

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15897

研究課題名(和文) 自然リンパ球とマクロファージの相互作用に注目した動脈硬化の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of atherosclerosis by focusing on the interaction between spontaneous lymphocytes and macrophages.

研究代表者

牛込 恵美(白石恵美)(Ushigome, Emi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80440890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：古典的獲得免疫概念のみでは動脈硬化病態制御は未だ困難である。本研究では、自然免疫を担う自然リンパ球に注目するため、獲得免疫系細胞が存在しないRag2欠損マウスを用いた。動脈硬化モデルマウスであるApoE欠損マウスと交配した二重欠損マウス(Rag2・ApoE 二重欠損マウス)においても、自然リンパ球がマクロファージと相互作用し、動脈硬化巣が形成された。ApoE欠損マウスに、現代食のモデル食である高脂肪高ショ糖食を給仕したところ、腸内細菌叢の乱れ・Dysbiosisが発症し、腸管内において脂質の構成が乱れること、更には吸収された脂質が動脈硬化巣での脂質の構成に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Dysbiosisが、食事中の塩分濃度が上昇することでさらに障害されることが明らかになった。また、動脈硬化巣での飽和脂肪酸の増加、3系脂肪酸の減少は、1型自然リンパ球の増加、2型自然リンパ球の減少を介し、M1マクロファージの増加、M2マクロファージの減少をきたし、動脈硬化巣でのIFN- $\gamma$ ・IL1の発現上昇をきたして、動脈硬化巣での慢性炎症を促進していた。以上より、糖尿病並びに糖尿病合併症に腸内フローラからの腸内代謝産物が深く関与していることが示唆される。今後は、腸内フローラ調節作用に注目し、プレバイオティクス治療による糖尿病合併症発症及び進行予防を目標とした動脈硬化抑制へとつなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used Rag2-deficient mice in the absence of acquired immune system cells to focus on the innate lymphocytes responsible for innate immunity. In the Rag2-ApoE double-deficient mice, the interaction of spontaneous lymphocytes with macrophages led to the formation of atherosclerotic foci, and when ApoE-deficient mice were fed a high-fat, high-sucrose diet, which is a model of a modern diet, the development of Dysbiosis, a disorder of the intestinal flora, and the formation of lipids in the atherosclerotic foci was disrupted.

研究分野：糖尿病内科

キーワード：自然リンパ球 動脈硬化 腸内細菌叢 糖尿病 慢性炎症 リビドーム Dysbiosis

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病合併症の進行予防は国家の医療財政上、最重要課題であり、糖尿病生命予後改善には、動脈硬化・大血管障害の予防が重要である。

動脈硬化の進展において、自然免疫を担当するマクロファージの泡沫化が重要であり、獲得免疫を担当するヘルパーT細胞もマクロファージの活性化において重要な働きをしている。ヘルパーT細胞の活性化は抗原特異的であり、動脈硬化で活性化しているT細胞にも特異的な抗原が存在すると考えられるが明らかでない。

一方、近年、自然免疫系におけるヘルパーT細胞に対応する細胞の集団として自然リンパ球 (innate lymphoid cell: ILC) が同定された。ILCはB細胞およびT細胞受容体を持たず抗体特異的な応答は行わない。一方、さまざまな種類の炎症に関わるサイトカインを産生する能力を持つ。

最近、動脈硬化でマクロファージがコレステロール結晶を取り込み、インフラマソーム活性化が誘導され、IL-1 や IL-18、TNF が放出されることが報告された (Duell P, et al. Nature. 2010)。IL-1 は ILC を強力に活性化するサイトカインであり、ILC1 を活性化するとともに ILC2 を ILC1 の特徴も持つ exILC2 に変化させる (Ohne Y et al. Nature Immunology, 2016)。ILC-1, exILC2 は INF- $\gamma$  を多量に産生するため、マクロファージの活性化が持続する可能性が高い (図1)。

動脈硬化のリスクが高い2型糖尿病患者の末梢血で ILC2 の存在比率が低下、ILC1 の存在比率が増加している可能性を得た。ヒト末梢血単核球における ILC 分画を描出したフローサイトメトリー図を示す(図2)。

