

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16081

研究課題名(和文) マクロファージを介した動脈硬化促進機構を操る血液線溶因子Plasmin活性の役割

研究課題名(英文) The Role of Blood Fibrinolytic Factor Plasmin Activity in Manipulating Macrophage-mediated Mechanisms of Atherosclerosis Promotion

研究代表者

宮嶋 ちはる (Miyajima, Chiharu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師

研究者番号：40770798

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)：本研究では、高脂血症において最も罹患数が多いヒト a型家族性高脂血症のモデルマウスであるLDL受容体およびRNA編集酵素APOBEC1のダブル欠損マウス(Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-})からプラスミノーゲン(Plg)を欠損させ、動脈硬化の発症に対するPlgの影響を解析した。PlgはM¹のLDL取り込みに関与するスカベンジャー受容体の発現には影響せず、直接LDLのサイズを制御することによってM¹の泡沫化を制御し、動脈硬化の増悪をコントロールする新たな病態発症メカニズムが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義はヒトのLDL-C高脂血症を反映するLdlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}マウスを用いて、動脈硬化に対するPlg/P1m活性化システムの影響を解明している点にある。多くの研究に汎用されているApoe^{-/-}マウスはIII型のモデルであり、大多数のヒト家族性高脂血症の病態を反映していない。申請者らはLdlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}マウスを用いて、動脈硬化の発症・促進に、M¹上におけるPlg/P1mを介した血液線溶系の活性化が重要であると見出した。本研究により、動脈硬化へのPlg/P1mの機能が解明され、Plg/P1m活性化システムに標的を絞った特異的な薬の開発にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the effect of plasminogen (Plg) on the development of atherosclerosis in mice double-deficient (Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}) in the LDL receptor and RNA-editing enzyme APOBEC1, a mouse model of human type IIa familial hyperlipidemia, the most common form of hyperlipidemia in humans. Plg did not affect the expression of scavenger receptors involved in LDL uptake by M¹, suggesting a novel pathogenetic mechanism that controls M¹ atherosclerosis progression by directly regulating LDL size.

研究分野：高脂血症

キーワード：マクロファージ 動脈硬化 プラスミノーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はヒトにおいて最も罹患率が多い a 型家族性高脂血症モデル *Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* マウスを用いて、フィブリノゲン(Fib)や PAI-1 など血液凝固線溶系因子の動脈硬化に対する機能の解明を行ってきた (*Iwaki et al., Blood, 107, 2006, Iwaki et al., Blood, 108, 2006*)。その中で、動脈硬化の原因となる脂質が異なるモデルマウスでは、血液凝固線溶系因子による動脈硬化形成の影響が異なることが明らかになった。VLDL-C や IDL-C が高い *Apoe^{-/-}* マウスの Fib 欠損では動脈硬化の形成が抑制されるにも関わらず、LDL-C が高い *Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* マウスの Fib 欠損では動脈硬化の形成が促進される (*Lou et al., Proc., Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1998*)。ヒトの動脈硬化病変における血液凝固線溶系因子の機能解明には適切な疾患モデルを用いることが重要であると示唆された。Plg 活性化を抑制し Plm を低下させる PAI-1 は動脈硬化で高い値をとり、*Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* マウスの PAI-1 欠損では動脈硬化が抑制されると明らかにするなど、Plg/Plm に寄与する多くの因子が動脈硬化に影響し、Plg/Plm もまた深く関与することが推察された。Plg の動脈硬化に対する影響は *Apoe^{-/-}* マウスでのみ解析されていたが、*Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* マウスを用いた結果、大きく異なる結果が得られたことから研究を進めた。

