

令和元年6月19日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01309

研究課題名(和文)酸化LDL動態イメージングに基づく新しい抗動脈硬化機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a new mechanism involved in the pathogenesis of atherosclerosis based on the oxLDL kinetic imaging

研究代表者

中野 厚史(Nakano, Atsushi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：90217787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：各種酸化LDL受容体KOマウスを用いイメージング手法で肝臓以外の臓器の酸化LDL受容体を同定した。同KOマウスでは褐色脂肪、骨格筋、心臓等への集積が完全に消失し、肝臓への集積は2倍に増加した。酸化LDLのクリアランスには褐色脂肪や骨格筋が、大きく寄与している事を明らかにし、これらの活性化に伴うクリアランスの亢進を示した。

運動負荷と動脈硬化と本受容体の関連を調べると、運動負荷群の方が健康かつ長寿命であった。しかし大動脈での動脈硬化部位の比較では病巣が大きくなる傾向があった。このことはこの受容体が酸化LDLのクリアランスにも働くが、同時にマクロファージにも発現しているためと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年着目されている褐色脂肪であるが、従来から言われているエネルギー代謝経路のみならず、体内の廃棄物である酸化LDLのクリアランスにも大きく関わっていることを受容体レベルから明らかにした。さらに、同受容体は骨格筋にも発現しており、運動負荷などの骨格筋の活性化により酸化LDLの取込量は上昇することが判った。また動脈硬化症モデルマウスを使っての実験を行い、運動と動脈硬化の関係も明らかになってきた。本研究を進めることにより、古くから言われている「適度な運動が身体に良い」についての科学的な裏付けや運動量の最適化等を行うことができ、健康長寿への指標とすることができると考えている。

研究成果の概要(英文)：The whole-body imaging studies were performed using several strains of oxLDL receptor KO mice. We found that oxLDL accumulation to brown adipocyte tissues, skeletal muscle and other organs except the liver and spleen became completely disappeared in one strain. In contrast, the accumulation to liver and spleen were nearly doubled to compared to the WT mice. Increased clearance associated with activation of brown adipocyte tissue or skeletal muscle were observed.

In addition, we studied the relationship between exercise load and arteriosclerosis with this receptor. The exercise group had a healthy long life; however, it was observed larger area of atherosclerosis in the aorta. Although this receptor works for oxLDL clearance, it was also expressed in macrophages, in which was considered to made lager area of atherosclerosis.

研究分野：血管生理学

キーワード：動脈硬化 骨格筋 褐色脂肪 酸化LDL 運動負荷

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化・脳梗塞・心筋梗塞などの循環器疾患は、罹患率が高く潜在的に致命的な疾患であり治療費も高額かつ長期に亘るため治療目的のみならず、予防医学的また医療経済学的観点からも早期の発見・病態の把握が望まれている。数々の大規模疫学研究の結果から、血中の低比重リポタンパク質濃度(LDL:悪玉コレステロール)が粥状動脈硬化を基盤とする循環器疾患の主要な危険因子であることが知られるようになった。しかしながら、LDLは血管柔軟性を保持するのに必須の要素であり、動脈硬化部位ではLDLそのものではなく変性したLDLが沈着していることが明らかとなってきた。現在では、LDLの酸化修飾を起因とする粥状動脈硬化の発症機序(Steinberg, D., et al., N Engl J Med, 1989)が受け入れられている。

oxLDLはスカベンジャー受容体および泡沫細胞への分化を介してマクロファージによって積極的に細胞内に取り込まれることが報告されており、これは初期の粥状動脈硬化症の重要な特徴であると考えられている。(Shashkin, P., et al., Curr Pharm Des, 2005) 対照的に、コレステロールの効果的な蓄積はLDL受容体の下方制御によって妨げられるので、LDLは泡沫細胞形成を誘発しないことが報告されている。(Goldstein, J.L., et al., Annual Review of Cell Biology, 1985)

一方、oxLDLの体内での分布や動態については、RI標識したLDLやoxLDLを用いて体内動態を調べる研究が、臓器分布や血中濃度の評価がヒト(Iuliano et al., Atherosclerosis, 1996)やマウス(Ling, W., et al., J Clin Invest 1997)などが報告されている。その結果、LDLとoxLDLの血中からのクリアランス速度が大きく違い、これは取込メカニズムの相違によるものと考えられており、oxLDLの速いクリアランスは肝臓にすぐに集積されるためであるとされた。そのため、oxLDLは血中で産生または血中へ放出されてもすぐに肝臓に取り込まれて代謝されるため、血中に存在しないと考えられてきた。