### 2. 研究の目的

動脈硬化では ILC1 および exILC2 が炎症性サイトカインを産生、マクロファージを活性化することで炎症反応が慢性化し、動脈硬化が進展拡大するという新しい病態形成機構を提示する。

### 3. 研究の方法

獲得免疫系が存在しない Rag2・ApoE 二重欠損マウス (Rag2・ApoE DKO) を用いて、ILC とマクロファージの相互作用による動脈硬化の形成、ならびに ILC 抑制による動脈硬化抑制、の機序解明を目標とした。

#### Rag2・ApoE DKO マウスにおける獲得免疫系非存在下での動脈硬化の評価

Rag2・ApoE DKO マウス(雄・16週齢)および ApoE 欠損マウス (ApoE KO マウス) に高脂肪高シヨ糖食を8週間給餌、安静麻酔下にサクリファイスし、大動脈を採取した。大動脈弁輪部は4%パラホルムアルデヒドで固定し、クライオスタットにて冠状断・6 $\mu$ m厚で薄切した。薄切した組織標本はオイルレッドOで染色、オイルレッドO染色面積を ImageJ で計測することで動脈硬化面積を評価した。

#### 動脈硬化 ILC の評価

採取した大動脈はコラゲナーゼを用い破碎、得られた細胞混濁液から Percoll 密度勾配遠心にて単核球細胞混濁液を抽出する。抽出した単核球細胞混濁液は、表面染色を実施後透徹・固定し、核内転写因子 T-bet, GATA3, Ror- $\gamma$  t を多重染色し、FACS Cantoll で評価した。

#### 動脈硬化リビドームの評価

大動脈 (15mg) を脂肪酸メチル化キット (ナカライテスク) を用いて脂肪酸抽出および誘導体メチル化処理をした後、GC/MS システム (Agilent7890B/5977B) を用いて リビドーム解析を行った。

#### 脂肪・シヨ糖・塩分による腸内フローラの障害と動脈硬化での炎症

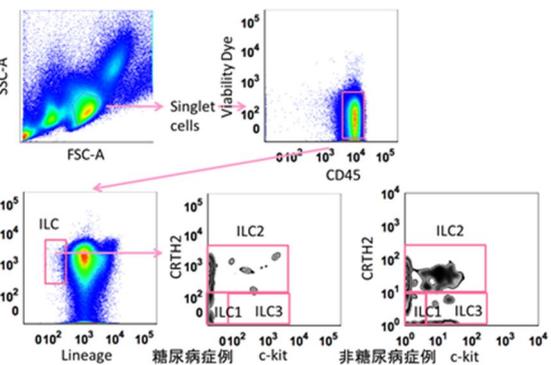
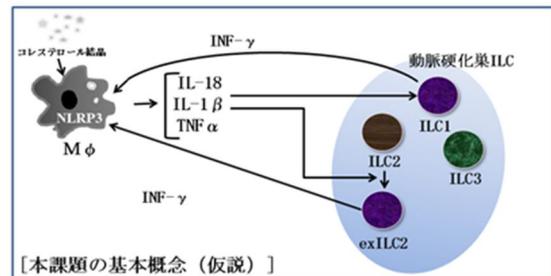
体内のメタボライトは、腸内細菌叢により代謝され、体内に吸収されてくるのがわかってきた。このため申請者らは高脂肪高シヨ糖食による腸内細菌叢の乱れ・Dysbiosis を16S ターゲットシーケンズ法により評価した。

#### 動脈硬化リビドームによる ILC2 の増殖抑制

ヒト末梢血から ILC を Lineage negative, CD127positive を指標に SONY SH800 セルソーターを用いて採取、採取したヒト ILC は OP-9/DL-1 システムにより培養する ex vivo ILC 増殖アッセイを実施した。動脈硬化で濃度の上昇が認められたパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸を添加し、ILC2 の増殖活性を検証している。

#### ILC2 抑制による動脈硬化進展

本申請から ILC1 と ILC2 のバランス・M1 と M2 マクロファージのバランスが動脈硬化の進展において重要である知見を得た。ST2 は ILC2 の活性化に重要であることが報告されている。ILC2 活性化抑制による動脈硬化悪化を確認する目的で ApoE・ST2 DKO マウスを作成し ApoE KO マウス



