

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06901

研究課題名(和文) 動脈硬化プラークにおける特異的マクロファージの検出

研究課題名(英文) The attempt to detect macrophage subsets specific for atherosclerotic plaque development and regression.

研究代表者

西 仁勇 (NISHI, HITOO)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：70583194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、Pcsk9機能獲得型変異をアデノ関連ウイルスベクターを用いた遺伝子導入により粥状硬化性プラークの進展および退縮に関するマウスモデルを確立した。本モデルにおいて、高コレステロール血症およびその後の粥状硬化性プラーク形成をどのような遺伝子改変マウスにおいても動脈硬化モデルマウスであるアポEまたはLDL受容体欠損マウスと交配させることなく容易に導入することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We have established a mouse model of atherosclerosis plaque progression and regression with gain of function mutation of Pcsk9 gene delivered by adeno-associated virus vector. In this model, hypercholesterolemia and subsequent atherosclerotic plaque formation can be easily induced in any genetically modified mice without crossbreeding with atherogenic ApoE- or LDLr-knockout animals.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

血管の動脈硬化形成を基本病理とする心血管系疾患、すなわち虚血性心疾患(狭心症、心筋梗塞)は世界の死因の第1位、約25%を占める。動脈硬化は様々な要因から形成され、特に脂質異常症、すなわち高LDL(悪玉)、低HDL(善玉)コレステロール血症はこれらの致死的心疾患との強い相関が示されている。最も強力に確立された脂質異常治療法であるスタチン系薬剤(HMGCoA還元酵素阻害剤)を用いた徹底的な脂質管理により、発症リスク軽減が達成されることが多くの臨床試験で示されているが、その割合は3割程度に留まり、多数においては無効である。この不十分なリスク軽減は生体の何らかの不可逆的変化と相関している可能性が高い。

2. 研究の目的

脂質異常による動脈硬化関連の不可逆的変化を有する細胞集団を同定、単離し、原因因子をエピジェネティクスを含めた「ome」解析で網羅的に探索し、最終的に病態解明、新たな予防、治療法開発を目指したい。

3. 研究の方法

(1) アデノ関連ウイルスベクターを用いた機能獲得型 Pcsk9 変異遺伝子(AAV-mPcsk9)を野生型マウスへ導入し、高コレステロール血症およびその後の動脈硬化プラーク巣形成を誘導する。プラーク形成後、薬剤投与および/または食餌変更によりプラーク退縮を導入する。

(2) 動脈硬化プラーク内細胞に4種類の蛍光マーカーのいずれか1つがランダムに発現するマウス(レインボーマウス; 図1)を用いる。これらの4色に加え、2色の蛍光シグナルの検出、つまり2つの抗原を同時に染色できる(図2)。プラーク形成環境下に置き、プラーク内各色マーカー陽性細胞数の割合をみる。動脈硬化進展、退縮において、その割合が他の群に比べ大きく上回るまたは下回る集団は、増殖過程に特異的変化が起きている可能性が高いと判断され、単離および他の群との比較を試みる。また、そのプラーク内分布様式により、細胞数制御における動員、局所増殖間のバランス優位性を評価する(図3)。

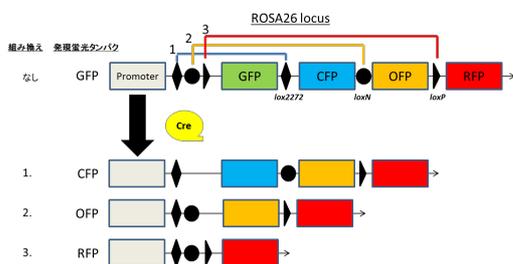


図1 レインボーマウスの概要

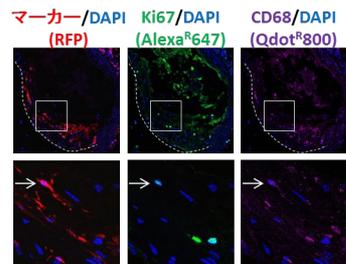
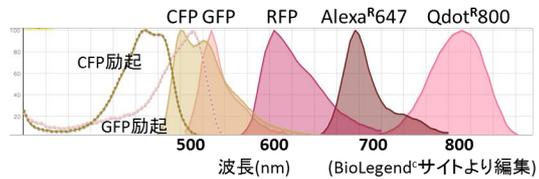


