　言

高血圧症、糖尿病、脂質異常症はアテローム性動脈硬化症のリスク因子であり、それぞれ個別のアテローム性動脈硬化症への関わりについては多く研究されてきたが、メタボリック症候群におけるアテローム性動脈硬化症の病態生理については、あまり報告がない。メタボリック症候群のような複合的な病態では、どのようにお互いが作用しているか分からない。臨床では単一の病態によってアテローム性動脈硬化症が引き起こされることは少ないため、複合的な病態でのアテローム性動脈硬化症の発生機序に関する研究はトランスレーショナルである。本研究では、特に血管内皮細胞に注目し、メタボリック症候群におけるアテローム性動脈硬化症の発生機序について解明し、関わる血管内皮細胞の受容体やリガンドを特定することで、今後のアテローム性動脈硬化症の診断薬、治療薬の開発に繋げる事を目的とした。

単独の疾患モデルとメタボリック症候群モデルマウスを作製し、その動脈硬化形成率を評価した。結果、メタボリック症候群モデルマウスでは他群と比較して明らかに動脈硬化形成率が高い事が分かった。また血管内皮細胞受容体については、特に細胞間接着分子 1 のメッセンジャーRNA 発現量が増加しており、今後のアテローム性動脈硬化症の診断薬、治療薬の開発に活用できる可能性が示唆された。

方　法

1. 実験方法

本実験は福岡大学遺伝子組換え実験等安全員会及び動物実験委員会で承認され、実施した。

12 週雄性アポ E ノックアウトマウスに 12 週間高脂肪食（Clea Japan HFD32、CLEA Japan, Inc.、Japan）を負荷して、脂質異常症の病態を作製した。12 週時から浸透圧ポンプ（ALZET osmotic pump、Muromachi Kikai Co., Ltd.、Japan）を用いて、0.7 mg/kg/day アンジオテンシンⅡの持続皮下投与を 12 週間行い、高血圧症の病態を作製した。浸透圧ポンプはその持続期間から 18 週時にポンプの入れ替えを行った。18 週時に 80 mg/kg ストレプトゾトシンを腹腔内投与し、2 型糖尿病の病態を作製し、メタボリック症候群モデル（METS 群）とした。この他、アンジオテンシンⅡ持続皮下のみ（ATⅡ群）、ストレプトゾトシンのみ（STZ 群）、高脂肪食のみ（HFD 群）も作製し、その違いを評価した。主要評価項目は摘出した大動脈をオイルレッド O 染色し、大動脈起始部から腎動脈分岐部までの動脈硬化形成率で評価した。その他、体重、非観血的血圧（tail cuff-based MK-2000 device、Muromachi Kikai Co., Ltd.、Japan）、血糖値、血中脂質パラメーター、肝機能や腎機能等の血液検査、経胸壁心エコー検査で心機能を評価した。また、大動脈における messenger ribonucleic acid（mRNA）発現量を real-time polymerase chain reaction（RT-PCR）法で評価した。

2. 心機能評価

経胸壁心エコー検査は NEMIO SSA-550A（Toshiba、Japan）を用いて、12、24 週齢時に行った。M モードで乳頭筋レベルの短軸像を描出し、左室拡張末期径、左室収縮末期径、心室中隔壁厚、左室後壁厚、左室駆出率、左室内径短縮率を測定した。

3. 組織学的評価

過去に報告したものと同じ方法で行った［1］。摘出した大動脈全体から RiboPure RNA Purification Kit（Life Technologies、Carlsbad、CA、USA)を用いて RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Kit（TOYOBO、Japan）を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix（TOYOBO、Japan）を用いて、7500 Fast Real-Time PCR System（Applied Biosystems、USA）で RT-PCR を行った。 血管内皮細胞に発現し、アテローム性動脈硬化症に特に関与する受容体やリガンドである Scavenger Receptor Class B Member 1（SR-B1）、Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1（LRP-1）、LRP-5/6、apolipoprotein E receptor 2（ApoER2）、very-low density lipoprotein receptor（VLDLR）、cluster of differentiation 36（CD36）、lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1（LOX-1）を測定した。結果はβ actin をハウスキーピングとし、解析を行った。

