

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670411

研究課題名(和文)HDLの動脈硬化における抗炎症効果の解明

研究課題名(英文)The anti-inflammatory mechanism of HDL in atherosclerosis

研究代表者

河野 肇 (Kono, Hajime)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：60585074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究により、糖尿病、動脈硬化などのメタボリックシンドロームの中核をなす病態の本体が炎症性疾患であるとの理解が進んだ。High Density Lipoprotein (HDL) は動脈硬化において非常に重要な役割を果たしており、その血中濃度は動脈硬化の進展と強い逆相関を示す。われわれはHDLにToll Like Receptor (TLRs) による自然炎症およびインフラマソームを介したIL-1の産生を抑制する効果があることを見出した。その分子メカニズムは炎症抑制性転写因子ATF3の転写亢進であることを示した。さらに、HDLの抗動脈硬化作用はATF3を介することを示した。

研究成果の概要(英文)：Recent advances revealed that inflammation plays important roles in the pathogenesis of metabolic syndrome including obesity, diabetes and atherosclerosis. High Density Lipoprotein (HDL) is a strong inhibitor of atherosclerosis, and the level of HDL inversely well correlated with the development of atherosclerosis. The molecular mechanisms HDL to modulate inflammation, particularly in immune cells such as macrophages, remain poorly understood. We identified that the transcriptional regulator ATF3, as an HDL-inducible target gene in macrophages that downregulates the expression of Toll-like receptor (TLR)-induced proinflammatory cytokines. The protective effects of HDL against TLR-induced inflammation were fully dependent on ATF3 in vitro and in vivo. We have advanced the field by identifying a specific molecular pathway for anti-inflammatory actions of HDL in macrophages opening up new opportunities for understanding HDL salutary actions and exploiting therapeutic potential.

研究分野：免疫学

キーワード：自然炎症 動脈硬化 HDL ATF3

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は元来動脈壁の内皮下における脂質蓄積がその病態のすべてと考えられてきたが、その発症、進展、アテロームコアの破綻と閉塞性機転に至るまでのほぼすべての病態において炎症が重要な役割をはたしている疾患であることが明らかとなってきた。特にマクロファージを始めとする自然免疫系細胞、接着分子、IL-1などのサイトカインの重要性の理解が進んだ(1)。その結果、動脈硬化をおこしている動脈壁においては低レベルの自然免疫炎症が持続していることが推察される一方、その開始、維持メカニズムについての統合的な理解は得られておらず、さらには炎症をターゲットとした治療介入も現実のものとはなっていない。申請者は本研究において、非常に強力な抗動脈硬化作用を持つHDLについてその抗炎症メカニズムの解明を試みるものである。

動脈硬化の自然免疫のその疾患との関連についてはクラミドフィラなどの感染症を中心に検討されてきた。非感染症疾患における自然免疫の関与については、まず発熱性遺伝性疾患である家族性地中海熱の原因遺伝子としてインフラマソーム関連遺伝子が同定され。その後、インフラマソームが結晶誘発性関節炎に関与することが明らかとなった(2)。申請者らもシリカ結晶による炎症反応にインフラマソームが関与していることを明らかにした(3)。さらに自然免疫のメタボリックシンドロームにおける関与については2010年に入り、申請者らが動脈硬化との関連について報告を行い(4)、糖尿病(耐糖能およびインスリン感受性)についてTschoppらが報告を行った(5)とあり、まだ端緒についたばかりである。

以上の様に、動脈硬化はその炎症性疾患としての側面が認識されてきているが、その自然免疫との関連については端緒についたばかりである。内因性の抗動脈硬化作用をもつ巨大分子HDLがどのような機序により抗炎症効果を示すかについては、ほとんど報告がない。わずかに1970年代にLPSへの直接結合能があることが示されたのみである(6)。その他のTLRリガンドに対する炎症抑制効果は全く報告されておらず、また他の抗炎症機序についても不明である。本研究課題は動脈硬化におけるHDLの抗炎症作用について重要な手がかりを与える最初の報告になると期待され、類似の研究は全く行われていない。また、本