図2 各蛍光マーカーの蛍光波長(上)および共焦点顕微鏡によるプラーク内細胞の4重蛍光染色(下)

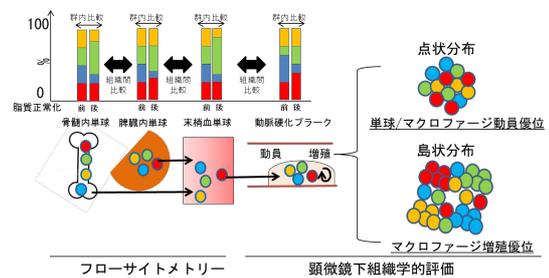


図3 評価方法

4. 研究成果

(1) アデノ関連ウイルスベクターを用いた機能獲得型 PCSK9 変異遺伝子(AAV-mPcsk9)導入による野生型マウスへの動脈硬化プラーク巣形成

野生型マウスなどの非動脈硬化モデルマウスにプラークの形成を誘導する場合、従来では LDL 受容体(LDLr)欠損またはアポ E(ApoE)欠損マウスといったモデルマウスとの交配が必須であり、さらにホモ接合体(*ldlr*^{-/-}、*apoE*^{-/-})が必要となるため、準備にかかる時間、費用が莫大となる。

Pcsk9は細胞内に取り込まれた LDLr の細胞膜表面上へのリサイクルを阻害することにより、細胞膜表面上の LDLr 発現量を負に制御している。ヒトにおいては、機能獲得型および機能喪失型変異が報告されており、特に前者では LDLr 発現量低下により、血漿コレステロールレベル及び動脈硬化性疾患の罹患・死亡率が上昇する。

この機能獲得変異型 Pcsk9(mPcsk9)を過剰発現させることにより、その作用機序から動脈硬化モデルマウスである LDLr 欠損マウスと同様の表現型(高コレステロール血症および動脈硬化性プラークの形成)が得られること

が期待できる。さらに、外部から mPcsk9 遺伝子を導入することにより、あらゆるマウスに容易に動脈硬化を誘導することが可能となる。

今回、アデノ関連ウイルスベクターを用い、mPcsk9 を野生型マウスに導入し、肝臓における LDL 受容体発現および血漿コレステロールレベルを、類似モデルである LDL 受容体欠損マウスと比較したところ、同等ではないものの、同様の結果が得られた(図 4)。

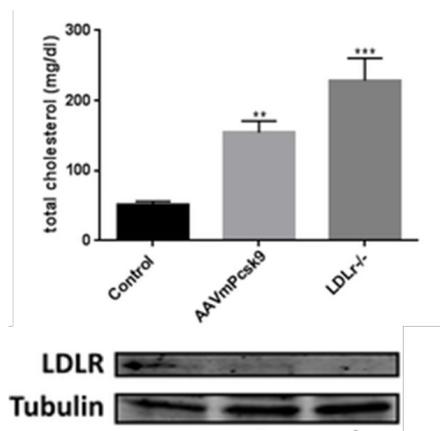


図 4 AAV-mPcsk9 導入

その後、16 週間のウェスタン食餌を行ったところ大動脈全体に著明にプラークの形成が認められた(図 5 および 6)。



図 5 プラークの形成

(2) AAV-PCSK9 導入動脈硬化マウスを用いた退縮モデルの確立

従来の LDLr 欠損マウスを用いた退縮モデルでは、通常食への食餌変更のみでは脂質降下およびプラーク退縮が有意ではなく、薬物(スタチンなどの脂質降下薬)を用いて初めて十分な効果が認められた。