しかし、2000年代に入り血漿中の微量oxLDL測定法が開発され、「動脈硬化巣中に不安定プラークを持つ患者は血中oxLDL値が高いこと」(Itabe, H., Biol Pharm Bull, 2003)「メタボリックシンドローム発症と血中oxLDL高値が高い相関を示すこと」(Holvoet, P., et al., Jama, 2008)。さらには、「急性心筋梗塞症の急性期では高脂血症の有無に関わらず、有意に高値であること」(Ehara, S., et al., Circulation, 2001)や「循環器病疾患なかでも脳卒中発症との高い相関があること」(Inoue, N., et al., Clin Chem, 2010)が報告されるに至り血中の微量のoxLDLの体内代謝動態や活性自体が循環器疾患の進行を左右しており、その量が病態進行を評価していく上で重要であると考えられるようになってきている。

研究代表者は、動脈硬化の鍵となるoxLDLの体内動態およびその血中クリアランスを明らかにするために、oxLDLへの高比放射能標識技術及び、SPECTデータの高分解像度画像処理の開発を行ってきた。その結果、マウスを用いた全身イメージングにより、従来から知られていた肝臓以外に、oxLDLのクリアランスには、様々な臓器組織が関わっていることが明らかになってきた。たとえば、心臓、肺といった臓器への集積や、さらには従来知られていなかった褐色脂肪組織への肝臓並みの高い密度でのoxLDLの集積を発見し、oxLDLのクリアランスに大きく寄与していることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では開発したoxLDLマウス全身イメージングにより明らかになった、oxLDLクリアランスに寄与する褐色脂肪組織を初めとする肝臓以外の組織に注目し、

これら組織の活性化により集積が亢進されるのか？

これら組織におけるoxLDL受容体はそれぞれ何であるのか？

これら組織の活性化は、動脈硬化抑制につながるのか？

等を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) oxLDL 受容体の解明

褐色脂肪など今回新たに判った oxLDL クリアランスに寄与する組織を網羅的に解析するため、組織を抽出してマイクロアレイを用いて解析を行う。

また、oxLDL 取込に関与するとされる各種 oxLDL 受容体欠損マウスを入手し、これまでに確立している nanoSPECT/CT を用いた^[123I]oxLDL のマウス全身インビボイメージングを行い、どの oxLDL 受容体が肝臓以外での oxLDL 取込に関与しているかを明らかにする。撮影後にマウスを解剖しすべての組織を γ counter を用いて臓器分布の測定をした。

(2) 組織の活性化は oxLDL クリアランスを亢進させるか？

寒冷刺激

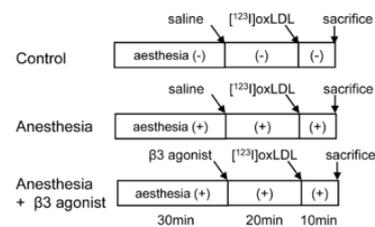
野生型マウス(以下 WT)を一晩 4 で飼育した寒冷刺激群と室温飼育群、各々に^[123I]oxLDL イメージング実験及び、褐色脂肪を抽出し γ Counter を用いて定量比較を行った。尚、寒冷刺激群は 4 飼育ケージより取り出した直後に実験を行なった。

交感神経支配の検証

室温飼育の WT に、コントロール群・イソフルラン麻酔群・イソフルラン麻酔+ β 3 agonist 群を設け(右図) イメージング実験及び、臓器組織を抽出し単位重量あたりの oxLDL 取込量の比較を行った。

骨格筋の活性化

受容体が明らかになった後に全身の骨格筋が大きく oxLDL クリアランスに寄与していることが明らかになったので、室温飼育の WT と KO へのランニングホイールによる自発的運動負荷と薬物刺激を行い、骨格筋のサンプルとして下脚より大腿四頭筋、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋を抽出し、運動負荷や薬物刺激有無での oxLDL 取込量の比較を行った。



