

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19519

研究課題名(和文) マクロファージにおけるp27kip発現調機序の解明と動脈硬化症発症における意義

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms and regulatory pathways of p27kip expression in macrophages and the role of p27kip in the pathogenesis of atherosclerosis

研究代表者

石井 規夫 (Ishii, Norio)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10599111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ(M)特異的にサイクリン依存性キナーゼ阻害因子p27kipを発現するM特異的増殖抑制マウス(Tgマウス)を作成した。TgマウスにApoEKOマウスを交配し、動脈硬化病変の発症・進展を検討した。M増殖抑制により大動脈弁輪部におけるプラークおよびネクロシス面積割合が減少、プラーク内のコラーゲン含有量低下抑制、Fibrous Cap菲薄化抑制を認めた。また大動脈弁輪部プラーク及び頸部～胸部大動脈における炎症性サイトカインのmRNA発現の減少を認めた。以上よりM増殖能のみを抑制したマウスを用いて動脈硬化症発症・進展におけるM増殖の直接的で病態生理学的な意義を評価できた。

研究成果の概要(英文)：As for the pathophysiological significance of the macrophage proliferation in the atherosclerosis, there are still many questions left to be answered. To verify the direct evidence of involvement of local macrophage proliferation for atherosclerosis, we generated transgenic mice received p27kip expression only in the macrophages(mac-p27Tg), whose macrophage proliferation was specifically inhibited. The aortic valve annulus section average plaque area was significantly reduced in mac-p27Tg, compared with that of the control. The percentage of the necrotic core to the total advanced lesion area significantly decreased in mac-p27Tg. The inflammatory cytokines were also reduced in mac-p27Tg. We found that the local macrophage proliferation could be one of the common underlying pathophysiological features in the formation and the progression of atherosclerosis. Our results might lead to the control of the macrophage proliferation as the therapeutic target for atherosclerotic disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：動脈硬化 脂質代謝異常 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化症は、心筋梗塞・脳梗塞を代表とする致死的動脈硬化性疾患の主要な原因疾患である。現在わが国を含む先進諸国では食生活の充実や利便性の高い生活スタイルへの変化により、脂質異常症や糖尿病、高血圧といった生活習慣病が急増し、それに伴い動脈硬化性疾患患者数も急増している。

1) 動脈硬化発症・進展におけるマクロファージ増殖

現在のところ、動脈硬化症発症・進展メカニズムは血管内皮障害を起点とした血管の炎症反応として理解されている(*N Engl J Med*.340:115, 1999.)。血管内皮障害に応答して活性化した血中の単球は、血管内皮下に遊走・浸潤しマクロファージ(M ϕ)へ分化するとともに生理活性物質を分泌する。また、低比重リポ蛋白(LDL)は血管内皮下では酸化修飾を受け酸化 LDL (Ox-LDL)へと変性して存在する。**動脈硬化症の発症・進展には、この炎症性反応応答に加え血管内皮下における Ox-LDL による M ϕ 増殖の関与が重要視されている。**これまでに申請者らは Ox-LDL による M ϕ 増殖の分子機序(特に Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor(GM-CSF) と Protein kinase C および ERK1/2 の関与)について報告し(*J Biol Chem*. 275:5810, 2000. *Atherosclerosis*. 191:22-32, 2007. 研究業績 12)、M ϕ 増殖のメカニズムの一部を明らかにしてきた(図 1)。また最近、動脈硬化巣病変に集簇する M ϕ は循環血液中の単球が遊走してきたものよりも病変の局所で増殖したものに依存していることがマウス生体内で確認され、M ϕ の局所での増殖が動脈硬化症の主要なイベントであり、心血管疾患の治療ターゲットとなりうるとの報告がなされている(*Nature Medicine* 19,1166-1172 2013.)。

2) 細胞周期制御による M ϕ 増殖抑制の試み

AMP-activated protein kinase(AMPK)は、ATP の欠乏を感知し活性化され、消費された ATP を補填するよう作用するエネルギーセンサー酵素であるが、血管構成細胞における役割の解明は未だに不十分である。これまでに申請者らは AMPK 活性化により細胞周期の進行を阻止することで Ox-LDL による M ϕ 増殖を抑制すること(*J Biol Chem*. 284: 34561, 2009)を明らかにし、M ϕ 増殖抑制経路における細胞周期制御機構について報告している。

3) 細胞周期制御における Skp2-p27^{kip} 経路の役割

申請者は、上記報告の中で **AMPK がサイクリン依存性キナーゼインヒビター**

(CDKI : cyclin dependent kinase(CDK) inhibitor) p21^{cip}・p27^{kip} を介して M ϕ の細胞周期の調整に重要な役割を担っていることを明らかにしている。

2. 研究の目的

以上の学術的背景から M ϕ 増殖は動脈硬化症の病態に深く関与しているといえる。申請者は、生体内でも AMPK 活性化により動脈硬化巣における M ϕ 増殖が抑制され、動脈硬化症の進展も抑制されることを明らかにし、M ϕ 増殖が動脈硬化症の治療ターゲットとなりうることを報告している(第 16 回国際動脈硬化学会学術会議他)。

本研究では、遺伝子改変マウスを用いて動脈硬化への M ϕ 増殖の病態生理学的な意義を評価することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

・M ϕ 特異的増殖抑制マウス (mac-p27Tg マウス) の作成

1) スカベンジャー受容体(SRA)のプロモーター制御下にサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p27^{kip} を発現する M ϕ 特異的増殖抑制マウス(mac-p27Tg)を作製した。

