

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590416

研究課題名（和文）動脈硬化血管における新しいヒスタミンの機能

研究課題名（英文）Novel function of histamine in atherosclerotic artery

研究代表者

谷本 昭英 (TANIMOTO AKIHIDE)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10217151

研究成果の概要（和文）：

血管壁でのヒスタミンと動脈硬化の関連について、apoE-KO マウスとヒスタミン受容体欠損マウス（H1R および H2R）あるいはヒスタミン合成酵素（HDC）欠損マウスを交配した2重欠損マウスを作成した（apoE-H1R-DKO, apoE-H2R-DKO および apoE-HDC-DKO マウス）。高コレステロール食（12週間：1.25% コレステロール、15% ラード、0.5% コール酸）投与により粥腫形成を誘導し、各マウスについて、病理形態学的評価、動脈硬化関連の炎症因子等の遺伝子発現をRT-PCRなどで検討した。高コレステロール食により、apoE-H2R-DKO および apoE-HDC-KO マウスでは、apoE-KO マウスより重篤な高脂血症を呈するにも関わらず、粥腫形成はむしろ抑制されており、動脈硬化病変の炎症を惹起する炎症性サイトカインやスカベンジャー受容体の発現は減少していた。apoE-KO マウスを背景にした粥腫モデルにおいて、ヒスタミン2型受容体によるシグナルは血管壁での炎症制御を介して病変形成に重要な働きをしている。

研究成果の概要（英文）：

The relation of histamine signaling in the arterial wall and atherogenesis was investigated using apoE-H1R-KO, apoE-H2R-KO and apoE-HDC-KO mice. The mice were fed by high cholesterol diet (1.25% cholesterol, 15% lard and 0.5% cholic acid) for 12 weeks, and pathological examination and expression of inflammation-related genes were evaluated in the aortas. Even the high cholesterol diet induced much higher hypercholesterolemia in apoE-H2R-KO and apoE-HDC-KO mice, the atherosclerotic lesion formation and expression of many inflammation-related genes were reduced in these KO mice than in apoE-KO mice. The histamine signaling mediated through H2 receptor would play a pivotal role in atherogenesis by regulating the inflammatory response in the vascular wall.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総 計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：動脈硬化、ヒスタミン、ヒスタミンレセプター(HR)、ヒスチジン脱炭酸酵素、HDC/apoE-KO マウス、HR/apoE-KO マウス、スカベンジャー受容体、炎症因子

1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化巣には組織球などの炎症細胞が浸潤し、血管内皮や平滑筋などの血管細胞の反応と相まって、病変の形成・進展を規定している。粥状動脈硬化巣で見られる炎症反応はこれらの細胞から分泌されるサイトカインや炎症性物質の複雑なネットワークにより調節され、血管壁以外で見られる炎症巣と共通した機序が考えられている。

一方、ヒスタミンは古典的な炎症物質であり、肥満細胞から脱顆粒により放出される。冠状動脈の外膜に浸潤する肥満細胞からのヒスタミン等の放出は、急性冠症候群の原因のひとつに指摘されている。肥満細胞以外のヒスタミン産生細胞として、動脈硬化病変に存在する組織球、Tリンパ球がある。これらの細胞には顆粒がなく、ヒスタミン産生酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素の発現増加によりヒスタミン産生が亢進し、慢性的なヒスタミン放出に関連している。ヒスタミンの血管壁での作用は、急性炎症反応だけでなく、遺伝子発現を介した慢性作用も知られている。ヒスタミン1型受容体を介して内皮接着分子の発現を増強させ、内皮と平滑筋の一酸化窒素合成酵素の転写を増加させる。また、2型受容体を介して組織球のVEGFの発現を増強する。これら遺伝子発現を介した慢性的反応は、慢性的なヒスタミン刺激（慢性的なヒスタミン産生）が関与している。

我々は、粥状動脈硬化巣の組織球がヒスチジン脱炭酸酵素（Histidine decarboxylase; 以下 HDC）を発現することを見だし、ヒスタミンが単球のTNF、MCP-1、酸化LDL受容体の発現を増強させることを報告した。組織球由来のヒスタミンは粥状動脈硬化病変での慢性的なヒスタミン供給源であり、単球や平滑筋において種々の遺伝子発現を調整している可能性が示唆された。さらに、マウス頸動脈の結紮によって誘導される内膜肥厚が、HDC欠損マウスでは軽減することを示し、HDCを発現する単球・組織球が骨髄由来であることを証明した。apoE-KOマウスの粥腫を構成する組織球も骨髄由来で、ヒスタミンを産生することを示した。

これらのことは単球・組織球によるヒスタミン産生が血管壁での遺伝子発現調節を介した炎症反応の制御に強く関わっており、動脈硬化形成に直接関与していることを示している。