(3) 組織の活性化に伴う oxLDL クリアランス亢進は動脈硬化抑制につながるのか？

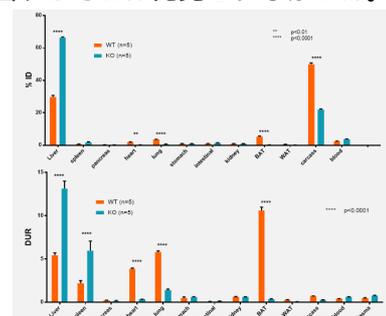
oxLDL クリアランスに関わる組織の活性化が動脈硬化抑制につながるのかを明らかにするために、(1)で明らかになった oxLDL 受容体ノックアウトマウス(以下 KO)と動脈硬化モデルマウスである ApoE KO マウス (以下 ApoE)とのダブルノックアウトマウス (以下 DKO)を作製する。作製した DKO を用いてランニングホイールによる自発的運動負荷の有無での 2 群、対照群として ApoE に対する運動負荷の有無の 2 群、合計 4 群間での生存率および動脈硬化の大きさの比較を行った。8 週齢の時点でランニングホイール付き飼育ケージに移し、通常食飼育下で 72 週をエンドポイントとして生存率及び抽出大動脈の Oil-Red-O 染色を行った EnFace 標本作製し、動脈硬化領域の大きさを比較し、運動負荷による骨格筋の活性化が動脈硬化抑制につながるかを評価した。

4. 研究成果

(1) oxLDL 受容体の解明

肝臓に匹敵する集積密度である褐色脂肪組織の oxLDL 受容体をマイクロアレイで調べたが、既知のものを含め複数の配列が候補に挙がったが特出するものは発見されなかった。

マイクロアレイ解析で候補に挙がったものを含め、入手が可能であった複数の oxLDL 受容体欠損マウスを用いて nanoSPECT/CT による^[123I]oxLDL の全身イメージング実験を行ったところ、1つの系統(KO)で褐色脂肪での取込が完全に消失し、さらに心臓・肺などからもほぼ消失した。逆に肝臓と脾臓では WT と比較して 2 倍以上に上昇した(右図)。既に、WT を用いた研究でも LDL の全身イメージングとの比較から全身の骨格筋に oxLDL が集積し

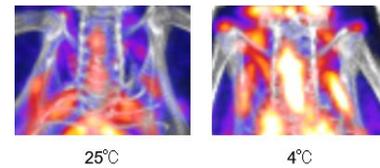


ていることが示唆されてきたが、全身の骨格筋からこの KO では完全に消失した。他の oxLDL 受容体欠損マウスでは、WT と比較し 20% 以下の変化しか見られず、少なくとも血中からの oxLDL クリアランスにおいてはこの受容体が大きな働きを持っていることが明らかになった。

(2) 組織の活性化は oxLDL クリアランスを亢進させるか？

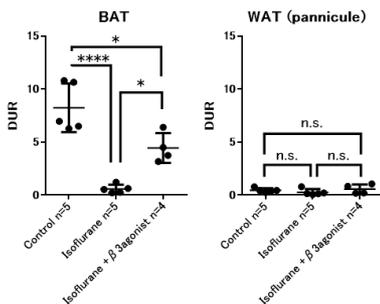
寒冷刺激

WT を一晩 4℃ で飼育した直後に $[^{125}\text{I}]$ oxLDL のマウス全身インビボイメージングを行った群では明らかに褐色脂肪への取込が亢進された (右図)。



交感神経支配の検証

褐色脂肪は交感神経支配下であり、ブロックする目的でイソフルラン麻酔を行ったところ、褐色脂肪への取込が完全に消失した。このことが従来の研究で褐色脂肪への oxLDL 取込が見いだせなかった理由の 1 つであると考えられる。更に、麻酔下のマウスに β agonist である CL-316,243 の投与により褐色脂肪への oxLDL の取込は、無麻酔状態の約半分にまで回復することが判った。尚、白色脂肪への取込はすべての群で観察されなかった。