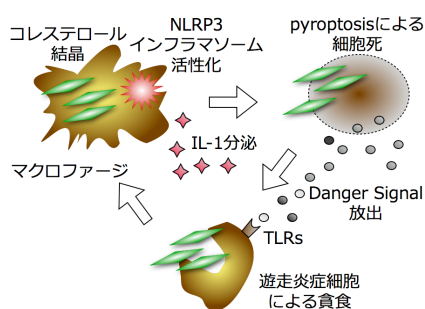
研究においては、その対象を動脈硬化としているが、IL-1やTLRsシグナルによるサイトカイン産生やインフラマソーム・IL-1経路は糖尿病などの他の代謝性疾患や感染症においても非常に重要な役割を果たしているため(7)、その抗炎症機序の解明のインパクトは大きい。(1) Kono and Rock. *Nat Rev Immunol* 8:279 (2) Martinon, et al. *Nature* 440:237 (3) Hornung, Kono, et al. *Nat Immunol* 9:847 (4) Kono H, et al. *Nature* 464:1357 (5) Wen, et al. *Nat Immunol* 11:136 (6) Ulevitch, et al. *J Clin Invest* 64:1516 (7) Dinarello CA. *Annu Rev Immunol* 27:519 (8) Ng, et al. *Immunity* 29, 807

2. 研究の目的

近年の研究の進歩により、尿酸結晶などの無菌的微粒子に対する急性炎症反応に対する急性炎症反応がNLRP3インフラマソームおよびIL-1依存性であることが明らかとなった。さらには、血管内皮におけるコレステロール結晶に対する炎症反応と動脈硬化もNLRP3インフラマソームおよびIL-1依存性であることが判明し、動脈硬化における自然免疫炎症の寄与が明らかとなった(Kono et al, *Nature* 464:1357)。また、TLR2/4が動脈硬化において重要な役割を果たしていることが報告されている。このように慢性代謝性疾患と考えられてきた疾患群の自己炎症疾患としての側面の重要性が明らかになりつつある。

HDLの抗動脈硬化作用は、血管内皮下などの末梢組織からコレステロールを回収して肝臓へと輸送する作用によると考えられていたが、HDL中のコレステロール増加作用を有する薬(ナイアシンやCETP阻害薬)は臨床試験で心血管イベントを抑制できず、HDLの抗動脈硬化作用の代替仮説として”HDLの抗炎症作用”が挙げられている。しかし、これまでHDLの抗炎症作用については、ほとんどなにも明らかとなっていない。我々は最近予備的な検討において、*in vitro*、*in vivo*双方においてHDLのTLRリガンドによる炎症反応に対する阻害作用を見出した。さらにはコレステロール結晶によるインフラマソーム活性化を介したIL-1産生の抑制を見出した(*in vitro*)。動脈硬化局所においてはコレステロール結晶が自然炎症(インフラマソーム)活性化を引き起こし、細胞死(パイロプトーシス)が惹起され、それが更なる炎症をおこすと考えられており(図参照)、その際にはTLRリガンドとしての

Danger Signal が多数放出される。HDL による抗動脈硬化作用を説明する上で、その作用を TLR シグナル阻害、インフラマソーム阻害に求めることは非常に魅力的な作業仮説となる。我々は本研究において、HDL の TLR シグナル阻害を介した抗炎症作用、抗動脈硬化作用を明らかにし、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には以下の目標を挙げる。(1) HDL の TLR シグナルに対する抗炎症効果の検討。(2) HDL による抗炎症効果の分子機序についての解明(3) HDL の作用点である抑制性転写因子の動脈硬化抑制の検討。本研究により、動脈硬化における全く新しい治療介入点の提案ができると考えた。



3. 研究の方法

本研究は3つの計画からなる。(1) in vivo と in vitro における HDL の TLR シグナルに対する抗炎症効果の検討。HDL による TLR リガンド刺激炎症に対する抑制が

CpGDNA-TLR9 に限局するものではないことを検討する。(2) HDL による抗炎症効果の分子機序についての解明(抑制性転写因子の同定・抑制性分子のゲノムワイドスクリーニング)。HDL の抗炎症効果の分子メカニズムを解明する。現時点では転写因子レベルでの炎症抑制を想定している。マイクロアレイと細胞ベースのレトロウイルスライブラリーを用いる。(3) HDL の作用点である抑制性転写因子の動脈硬化抑制の検討

(1)(2)で同定された HDL のエフェクター分子の欠失マウスを用いて、HDL の抗炎症効果が動脈硬化において役割を果たしているかマウスモデルを用いて検討する。