4. 病理学的評価

摘出した大動脈全体をオイルレッド O 染色し、大動脈起始部から腎動脈分岐部までの動脈硬化形成率を調査した。

5. 統計学的方法

統計学的解析は SAS（version 9.4、SAS Institute Inc.、USA）を用いて行った。結果は平均値±標準偏差で表記した。解析は CTL 群、ATⅡ群、STZ 群、HFD 群、METS 群の 5 群を分散分析して行い、p 値<0.05 を有意とした。

結　果

1.　体重、血糖値の変化

体重は実験開始の 12 週齢時、CTL 群よりも ATⅡ群は有意に重かったが、その他の群で CTL 群との有意差を認めなかった（CTL 群：27.5±1.3 g、v.s. ATⅡ群：28.8±1.4 g、p=0.03）（図 1）。体重は HFD 群と METS 群の 2 群で経時的に増加しており、高脂肪食の影響と考えられた。血糖値は実験開始時から終了時まで通じて、各群に有意差を認めなかった。

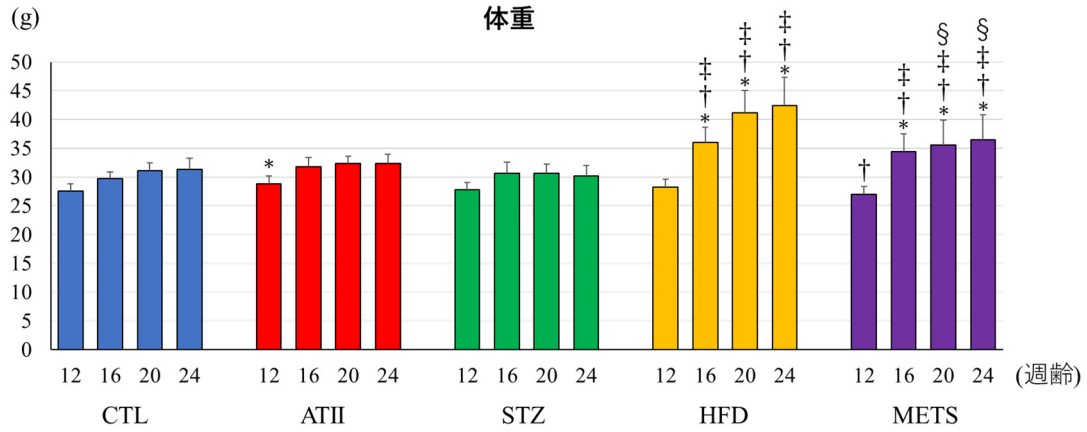


図 1.　体重の変化

12 週齢から 24 週齢までの体重変化を示した。*は CTL 群との、†は ATⅡ群との、‡は STZ 群との、§は HFD 群との、同じ週齢での有意差を示した。

2.　血圧の変化

血圧は実験開始時に他の群と CTL 群との間に有意差を認めなかった（図 2）。ATⅡ群は 24 週齢になっても有意な上昇を認めなかった。経過中に HFD 群と METS 群で血圧上昇を認め、24 週齢の METS 群では平均血圧、拡張期血圧が CTL 群と比較して有意に上昇した。また、STZ 群では CTL 群よりも有意に血圧が低下していた。