今回は通常食への食餌変更および脂質降下薬(MTP 阻害薬)を用いて、6 週間後に退縮効果を検証した(図 7)。

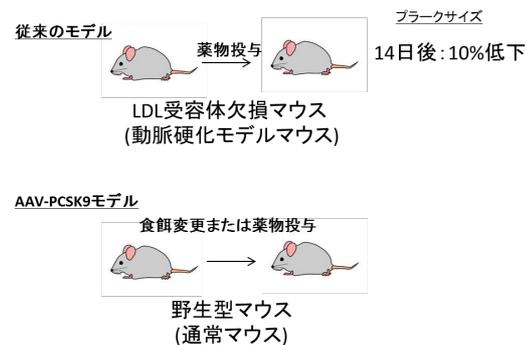
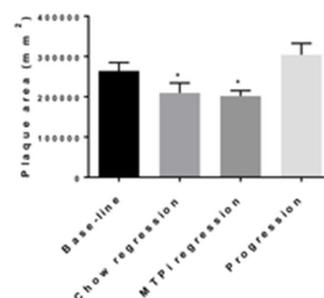
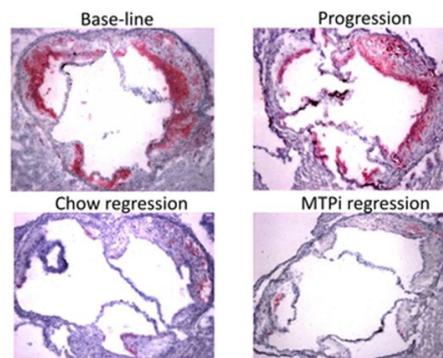


図 7 動脈硬化退縮モデル

その結果、MTP 阻害薬投与群で最も顕著なプラークサイズ(図 8 中)およびマクロファージ含有量(図 8 下; CD68 陽性細胞面積)が減少し、AAV-mPcsk9 導入モデルにおいても従来通りの退縮が誘導できた。

さらに、通常食への食餌変化のみでも退縮効果が認められ、より生理的な状態において退縮過程を検証できる可能性が示された。



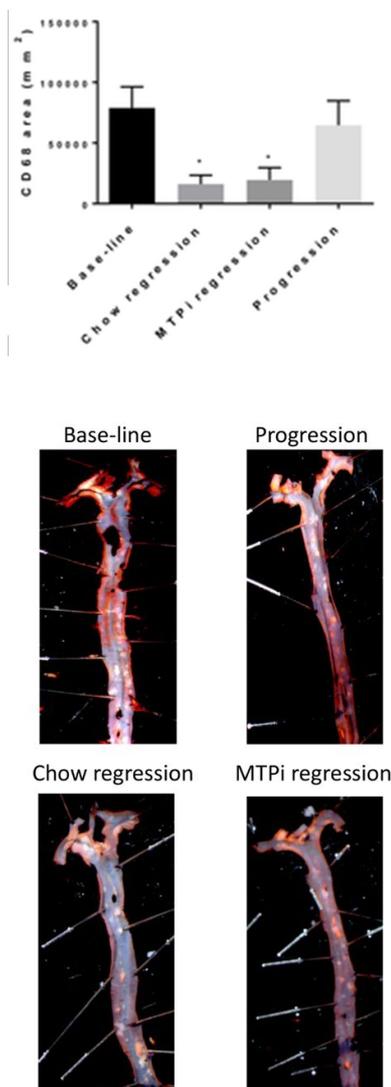


図 8 プラークの定量評価

退縮プラークにおいては、サイズの減少に比較して、著しいマクロファージ含有量の低下を認めた。これは、何らかのプラーク構成成分によりマクロファージが置換されたことを示唆する。退縮モデルにおけるこれまでの報告によると、コラーゲン蓄積によりプラークの安定化に寄与するという。そのため、本退縮モデルにおいても、同様にコラーゲン蓄積を認めるか否かをシリウスレッド染色にて定量評価した。その結果、退縮群において有意なコラーゲン蓄積を認めた(図9)。