2. 研究の目的

血管壁における炎症調整物質、あるいは遺伝子発現調整物質としてのヒスタミンと動脈硬化の関連をさらに探り、動脈硬化におけるヒスタミンの役割を解明することで、薬理学、病理学、循環器病学をも含む新しいヒスタミン研究を展開することである。ヒト動脈硬化

病変は、組織球が主体の粥状硬化と平滑筋が主体の内膜肥厚とに大別されており、両モデルをHDCあるいはヒスタミン受容体KOマウスに導入する。つまり、1) 粥状動脈硬化を自然発症するapoE-KOマウスにHDCあるいはヒスタミン受容体の遺伝子欠損を導入した2重KOマウスを作製する。2) 受容体KOマウス（1型受容体と2型受容体）の動脈結紮による内膜肥厚モデルを作成する。以上をもって、粥状動脈硬化と内膜肥厚の形成が、動脈硬化血管でのヒスタミン機能とどのように関わるのかを比較検討する。

3. 研究の方法

2重KOマウスの作製: apoE-KOマウスとHDC-KOマウスを交配し、2重KOマウス（apoE-HDC-KO）を作製した。また、apoEとヒスタミン1型受容体（H1R）、apoEとヒスタミン2型受容体（H2R）の2重KOマウス（apoE-H1R-KOおよびapoE-H2R-KO）を作製した。すべての実験には雄性マウスを用いた。

粥状動脈硬化病変の作製: 各KOマウスを高コレステロール食（cholesterol 1.25%, 15% lard, 0.5% cholic acid）で飼育し、粥状動脈硬化を経時的（6-9-12週）に観察した。

粥状病変の肉眼的検索: 経時的にマウスを全身麻酔下において屠殺し、新鮮な大動脈を取り出しOil Red-O染色により粥状硬化病変を染色した。デジタルカメラで撮影後、粥腫病変の面積をNIH imageを用いて測定し、apoE-KOマウスと各2重KOマウスでの比較検討を行った。

粥状病変の組織学的検索: 大動脈のホルマリン固定パラフィン切片を作成し、H&E染色、EVG染色、Azan染色に加えて免疫染色を行った。免疫染色により、粥状硬化病変での組織球（Mac3陽性）、平滑筋（alpha-SMA陽性）を染め分けて細胞の分布、数量の相違を観察した。HDCとヒスタミンの局在も免疫染色で観察した。

生化学的検索: 血清トリグリセリド、コレステロールを経時的に測定した。血清中と大動脈粥腫内のヒスタミンをELISAで定量した。

内膜肥厚モデルの確立: H1RおよびH2RのKOマウスの頸動脈結紮による内膜肥厚モデルを作成し、経時的に病変部位を採取し（結紮1-2-3週間後）、組織学的検索した。

ヒスタミンによる粥状動脈硬化進展メカニズム: マウス動脈硬化モデルでのMCP-1、TNF、LOX-1、MMP-1およびMMP-12などの炎症関連因子の発現やHDC、H1R、H2Rの発現量をRT-PCRを用いて定量した。

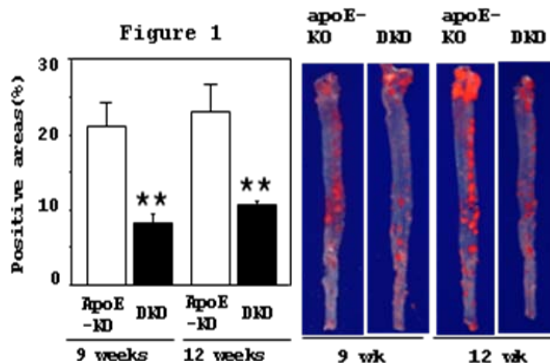
骨髄移植による内膜肥厚の由来同定: 緑色蛍光物質（GFP）のトランスジェニックマウスの骨髄細胞を、致死量の放射線を照射した各KOマウスに移植し、大動脈の標本作製後、結

紮モデルによる動脈硬化病変内に分布する骨髓由来の細胞を観察した。

抗ヒスタミン薬による動脈硬化の抑制: H1 および H2 ヒスタミンブロッカーを動脈結紮マウスに投与し、各動脈硬化病変の抑制が起こることを検討した。

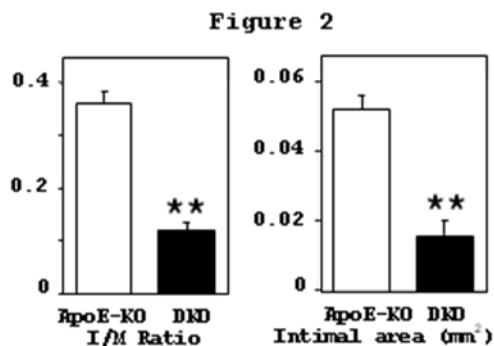
4. 研究成果

粥状硬化病変: 高コレステロール食 (高コ食) で誘導される大動脈の粥状硬化病変は、apoE-HDC-KO マウスにおいては、6 週および 12 週投与のいずれの時点でも apoE-KO マウスと比較して約 50 % 以上の減少が見られ (Figure 1, ** $p < 0.01$ vs apoE-KO)、内膜・