骨格筋の活性化

WT と KO の各筋肉を比較したところ、白筋系である腿四頭筋、腓腹筋、前脛骨筋よりも、赤筋であるヒラメ筋が単位重量当たりの oxLDL 取込が多く、横隔膜・心筋はさらに多くの oxLDL が取り込まれていた。尚、KO では全身すべての筋肉において殆ど取込は見られず、心筋のみ極僅かに取込がみられた。これは別の oxLDL 受容体が心臓に発現していることが知られておりその影響であると考えられる。WT に 3 週間のランニングホイールによる自発的運動負荷による骨格筋への取込亢進を観察したところ、腓腹筋およびヒラメ筋において有意に増加した。骨格筋の活性化のために AICAR を腹腔投与したところ、大腿四頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋において有意に取込が上昇した。しかし、これらの取込の上昇は寒冷刺激による褐色脂肪における上昇が 2-3 倍であるのに比べ概ね 20% 程度の増加に留まった。しかしながら褐色脂肪の総量に比較し、全身の骨格筋量ははるかに多いためより多くの oxLDL の取込が観察された。KO ではすべての実験で活性化の有無に関わらず取込は見られなかった。

(3) 組織の活性化に伴う oxLDL クリアランス亢進は動脈硬化抑制につながるのか？

(2) の結果より、褐色脂肪や骨格筋の量や活性化を促すことにより、生体内で発生した廃棄物である oxLDL のクリアランスが亢進することが明らかになった。褐色脂肪の活性化のための寒冷刺激と動脈硬化については、Dong, M., et al. (Cell Metab 2013) によると動脈硬化の抑制はみられなかったとしている。これとは逆に、褐色脂肪の活性化に伴い動脈硬化が抑制されるとする報告もなされている (Berbee, J.F., et al. Nat Commun 2015)。

また、運動による動脈硬化抑制についての報告は数々なされており、筋肉量が増加している Myostatin KO マウスに動脈硬化モデルである LDL-R KO マウスを交配させた Myostatin/LDL-R DKO マウスにおける動脈硬化抑制 (Tu et al. Diabetes, 2009) や、動脈硬化モデルである ApoE KO マウスに水泳負荷により、動脈硬化が約 30%-50% 減少した。 (Okabe et al. Cardiovasc. Res., 2007, Pellegrin et al. Med. Sci. Sports Exerc., 2009)。すでに、同じく ApoE KO マウスに Running Wheel による自発運動負荷を行った際に、運動量に応じてアテローム性動脈硬化面積が減少すると報告されている (Fukao et al. JAT, 2010)。逆にトレッドミルによる運動負荷を行っても動脈硬化病変に有意差はみられなかったとする報告もある (Meissner et al. Atherosclerosis, 2013)。

こうした先行実験の結果を踏まえ、前述した通り DKO 及び、ApoE の 2 種類のマウスに対して、ランニングホイールによる自発的運動負荷の有無の 4 群間比較を行った。また通

常、動脈硬化モデル実験は高脂肪食給餌による加速実験を行うが、血中脂質が大きく変化するため通常餌給餌での 72 週をエンドポイントとする実験とした。現在までの結果では、まだ n=4 での傾向を見るにとどまるが、運動無負荷群の DKO 群、ApoE 群共に 40-50 週ですべて死亡した。死亡後、大動脈を摘出し動脈硬化領域の面積を比較したところ有意な差は見られなかった。それに対し運動負荷群では ApoE 群は 72 週まで半数の 2 匹が生存し、DKO 群は 65 週まで 1 匹、72 週まで 1 匹が生存した。運動負荷群の他の個体の死亡時期も DKO 群のほうが早い傾向にあった。72 週まで生存した個体を観察すると、ApoE 2 匹は毛艶もよく、腫瘍なども観察されず外見上は非常に健康的な状態であった。それに対して、DKO 群は、65 週、72 週生存個体ともに毛艶がわるく、抜け毛も多くみられさらに、複数の腫瘍なども観察された。意外なことに、これら 2 群各 2 個体の動脈硬化領域を観察したところ、DKO 群の方が小さい傾向にあった。尚、運動量（ランニングホイールの回転数）は、両群とも加齢とともに減少するが、DKO 群は有意に運動量は少なかった。尚この傾向は、WT と KO でランニングホイール飼育した場合にもみられた現象である。従って、運動量そのものには差があるとして考察する必要がある。