(1) in vivo と in vitro における HDL の TLR シグナルに対する抗炎症効果の検討。申請者はすでに in vivo における TLR シグナル依存性の炎症のアッセイを確立している。TLR リガンドと D-Galactosamine を投与することにより、TNF- α 依存性の肝壊死をおこすものである。これまでに、CpGDNA (TLR9

リガンド)、poly I:C (TLR3 リガンド)、P3C (TLR2/6 リガンド) において、TLR 依存性の著明な肝障害を惹起し、特に投与後1時間において血中サイトカインの濃度上昇が認められることを見いだした。予備的実験においては apoA-I とフォスファチジルセリンからなる reconstituted HDL (rHDL) の投与によりこれらの肝障害と血清サイトカインの上昇が著明に抑制されることを見いだしている(図1)。また、ヒトの HDL を超遠心分離法により分離したものでも、同様の抗炎症効果を見いだした。すなわち、内部にコレステロールを有するヒト HDL においても、有さない rHDL においても同様の抗炎症効果が認められた(data not shown)。in vitro においては、マクロファージセルラインにおいて TLR リガンドの投与を行い、サイトカイン産生を観察する。予備的な実験においてはサイトカイン産生の低下を観察している(data not shown)。

(2) HDL による抗炎症効果の分子機序についての解明(抑制性転写因子の同定・抑制性分子のゲノムワイドスクリーニング)。

HDL による抗炎症効果が、細胞膜からのコレステロール引き抜きによる脂質ラフトの阻害が TLR の初期信号伝達を阻害することによるものかどうかを検討するために、予備的な in vitro の実験を行ったところ、rHDL 投与下において、p38、JNK、NF- κ B p65 のリン酸化は影響を受けず、rHDL の抗炎症作用は TLR シグナル伝達を受容体直下レベルの阻害ではないことが示唆された(図2)。今後、NF- κ B p65 の核移行を検証するとともに、EMSA アッセイを行う。予備的実験ではマクロファージよりの IL-6 や IL-12p40 などのサイトカイン産生は rHDL により抑制が認められることにより、HDL の抗炎症効果は、転写における抑制性の機序によるものが想定される。我々は、骨髄由来マクロファージにおいて rHDL 投与下、非投与下における microarray を行い、rHDL により強く誘導される候補遺伝子を同定する予定である。初回の microarray において、いくつかの抑制性遺伝子の候補が得られた(図3)。この候補遺伝子の HDL による誘導が確認されれば、候補遺伝子欠失マウスを用い、rHDL による抑制性効果が解除されるかを検証する。

第二法は、抑制機構を発見するために、レトロウイルスライブラリー法によるスクリーニングを行う。アッセイに必用な系は構築済みである。安定的に IL-6 プロモータ下に EGFP を発現するマクロファージセル

ライン RAW264.7 細胞を樹立した。この細胞は、LPS などの刺激により活性化をきたし、EGFP の産生が認められる。さらに、ecotropic retrovirus receptor を遺伝子導入してあり、通常難しいレトロウイルスによるマクロファージへの遺伝子導入がほぼ 100%容易にできる。マクロファージより採取した mRNA を用いてレトロウイルスライブラリーを作成し、IL-6promoter-EGFP 発現 RAW264.7 細胞に感染させた後、HDL の存在/非存在下に TLR リガンド刺激を行う。フローサイトメーターにて EGFP 高発現細胞を採取し、そこに発現しているレトロウイルスライブラリー由来の分子を同定することにより、HDL の抑制性効果を解除する分子が同定される。

(3) HDL の作用点である抑制性転写因子の動脈硬化抑制への関連

(2)により *in vitro* における HDL の TLR リガンド刺激における抑制性効果において重要な遺伝子が同定された際には、その遺伝子が実際に HDL の抗動脈硬化作用において重要な役割を果たしているかを確認するために、当該遺伝子を欠失したマウスを作出し、(1)で用いた炎症モデルおよび動脈硬化モデルにおいて、HDL を投与もしくは ApoA-I トランスジェニックマウスを用いて効果を観察する。当該遺伝子欠失マウスにおいて HDL の抑制性効果が消失していれば、当該遺伝子が HDL の効果発現に必需と判断できる。