スの動脈硬化巣と比較、検討している。

#### 4. 研究成果

### Rag2・ApoE DKO マウスにおける獲得免疫系非存在下での動脈硬化

#### 動脈硬化巣 ILC の評価

Rag2・ApoE DKO マウスにおいては獲得免疫系が存在しないが、高脂肪高シヨ糖食で動脈硬化巣が形成された(図3)。

我々は高脂肪高シヨ糖食を給仕した ApoE KO マウスにおいて、ILC1 が増加、ILC2 が減少、M1 マクロファージが増加、M2 マクロファージが減少する、ILC・マクロファージのバランスの変化を観察してきた(図4)。

Rag2・ApoE DKO マウスの動脈硬化巣浸潤炎症細胞においても同様に ILC1 が増加、ILC2 が減少、M1 マクロファージが増加、M2 マクロファージが減少していたが、特に ILC1 の顕著な増加及び M1 マクロファージの顕著な増加を認めた(図4)。

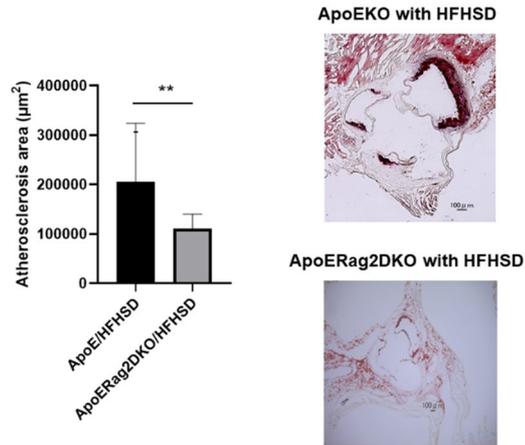


図3. Rag2・ApoE DKO マウスと ApoE KO マウスにおける動脈硬化巣面積の比較

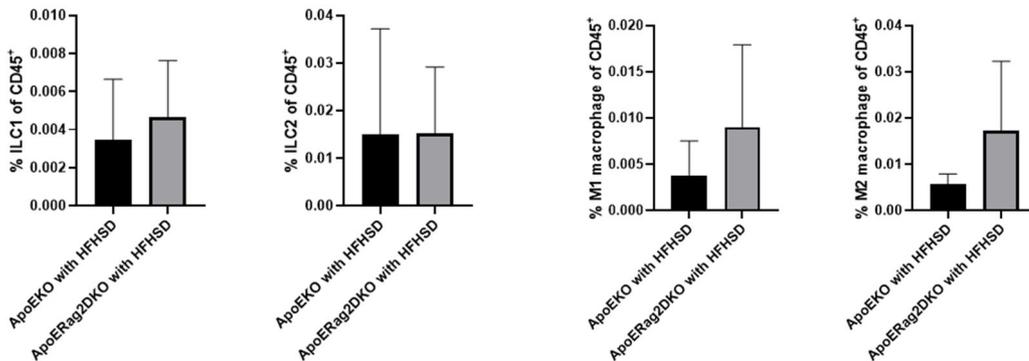


図4 .Rag2・ApoE DKO マウスと ApoE KO マウスにおける動脈硬化巣浸潤免疫細胞

獲得免疫系が存在しない Rag2・ApoE DKO マウスにおいては、動脈硬化巣におけるメタボライトが自然免疫系による慢性炎症を活性化させている可能性を考え、動脈硬化巣でのリピドームを解析することとした。

#### 動脈硬化巣リピドームの評価

高脂肪高シヨ糖食では動脈硬化巣での飽和脂肪酸の増加、 3系脂肪酸の減少を認めた(図5)。

図5.給仕食による動脈硬化巣リピドームの比較

#### 脂肪・シヨ糖・塩分による腸内フローラの乱れと動脈硬化巣での炎症

高脂肪高シヨ糖食では、給仕食自体が含有するリピドームが直接動脈硬化巣の炎症を惹起する可能性に加え、近年、食事により腸内細菌叢が障害される Dysbiosis を介して炎症がおこる可能性が報告されている。このため我々は高脂肪高シヨ糖食での腸内フローラを検討した。