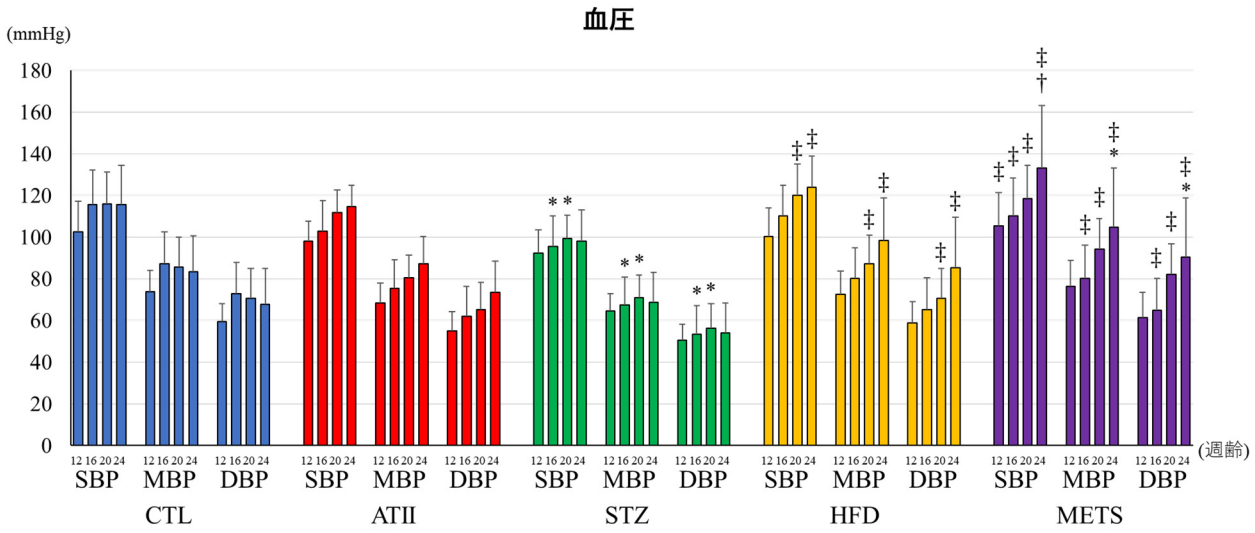


図 2. 血圧の変化

12 週齢から 24 週齢までの血圧変化を示した。SBP：収縮期血圧、MBP：平均血圧、DBP：拡張期血圧を示した。*は CTL 群との、†は ATⅡ群との、‡は STZ 群との、同じ週齢での有意差を示した。

3. 血液検査、心機能の変化

24 週齢時の血液検査結果を表 1 に示した。肝機能が明らかに HFD 群で増加していた。また脂質パラメーターについては METS 群でのみ LDL-C や HDL-C の上昇を認めた。心機能は 12 週齢時と 24 週齢時に経胸壁紫苑エコー検査を施行し評価したが、実験開始時の 12 週齢時には他の群と CTL 群との間に有意差を認めなかった。24 週齢時には ATⅡ群と STZ 群において、左室駆出率と左室内径短縮率が CTL 群と比較して有意に低下していた。

表 1. 24 週齢時血液検査結果

	CTL	ATII	STZ	HFD	METS
BUN, mg/dl	39.1 ± 6.1	36.9 ± 1.9	37.7 ± 2.0	26.4 ± 2.1 *†‡	42.6 ± 8.3 §
CRE, mg/dl	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.06	0.10 ± 0.05	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.01 *†
AST, IU/l	68 ± 33	49 ± 8	40 ± 8	467 ± 228 *†‡	100 ± 43 §
ALT, IU/l	20 ± 5	21 ± 4	18 ± 2	319 ± 88 *†‡	81 ± 54 §
LDH, IU/l	20 ± 75	180 ± 24	132 ± 20	1068 ± 634 *†‡	481 ± 127 §
HbA1c, %	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.3	5.0 ± 0.3
TG, mg/dl	85 ± 34	75 ± 16	106 ± 51	101 ± 27	133 ± 60
LDL-C, mg/dl	113 ± 35	88 ± 20	119 ± 12	116 ± 13	142 ± 24 †
HDL-C, mg/dl	10.7 ± 3.6	14.7 ± 3.3	14.3 ± 3.0	21.5 ± 7.0	30.5 ± 9.4 *†‡

24 週齢時の血液検査の結果を示した。*は CTL 群との、†は ATⅡ群との、‡は STZ 群との、§は HFD 群との有意差を示した。

4. 動脈硬化形成率の違い

24 週齢時の動脈硬化形成率を病理学的に評価した。大動脈起始部から腎動脈分岐部までのオイルレッド O 染色率を測定した。結果、METS 群では他群と比較しても明らかに動脈硬化形成率が高く、次に動脈硬化形成率が高いのは ATⅡ群であることが明らかとなった（図 3）。