4. 研究成果

(1) *in vivo* と *in vitro* における HDL の TLR シグナルに対する抗炎症効果の検討。

C3H/HeJ マウスに D-Galactosamine と TLR9 リガンドである CpGDNA を投与すると、TLR 依存性の肝障害が惹起される。我々は HDL を超遠心法にてヒト血清から精製し、このマウスの系において投与することにより、TLR シグナルへの *in vivo* における影響を検討した。図 1a に示す様に、CpGDNA 投与では著明な肝障害 (ALT の上昇) が認められたが、ヒト由来 HDL の投与により改善が認められた。同時に、血清 IL-6 や IL-12p40 など、炎症性サイトカインの抑制効果も認められた。また、ヒト血清由来 ApoAI 蛋白とホスファチジルセリンよりなる reconstituted HDL (rHDL) を用いても、同様の *in vivo* における効果が認められた (図 1b)。rHDL 投与において、肝臓組織においては肝壊死像の抑制と、炎症細胞浸潤の減少が

認められた。同様の *in vivo* における効果は他の TLR リガンド (TLR2 リガンド) である Pam3CSK4 (P3C) の投与においても認められた (図 1d)。

in vitro においては、骨髄由来マクロファージ (BMDM) に各種 TLR リガンドを加えると炎症性サイトカインの分泌が認められる。rHDL の投与によりこれらサイトカインの分泌は抑制されることが明らかとなった (図 1e)。

更に、HDL の抗炎症効果は、これらサイトカインの転写抑制によることが明らかとなった (図 2)。

図 1

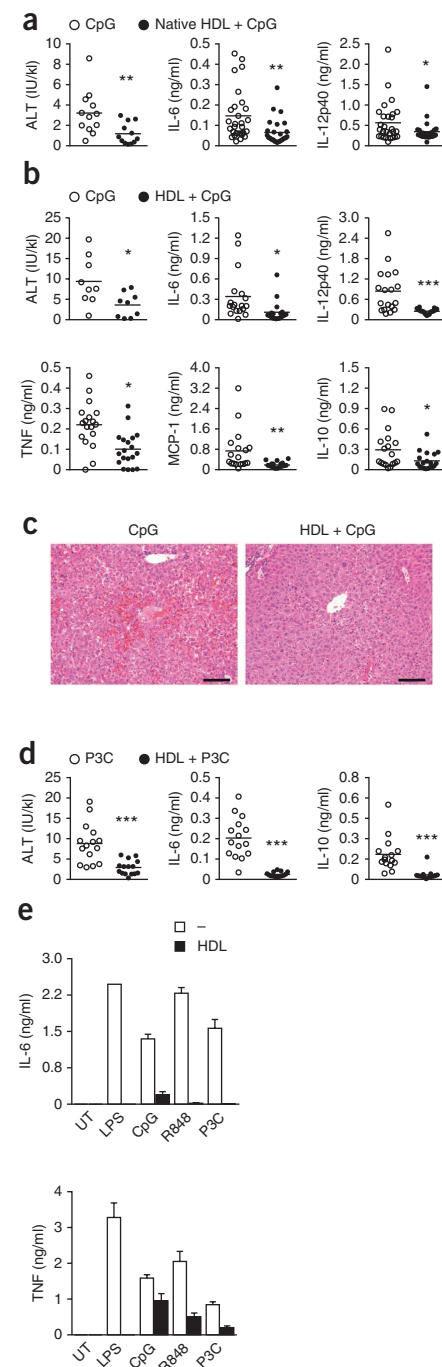
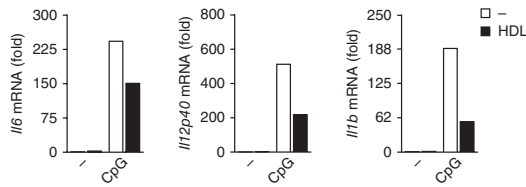
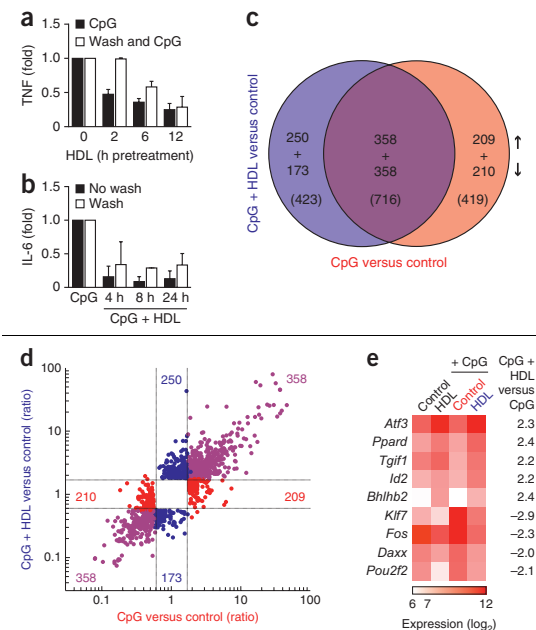