運動負荷を行った、ApoE 群で、動脈硬化領域は大きい健康的な状態であるのに対して、DKO 群では動脈硬化領域が小さいものの、病的な状態となった原因としては、やはり今回の受容体が、骨格筋や褐色脂肪を介した全身の老廃物のクリアランスには大きく寄与しているものの、他の組織たとえば、血管内皮やマクロファージにも発現しており動脈硬化の形成にも関わっているとも考えられた。今後は臓器特異的ノックアウトを用いての研究へと発展させたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Nakano, A., Kawashima, H., Miyake, Y., Zeniya, T., Yamamoto, A., Koshino, K., Temma, T., Fukuda, T., Fujita, Y., Kakino, A., Kanaya, S., Sawamura, T. and Iida, H.
123I-Labeled oxLDL Is Widely Distributed Throughout the Whole Body in Mice.
Nuclear Medicine and Molecular Imaging 査読有 52, (2017) pp.144-153;
Doi:10.1007/s13139-017-0497-2
2. Kakino, A., T., Fujita, Nakano, A., Horiuchi, S. and Sawamura, T.
Developmental Endothelial Locus-1 (Del-1) Inhibits Oxidized Low-Density Lipoprotein Activity by Direct Binding, and Its Overexpression Attenuates Atherogenesis in Mice.
Circulation Journal 査読有 80, (2016) 2541-2549
Doi:10.1253/circj.CJ-16-0808
3. Hashimoto, K., Mori, S., Oda, Y., Nakano, A., Sawamura, T. and Akagi, M.
Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1-deficient mice show resistance to instability-induced osteoarthritis.
Scand J Rheumatol 査読有 2, (2016) 1-11
Doi: 10.3109/03009742.2015.1135979
4. Yamamoto, K., Kakino, A., Takeshita, H., Hayashi, N., Li, L., Nakano, A., Hanasaki-Yamamoto, H., Fujita, Y., Imaizumi, Y., Toyama-Yokoyama, Nakama, C., Kawai, T., Takeda, M., Hongyo, K., Oguro, R., Maekawa, Y., Itoh, N., Takami, Y., Onishi, M., Takeya, Y., Sugimoto, K., Kamide, K., Nakagami, H., Ohishi, M., Kurtz, T.W., Sawamura, T. and Rakugi, H.
Oxidized LDL (oxLDL) activates the angiotensin II type 1 receptor by binding to the lectin-like oxLDL receptor.
FASEB J 査読有 8, (2015) 3342-3356
Doi: 10.1096/fj.15-271627

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 河嶋秀和, 中野厚史, 三宅義徳, 銭谷勉, 越野一博, 天満敬, 沢村達也, 飯田秀博
酸化 LDL のマウス体内動態：高分解能 SPECT/CT を用いた評価
日本薬学会第 139 年会 (2019)
2. Nakano, A.
New findings on oxLDL metabolism using in vivo imaging.
23th Adiposcience Symposium (2018)
3. 中野厚史
マウス全身イメージングで明らかになってきた、酸化 LDL の新たな代謝経路
第 14 回小動物インビボイメージング研究会 (2018)
4. Nakano, A.
Imaging and evaluation of brown adipose tissue using 123I-oxLDL.
22th Adiposcience Symposium (2017)
5. 河嶋秀和, 中野厚史, 三宅義徳, 銭谷 勉, 越野一博, 山本明秀, 垣野明美, 藤田佳子,
天満 敬, 沢村達也, 飯田秀博
健常マウスにおける酸化 LDL の体内動態に関する検討：I-123 標識体を用いた評価
日本薬学会第 137 年会 (2017)
6. 中野厚史, 河嶋秀和, 天満 敬, 銭谷 勉, 飯田秀博, 沢村達也
123I 標識酸化 LDL による褐色細胞機能評価の可能性
第 16 回放射性医薬品・画像診断薬研究会 (2016)
7. Nakano, A., Zeniya, T., Kawashima, H., Iida, H. and Sawamura, T.
Whole body imaging of 123I-oxLDL distribution in mouse with high resolution SPECT
system.
JSMI 2015 (2015)
8. 中野厚史, 銭谷勉, 河嶋秀和, 飯田秀博, 沢村達也
高解像度 SPECT を用いたマウス酸化 LDL 全身分布イメージング
第 10 回日本分子イメージング学会総会 (2015)

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。