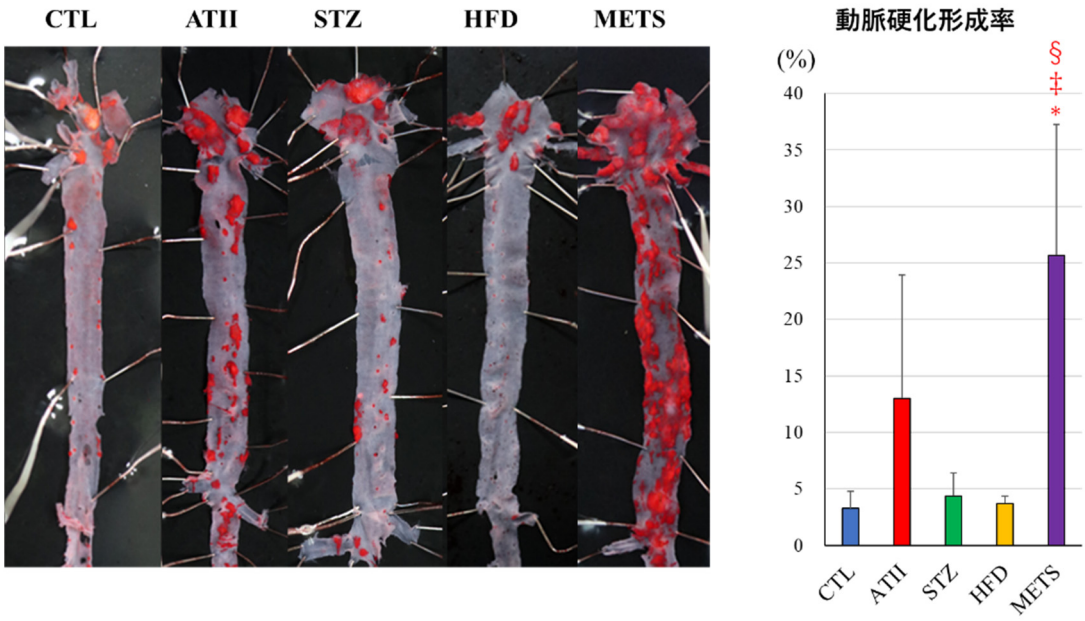


図 3. 動脈硬化形成率

左にオイルレッド O 染色標本、右に大動脈起始部から腎動脈分岐部までの動脈硬化形成率結果を示した。*は CTL 群との、†は ATⅡ群との、‡は STZ 群との、§は HFD 群との有意差を示した。

5. 発現する血管内皮細胞受容体やリガンドの違い

大動脈での mRNA の発現量を RT-PCR で測定したところ、動脈硬化によって発現量が変化すると考えられたスカベンジャー受容体クラス B メンバー1、血管内皮増殖因子 A、LDL 受容体関連タンパク質 1 の発現量は特に変わらなかったが、METS 群において細胞間接着分子 1 の発現量が高くなっていた。

考 察

本研究ではコントロール群以外に単独の基礎疾患と比較しても、複合疾患であるメタボリック症候群モデルマウスでは動脈硬化形成率が明らかに高い事が分かった。今回のメタボリック症候群モデルマウスでは体重と血圧の有意な上昇、LDL-C の上昇を認め、動脈硬化形成に寄与している可能性が考えられた。また血管内皮細胞受容体やリガンドとして、特に細胞間接着分子 1 の発現量が高くなっており、今後のアテローム性動脈硬化症の診断薬、治療薬の開発に役立つ可能性が示唆された。