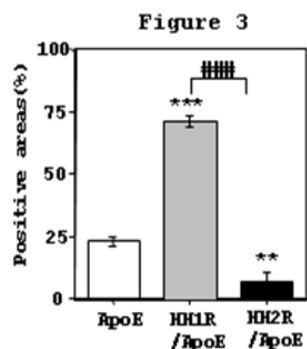


中膜比や内膜面積の減少を伴っていた (Figure 2, ** $p < 0.01$, vs apoE-KO)。

高コ食 12 週投与の apoE-H1R-KO マウスでは、apoE-KO マウスと比べて約 300% の粥状



硬化病変の面積の増加が見られたが、反対に apoE-H2R-KO マウスでは、約 30% に減少した (Figure 3, *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ vs



apoE-KO, ### $p < 0.001$).

組織学的には、apoE-KO マウスと 2 重 KO マウスの粥状硬化病変はいずれも MAC-3 陽性の組織球の浸潤

で構成されており、質的な差異は観察されなかった (data not shown)。

血清脂質: 高コ食 12 週投与において、血清の総コレステロールおよび VLDL-あるいは LDL-コレステロールは、apoE-KO マウスと比較して粥状硬化病変の減少した apoE-HDC-KO および apoE-H2R-KO マウスでは有意差をもって増加していた (data not shown)。

血清ヒスタミンと粥腫内ヒスタミン: apoE-KO および apoE-H1R-KO, apoE-H2R-KO マウスにおいては、高コ食 12 週投与により血清ヒスタミンと大動脈粥腫内の HDC 発現とヒスタミン含有量が増加した。

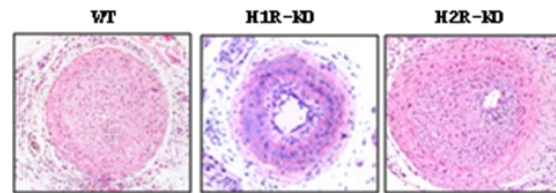
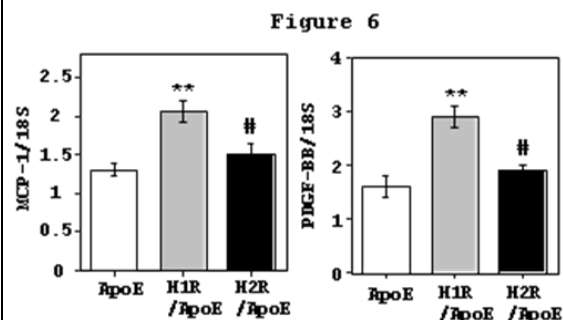
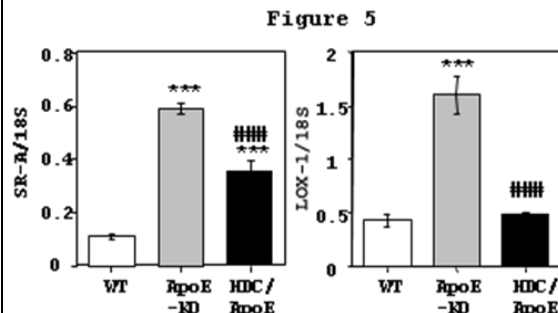
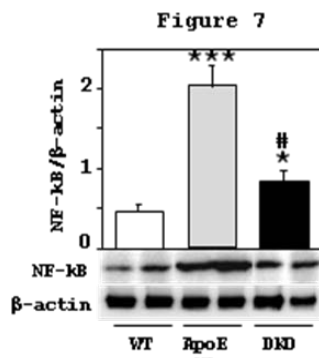


Figure 4

結紮による内膜肥厚: 頸動脈の結紮後 3 週間での内膜肥厚は、H1R-KO マウスでは野生型マウスと比較して内膜肥厚が軽減し、H2R-KO マウスでは増強していた (Figure 4)。



ヒスタミンによる粥状動脈硬化進展メカニズム: apoE-HDC-KO および apoE-H2R-KO マウスの大動脈粥状硬化病変では、多くの動脈硬化関連遺伝子の発現低下を認めた。とくに、スカベンジャー受容体である SR-A や LOX-1、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、MCP-1、PDGF-BB の発現は apoE-KO や apoE-H1R-KO マウスと比較して優位に低下していた (Figure 5 と Figure 6 に一部を示す。*** $p < 0.001$ vs WT, ### $p < 0.001$ vs apoE-KO)。