高脂肪高シヨ糖食では Proteobacteria 門の細菌叢が増加し、Bacteroides 門の細菌叢が減少する Dysbiosis を認めた(図6)。

動脈硬化では脂肪の摂取に加え、過剰な塩分摂取がリスクとなることが知られている。塩分の過剰摂取による動脈硬化も、体内に吸収される塩分だけでなく、腸内細菌叢を障害することで動脈硬化のリスクを増加させると考えられている。

このため我々は高脂肪高シヨ糖食における脂質・シヨ糖の組成はそのままに、塩分濃度を 0.29% から 4%、8% と上昇させることでの腸内フローラの変化を検討した。

高脂肪高シヨ糖高塩分食では、Proteobacteria 門の細菌叢が増加し、悪化を認めた。一方、高脂肪高シヨ糖食では Bacteroides 門の細菌叢が減少していたが塩分濃度の上昇ではむしろこの菌叢は増加していた(図6)。

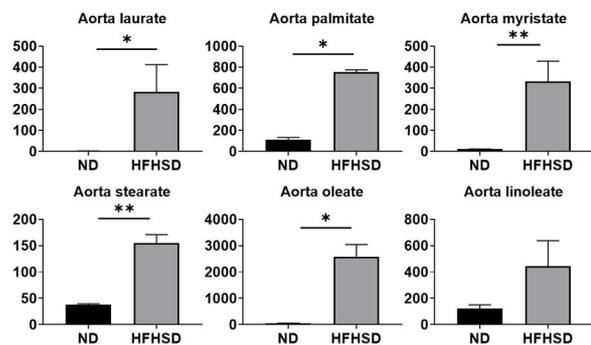
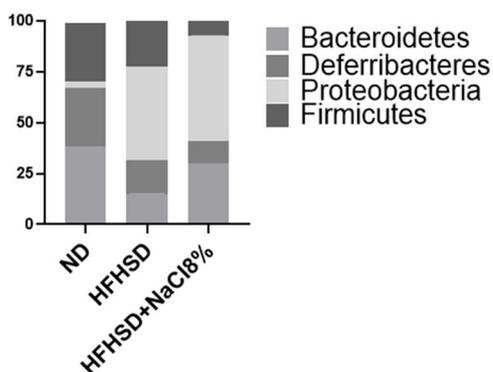


図 6. 腸内細菌叢の比較



以上から脂肪・ショ糖・塩分の過剰摂取では摂食する栄養素が悪化するだけでなく、腸内フローラで Dysbiosis が発症し、自然免疫系の慢性炎症、ならびに体内に吸収されるメタボロームの変化を通じて動脈硬化巣での ILC2 の活性化障害、M1 マクロファージの活性化、M2 マクロファージの活性化障害が発症している可能性を考えた。

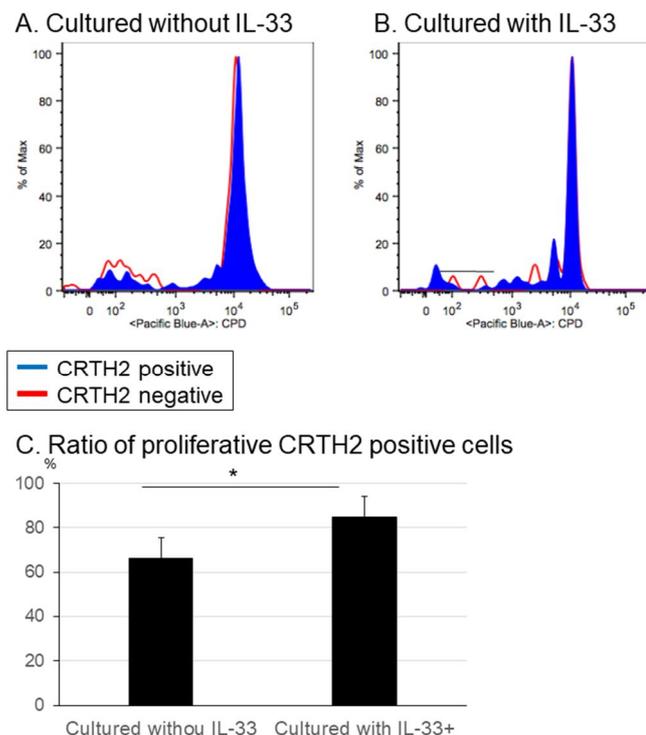
本申請では、ILC とマクロファージの相互作用に注目しており、ILC2 の活性化障害が、M1 マクロファージの活性化、M2 マクロファージの活性化障害の原因となる機序に注目して解析を継続した。