図 2



(2) HDL による抗炎症効果の分子機序についての解明 (抑制性転写因子の同定・抑制性分子のゲノムワイドスクリーニング)。我々は、BMDM に TLR シグナル (CpGDNA) を加える際に、HDL にて前処置することにより、発現が増加する遺伝子と減少する遺伝子についてゲノムワイド mRNA 解析を行った。図 3a, b に認められる様に、TNF 遺伝子、IL-6 遺伝子は HDL 投与により発現の低下が認められた。このように発現が亢進する遺伝子、低下する遺伝子が同定され、CpG 単独投与に比べて HDL 投与により発現する遺伝子が得られた。これらの中からバイオインフォマティクスアプローチを用い、これらの遺伝子変化の中で責任遺伝子として ATF3 を同定した。

図 3

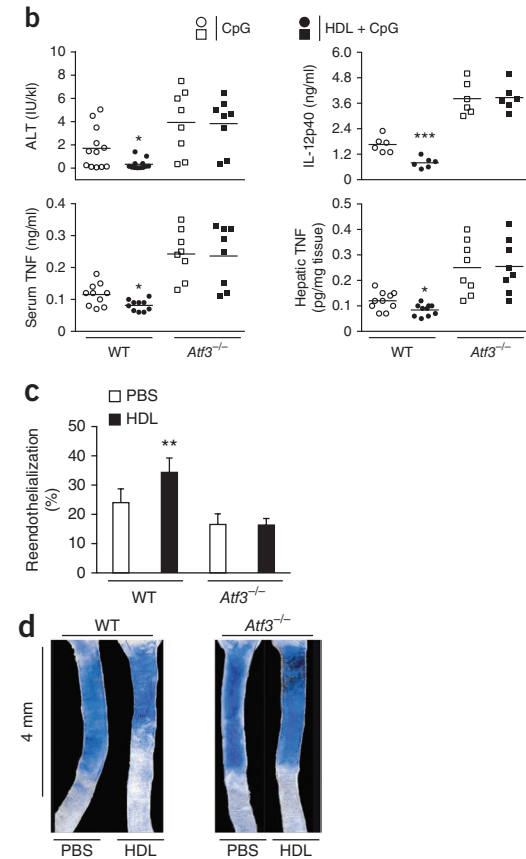


(3) HDL の作用点である抑制性転写因子の動脈硬化抑制の検討

上記で同定された ATF3 の動脈硬化における効果を検証するために、ATF3 欠失マウスにおいて、TLR リガンドによる炎症効果およびカテーテル内皮損傷および再内皮化を検討した。CpGDNA による炎症は、ATF3 欠失マウスにおいて HDL 投与による抑制は認められなかった (図 4b)。さらに、図 4c, d に認められる様に、HDL 投与により再内皮化

は促進されるが、その効果は ATF3 欠失マウスにおいては消失していた。

図 4



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. De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt SV, Beyer M, Xu D, Zimmer S, Lahrman C, Schildberg FA, Vogelhuber J, Kraut M, Ulas T, Kerksiek A, Krebs W, Bode N, Grebe A, Fitzgerald ML, Hernandez NJ, Williams BR, Knolle P, Kneilling M, Röcken M, Lütjohann D, Wright SD, Schultze JL, Latz E. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. 査読あり
Nat Immunol. 2014; 15(2):152-60.

doi: 10.1038/ni.2784.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 肇 (KONO, Hajime)

帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：60585074

(2) 研究分担者

南木 敏宏 (NANKI, Toshihiro)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：00282749

関根 知世子
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：40392005

(4) 研究協力者

関 玲子 (SEKI, Reiko)
柳田 たみ子 (YANAGIDA, Tamiko)