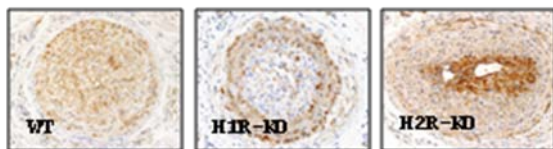


これらの炎症性因子の発現を制御する可能性のある NF-kB の蛋白発現は、apoE-HDC-KO マウスにおいては、apoE-KO マウスに比較して著明な減少が見られた (Figure 7, *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ vs WT,

$p < 0.05$ vs apoE-KO)。

骨髄移植モデル：頸動脈結紮モデルによる内膜肥厚を構成する細胞は、大部分が α ph-SMA 陽性の平滑筋細胞であり (Figure 8)、骨髄に由来していた。

Figure 8



抗ヒスタミン薬による動脈硬化の抑制：

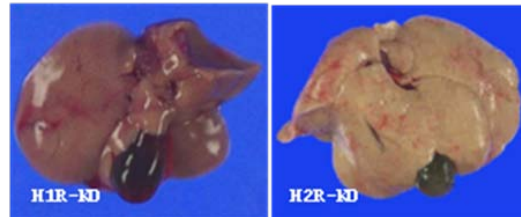
ヒスタミン H1 および H2 ブロッカーを、浸透圧ポンプを用いて頸動脈結紮マウスに持続的に投与したが、内膜肥厚の程度に変化は見られなかった。

ヒスタミンはアレルギー反応や急性炎症反応を制御しているだけではなく、血清脂質代謝や動脈硬化の血管壁での慢性炎症反応に関わっていることを明らかにした。粥状動脈硬化病変では、H2R を介したヒスタミンシグナルは種々の pro-inflammatory factors の遺伝子発現を調節しており、これは NF-kB の発現制御を介したメカニズムが想定された。一方、内膜肥厚においては、H1R を介したシグナルが平滑筋の増殖を制御しており、動脈硬化病変の種類により、寄与するヒスタミンシグナルが異なっている可能性がある。内膜の平滑筋細胞は H1R のみを、粥腫を形成する単球・組織球は H1R と H2R の両方を発現していることを考えると大変興味深い。

H2R 遺伝子や HDC 遺伝子の欠損により、高コ食負荷の apoE-KO マウスにおける高脂血症が増加するにも関わらず、粥状動脈硬化病変はむしろ減少したことは、ヒスタミンの pro-atherogenic 効果は高脂血症とくに高 LDL コレステロール血症とは独立した因子である可能性を示唆している。

さらに、本研究で対照群として高コ食を投与した H1R-KO および H2R-KO マウスにおいて、特記すべき知見が得られた。H2R-KO マウスでは H1R-KO マウスに比較して、より重度の耐

Figure 9



糖能障害を来し、肝には高度に脂肪が蓄積し NASH 様の肝病変を生じることが見いだされた (Figure 9)。この H2R-KO マウスは低 adiponection 血症を伴っている。

つまり、ヒスタミンは血管壁での慢性炎症反応を介して動脈硬化の形成を促進するだけではなく、糖質代謝、脂質代謝およびその関連病態などとの関わりも示唆され、本研究により、抗ヒスタミン剤のこれらの病態・疾患に対する適応を考慮するための基礎的データを提供できたものと考えられた。

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 3 件)

1) Wang KY, Tanimoto A, Guo X, Yamada S, Shimajiri S, Murata Y, Ding Y, Tsutsui M, Kato S, Watanabe T, Ohtsu H, Hirano K, Kohno K, Sasaguri Y. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in apoE-KO mice independently on serum cholesterol level. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 in press

2) Wang KY, Tanimoto A, Yamada S, Guo X, Ding Y, Watanabe T, Watanabe T, Kohno K, Hirano KI, Tsukada H, Sasaguri Y. Histamine Regulation in Glucose and Lipid Metabolism via Histamine Receptors. Model for Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. Am J Pathol. 2010; 177: 713-723.

3) Wang KY, Tanimoto A, Sasaguri Y. Role of histamine in atherosclerotic lesion. J UOEH. 2010; 32: 63-71 (Review).

[学会発表] (計 5 件)

王克よう, 谷本昭英, 笹栗靖之, 粥状動脈硬化におけるヒスタミン受容体 (HH1R, HH2R) の役割, 日本病理学会総会, 平成 22 年 4 月, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 昭英 (TANIMOTO AKIHIDE)
鹿児島大学・歯学部総合研究科・教授
研究者番号：10217151

(2) 研究分担者

笹栗 靖之 (SASAGURI YASUYUKI)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：60140646