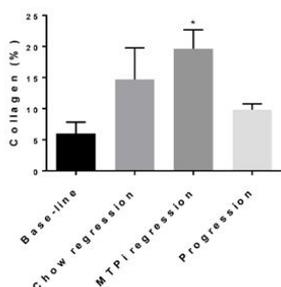


図 9 シリウスレッド染色によるプラーク内コラーゲン蓄積定量評価

AAV-mPcsk9 による肝毒性の有無を評価した。動脈硬化形成期においては、著明な脂肪肝を認めたが、通常食への食餌変化によりほぼ消失した。以上より、本モデルにおける脂肪肝はウェスタン食餌の影響であり、本モデルの実験期間では AAV による遺伝子導入により肝毒性は認めなかった(図10)。

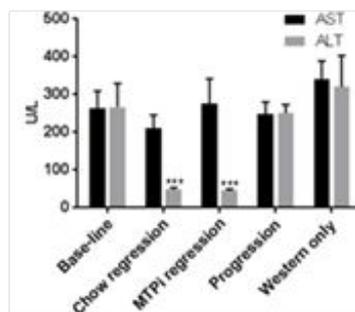
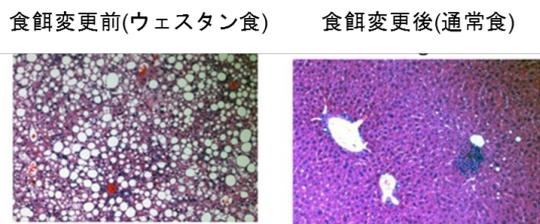


図 10 肝毒性の評価

以上より、AAV-mPcsk9 による動脈硬化退縮モデルが確立されたと考えられる。

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)

Peled M*, Nishi H*, Weinstock A, Barrett TJ, Zhou F, Quezada A, Fisher EA. A wild-type mousebased model for the regression of inflammation in atherosclerosis. PLoSOne.2017;12(3): e 017397

Nishiga M, Horie T, Kuwabara Y, Nagao K, Baba O, Nakao T, Nishino T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Nakamura T, Inada T, Hasegawa K, Conway SJ, Kita T, Kimura T, Ono K.

MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. Circ Res. 2017 Mar 3;120(5):835-847.

Nakao T, Horie T, Baba O, Nishiga M, Nishino T, Izuhara M, Kuwabara Y, Nishi H, Usami S, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Sowa N, Ohno S, Aoki H, Hasegawa K, Sakamoto K, Minatoya K, Kimura T, Ono K. Genetic Ablation of MicroRNA-33 Attenuates Inflammation and Abdominal Aortic Aneurysm Formation via Several Anti-Inflammatory Pathways. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 Nov;37(11):2161-2170.

Baba O, Horie T, Nakao T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Kuwabara Y, Nishiga M, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Kawahara M, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 regulates the population of peripheral inflammatory Ly6Chigh monocytes through dual pathways. Mol Cell Biol. 2018 Apr 30. pii: MCB.00604-17.

Nakazeki F, Nishiga M, Horie T, Nishi H, Nakashima Y, Baba O, Kuwabara Y, Nishino T, Nakao T, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Sowa N, Yoshida S, Conway SJ, Yanagita M, Kimura T, Ono K. Loss of periostin ameliorates adipose tissue inflammation and fibrosis in vivo. Sci Rep. 2018 Jun 4;8(1):8553.

〔学会発表〕(計 1 件)
「動脈硬化退縮と炎症」
『第 48 回日本動脈硬化学会』
西 仁勇 2016 年

〔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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
西 仁勇 (NISHI, Hitoo)
京都大学医学研究科
特定准教授
研究者番号：70583194

(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
()