2) マウスの大腿骨、脛骨より、骨髓細胞を採取した。20% LCM(L cell conditioned medium)で培養し骨髓 M ϕ に分化させた後、培養 7 日目に RNA、蛋白を回収し、p27 の mRNA 及び蛋白の発現を確認した。

* LCM (L cell conditioned medium) : マウス線維芽細胞由来の線維肉腫株(L cell)を培養することで、M-CSF が大量に分泌されたメディウムのこと。M ϕ の分化・増殖のために、この培養上清を 20%加えて使用した。

・mac-p27Tg マウスの M ϕ 増殖抑制の確認

1) 上記同様に骨髓細胞を採取・培養し、cell counting assay kit を用いて経時的な細胞数変化を測定した。7 日目には BrdU を添加し、増殖細胞の DNA への BrdU 取り込みを BrdU assay kit にて定量した。

2) 腹腔 M ϕ に GM-CSF 2nM を加え、cell counting assay kit を用いて細胞数を測定した。

3) 腹腔 M ϕ に Ox-LDL 20 μ g/ml を加え、増殖を BrdU assay kit にて評価した。

4) 炎症性サイトカインの測定

上記と同様に骨髓細胞を培養し、7 日目に LPS(0.1ng/ml)を添加、2 時間後に RNA を抽出し、qRT-PCR によって炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定した。

・M ϕ 増殖抑制の動脈硬化への影響

1) mac-p27Tg マウスと apo EKO マウスを交配し、mac-p27Tg \times apo E KO マウスを作成した。

2) 12、16、20、24 週齢マウスにおける大動脈弁輪部切片の oil red O 染色を行い、動脈硬化病変面積を計測した。

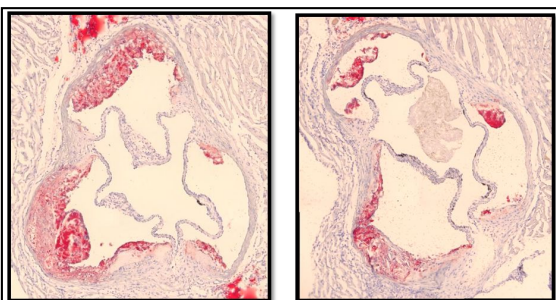
3) 16 週齢マウスにおける大動脈弁輪部切片

を Iba1、Ki67 で二重染色し、Mφ 増殖を評価した。

4) レーザーマイクロダイセクションで回収した動脈硬化病変組織における CD68、炎症性サイトカイン(MCP-1、IL-1β)の mRNA 発現をリアルタイム PCR で測定した。

4. 研究成果

GM-CSF 及び Ox-LDL 投与後の mac-p27Tg マウスの方が優位に増殖抑制されていることを確認した。また mac-p27Tg マウスの骨髄 Mφ に LPS を加え、それに対する炎症性サイトカインの反応を観察したが、IL-6、MCP-1 とともに有意差を認めず、増殖抑制で炎症性サイトカインが変化するわけではないことが確認された。次に動脈硬化への Mφ 増殖の影響を評価するため、Mφ 特異的増殖抑制マウスに動脈硬化モデルマウスである apo E KO マウスを交配し、動脈硬化病変の発症・進展を検討した。Mφ 増殖抑制により、16 週齢及び 20 週齢、24 週齢マウスの大動脈弁輪部におけるプラーク面積が減少した。20 週齢と 24 週齢マウスにおける大動脈弁輪部プラークのネクローシス面積割合が減少した。Mφ 増殖抑制により、プラーク内の Mφ 減少を mRNA 発現及び免疫染色にて認めた。Mφ 増殖抑制により、プラーク内のコラーゲン含有量低下の抑制および Fibrous Cap 菲薄化の抑制傾向を認めた。大動脈弁輪部プラーク及び頸部～胸部大動脈における炎症性サイトカインの mRNA 発現が減少した。以上の研究結果により Mφ の基本性能(単球数、遊走能、接着因子、炎症活性など)は変えず直接的に Mφ 増殖能のみを抑制することで、動脈硬化への Mφ 増殖の病態生理学的な意義を評価できたと考える。



【apo E KO】 【mac-p27Tg/ apo E KO】
16 週齢大動脈弁輪部 oil red O 染色

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. Hanatani S, Motoshima H, Takaki Y, Kawasaki S, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kawashima J, Kukidome D, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Acetate alters expression of genes involved in beige adipogenesis in 3T3-L1 cells and

obese KK-Ay mice. *J Clin Biochem Nutr* 59(3):207-214, 2016.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Murakami S, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Fukuda K, Yamada S, Morita Y, Nishida S, Sato M, Motoshima H, Kondo T, Araki E: Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, suppresses the progression of atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. The 8th AASD Scientific Meeting, 2016/10/27-2016/10/29, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan
2. Murakami S, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Fukuda K, Nishida S, Araki E: Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, suppresses the progression of atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. 第 24 回日本血管生物医学会, 2016/12/8-2016/12/10, 長崎
3. 村上彩子, 松村剛, 瀬ノ口隆文, **石井規夫**, 福田一起, 山田沙理恵, 守田雄太郎, 西田周平, 久木留大介, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: ストレプトゾトシン誘発糖尿病 apoE 欠損マウスにおいてエンパクリフロジンは大血管症進展を抑制する. 第 31 回日本糖尿病合併症学会, 2016/10/7-2016/10/8, 宮城
4. 村上彩子, 松村剛, 瀬ノ口隆文, **石井規夫**, 木下博之, 福田一起, 山田沙理恵, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: ストレプトゾトシン誘発糖尿病 apoE 欠損マウスを用いたエンパクリフロジンによる大血管症進展抑制効果の検討. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016/5/19-2016/5/21, 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/met/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 規夫 (ISHII, Norio)
熊本大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：10599111

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

()