#### 動脈硬化巣リポドームによる ILC2 の増殖抑制

Ex Vivo での ILC 増殖アッセイにより、CRTH2 陽性 ILC2 は IL-33 存在下に増殖活性が高まることを確認している。

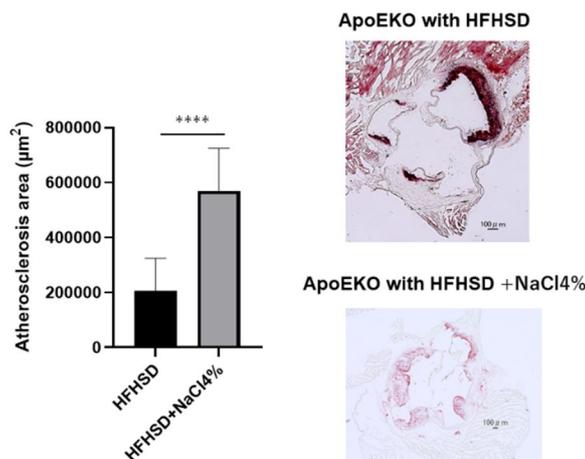
現在、動脈硬化巣リポドームにより、発達した動脈硬化巣で濃度の上昇が認められたパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸により ILC2 の増殖活性が阻害される可能性を考慮し、これを *ex vivo* で検証している(図 8)。

図 8. ヒト ILC を用いた *ex vivo* ILC 増殖アッセイ



Dysbiosis に加え、高脂肪高ショ糖高塩分食を給餌した ApoE KO マウスには動脈硬化巣の更なる進展(図 7)、ILC1 の増加、ILC2 の減少、M1 マクロファージの増加、M2 マクロファージの減少を認めめた。

図 7. ApoE KO マウスにおける動脈硬化巣面積の比較



## ILC2 抑制による動脈硬化進展

最後に ILC2 の活性化障害による動脈硬化進展を ApoE・ST2 DKO マウスを用いて検証した。ST2 は IL-33 の受容体であり、ILC2 の増殖・活性に欠かせない分子として知られている。このため、ST2 KO マウスでは ILC2 の活性化が起きない。ApoE・ST2 DKO マウスの動脈硬化巣を検証したところ、動脈硬化巣の進展が悪化している可能性が示唆された(図9)。