動脈硬化に関して最近注目されているスカベンジャー受容体クラス B メンバー1［2］や LDL 受容体関連タンパク質［3］の mRNA 発現量が変化するかどうか測定したが、今回のモデルでは特に変化を認めなかった。摘出した大動脈での mRNA 発現量の変化としては、METS 群で細胞間接着分子 1 の発現量が高くなっていた。細胞間接着分子 1 は動脈硬化進展時に白血球が血管内皮細胞に接着するために重要な分子であり、今後更に研究を行っていきたい。

各単独疾患モデルでは、メタボリック症候群モデルマウスへ投与した際の侵襲的負担を考え、なるべく低用量で投与する方針とした。糖尿病モデルは既報を参考にし、6 週間の高脂肪食負荷後に 80 mg/kg のストレプトゾトシンを腹腔内投与するモデルとした［4］が、結果、今回の STZ 群では有意な血糖値や HbA1c 値の上昇を認めなかった。METS 群でも血糖値や HbA1c 値の上昇を認めず、ストレプトゾトシン投与量の増加や他の方法を考慮する必要があると考えられた。高血圧モデルは既報から高脂肪食負荷と 0.7 mg/kg/day アンジオテンシンⅡ持続皮下投与とした［5］が、血圧の上昇は認めなかった。しかし METS 群では有意な血圧上昇を認め、ATⅡ群では METS 群に続いて 2 番目に動脈硬化形成率が高く、アンジオテンシンⅡは高用量投与によって腹部大動脈瘤を形成してしまうため、今回の投与量とし

ては 0.7 mg/kg/day が妥当であると考えられた。高脂肪食は脂肪カロリー比 56.7%と脂質の割合が高いものを選択した。これは以前我々が行った研究において、脂肪カロリー比 43%では動脈硬化があまり形成されなかった［1］事に基づき選択したものであり、METS 群では脂質の上昇を認めたため、妥当であったと考えられた。

複合疾患であるメタボリック症候群モデルマウスでは動脈硬化形成率が明らかに高い事が分かった。また血管内皮細胞として、特に細胞間接着分子 1 の発現量が高くなっており、今後のアテローム性動脈硬化症の診断薬、治療薬の開発に役立つ可能性が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、福岡大学医学部心臓・血管内科学の三浦伸一郎教授、田代浩平先生、出石礼仁先生、森田英剛先生、中井寛治さん、富田サヨさんであり、多大な協力に感謝したい。

文　献

1) Suematsu Y, Tashiro K, Morita H, Ideishi A, Kuwano T, Miura SI. Angiotensin Receptor Blocker and Neprilysin Inhibitor Suppresses Cardiac Dysfunction by Accelerating Myocardial Angiogenesis in Apolipoprotein E-Knockout Mice Fed a High-Fat Diet. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2021;2021:9916789. Epub 2021/08/17. doi: 10.1155/2021/9916789. PubMed PMID: 34394711; PubMed Central PMCID: PMCPMC8357528.

2) Huang L, Chambliss KL, Gao X, Yuhanna IS, Behling-Kelly E, Bergaya S, et al. SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. Nature. 2019;569(7757):565-9. Epub 2019/04/26. doi: 10.1038/s41586-019-1140-4. PubMed PMID: 31019307; PubMed Central PMCID: PMCPMC6631346.

3) Mueller PA, Zhu L, Tavori H, Huynh K, Giunzioni I, Stafford JM, et al. Deletion of Macrophage Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) Accelerates Atherosclerosis Regression and Increases C-C Chemokine Receptor Type 7 (CCR7) Expression in Plaque Macrophages. Circulation. 2018;138(17):1850-63. Epub 2018/05/26. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031702. PubMed PMID: 29794082; PubMed Central PMCID: PMCPMC6343494.

4) Huang R, Shi Z, Chen L, Zhang Y, Li J, An Y. Rutin alleviates diabetic cardiomyopathy and improves cardiac function in diabetic ApoEknockout mice. Eur J Pharmacol. 2017;814:151-60. Epub 2017/08/23. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.08.023. PubMed PMID: 28826911.

5) Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. Circulation. 2001;103(3):448-54. Epub 2001/02/07. doi: 10.1161/01.cir.103.3.448. PubMed PMID: 11157699.