ApoEST2DKO with HFHSD

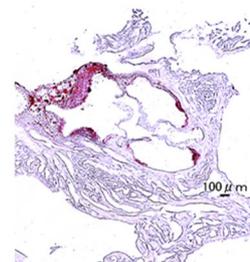


図9. ApoE・ST2 DKO マウスの動脈硬化巣

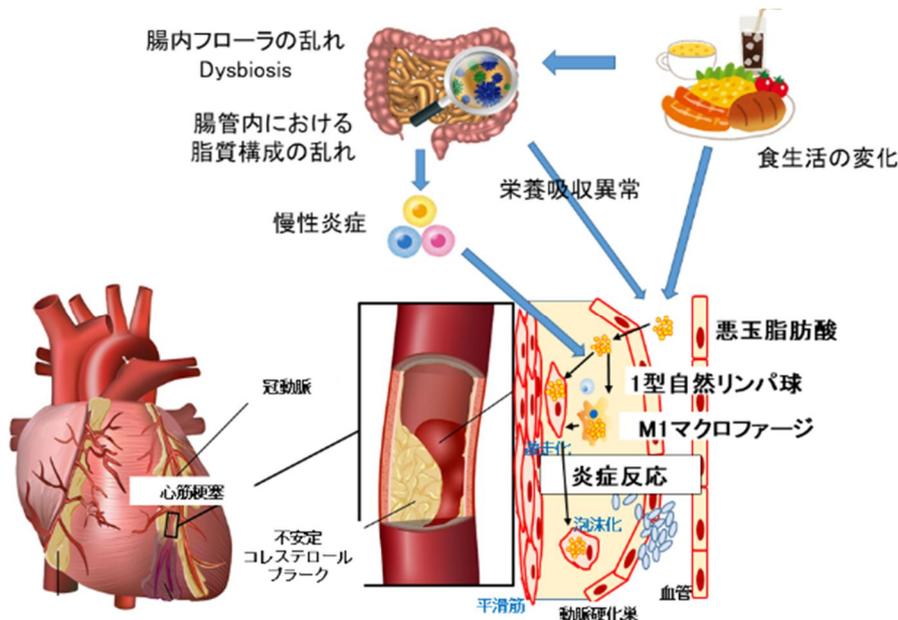
## 結語

ApoEKO マウスでは現代食のモデル食である高脂肪高シヨ糖食が給仕され、動脈硬化巣での飽和脂肪酸の増加、 $\omega$ 3系脂肪酸の減少というリピドームの変化が確認された。

この動脈硬化巣リピドームの変化の原因として、摂取する食事の直接的効果に加え、腸内フローラの乱れ・Dysbiosis が考えられた(図10)。

図10. 食事・腸内フローラと ILC・マクロファージの相互作用

本申請から推測される食事・Dysbiosis が ILC2・M2 マクロファージの活性化を障害、ILC1・M1 マクロファージが活性化し動脈硬化が進展する概念図



動脈硬化巣でのリピドームの変化ならびに腸内フローラの障害が動脈硬化巣での ILC1 の増加、ILC2 の減少を介し、M1 マクロファージの増加、M2 マクロファージの減少をきたし、動脈硬化巣での慢性炎症を促進する病態を想定した。

本申請から獲得免疫系が存在しない Rag2 KO マウスにおいても動脈硬化が進展し、ILC1 の増加、ILC2 の減少、および、M1 マクロファージの増加、M2 マクロファージの減少が観察されていることから、動脈硬化巣における慢性炎症は、獲得免疫系非存在下であっても、メタボライトと ILC・マクロファージの相互作用により発症すると想定された。

この動脈硬化巣での慢性炎症の主要な成因となるメタボライトとしてパルミチン酸をはじめとする飽和脂肪酸を想定しており、パルミチン酸存在下での ILC2 の活性化障害を現在検証している。

さらに、パルミチン酸をはじめとする飽和脂肪酸の増加だけでなく  $\omega$ 3系脂肪酸の減少も認められたため、高脂肪食による飽和脂肪酸の過剰供給だけではなく、Dysbiosis による腸管内での細菌叢による脂肪酸代謝の障害も重要であると考えている。

今後は、食品による腸内フローラ調節作用により動脈硬化が抑制されることを検証し、その際の腸内フローラの改善、腸内代謝産物の同定、動脈硬化巣リピドームの改善とそれにとまなう慢性炎症の抑制を確認する。本申請から動脈硬化巣リピドームの評価系ならびに慢性炎症の評価系を確立できており、この評価方法を用いて、腸内フローラの改善と動脈硬化の抑制を検証していく。

これらの手法を用いることで、動脈硬化抑制をもたらすプレバイオティクス治療の開発が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牛込恵美, 福田拓也, 濱口真英, 田中武兵, 浅野麻衣, 山崎真裕, 福井道明.
2. 発表標題 動脈硬化モデルマウスの大動脈および脂肪組織における自然リンパ球の検討.
3. 学会等名 第61回糖尿病学会年次学術集会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大藪知香子, 濱口真英, 北川功幸, 福田拓也, 牛込恵美.
2. 発表標題 2型糖尿病患者における自然リンパ球の解析
3. 学会等名 第61回糖尿病学会年次学術集会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村智紀, 芳村悠太, 岡村拓郎, 橋本善隆, 千丸貴史, 牛込恵美, 濱口真英, 山崎真裕, 福井道明.
2. 発表標題 高塩分食が腸内細菌叢のDysbiosisにより動脈硬化を発症する.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会.
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----