2. 研究の目的

動脈硬化は、マクロファージ (Mφ) が内皮下に蓄積した酸化 LDL を貪食し泡沫化することによって形成される。LDL は脂質を構成成分とするため、高脂血症は動脈硬化を増強する。高脂血症による動脈硬化の進行は生死に関わるが、初期症状が乏しく、発症や形成メカニズムについてほとんど明らかになっていない。申請者はこれまでに高 LDL-コレステロール血症を特徴とする a 型家族性高脂血症モデルにおいて、線溶系の主体となる Plasminogen(Plg)や Plg の活性化体である Plasmin が Mφ の遊走能及び、酸化 LDL の取り込み能を活性化し動脈硬化を促進することを明らかにした。しかしながら、Plg/Plm が Mφ の機能をどのように活性化するか、そこに Plg から Plm への活性化がどう影響するか疑問が残る。本研究では①Mφ 活性化に関与する遺伝子・蛋白発現に Plg/Plm が及ぼす影響②Mφ 上の受容体を介した Plm/Plg 活性化が動脈硬化の形成に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、Plg/Plm が M の機能を促進するメカニズムを解明し、さらに M 上の受容体を介した Plg/Plm 活性化システムが動脈硬化の形成に及ぼす影響を解明することを試みた。

Plg/Plm による SR 発現を介した M の機能制御を解析

Plg が M の OxLDL 取り込みに関与する SR 遺伝子の発現に影響するか検討する。SR の中でも、SRA, CD36, LOX-1, 及び SR-PSOX は M の泡沫化に重要な役割を果たす。主要な SR を中心に、*Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* マウス及び *Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}/Plg^{-/-}* マウスの腹腔及び骨髄由来 M から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR によって、Plg による遺伝子発現の影響を検討する。腹腔に加えて、骨髄から分化させた M を検討することにより、Plg の表現型及び、遺伝子型の影響を同時に検討する。また、両マウスの M 上に発現する SR の発現量について、フローサイトメトリーを用いて比較検討する。

M 上の受容体を介した Plg/Plm 活性化システムが動脈硬化の形成に及ぼす影響を解明
TAKE 法を用いた CRISPR/Cas9 システムによる Plg-R_{KT}, uPAR, uPA 欠損マウスを樹立し、作製したモデルマウスの高脂血症及び動脈硬化に注目し表現系を検討する。表現系の検討では、

- ・高脂血症に対する影響: Plg-R_{KT} などの脂質代謝への影響を検討するため、a 型家族性高脂血症モデルマウスから樹立した各種欠損マウス (*Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}/Plgrkr^{-/-}* など) の血中 T-Cho, LDL-C、及び HDL-C を測定し、*Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* マウスと比較検討する。
- ・動脈硬化に対する影響: 各種欠損マウス大動脈における動脈硬化を *Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* マウスと比較検討する。
- ・動脈硬化病変の詳細な検討: 動脈硬化病変に変化があったモデルマウスの病変の脂質蓄積や M の有無、及び動脈硬化病変の繊維化等を検討する。

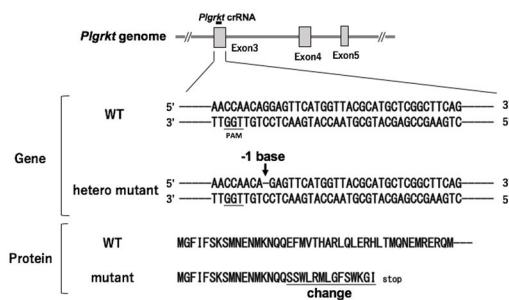
4. 研究成果

本研究では、ヒト a 型家族性高脂血症モデルマウス *Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* を用いて動脈硬化の発症メカニズムについて検討を行っている。Plg 遺伝子を欠損した *Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}/Plg^{-/-}* 欠損マウスは *Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}* マウスに比べ LDL-C の上昇が認められるが、動脈硬化の形成が 10% 程

度に抑えられていた。またマクロファージ (Mφ) による OxLDL 取り込みは Plg の存在下で上昇し、Plg 活性化体 Plm の阻害剤の存在下で抑制された。以上から Mφ における LDL 取り込みは Plm を介して制御されていることが明らかになった。そこで、Plg/Plm が Mφ による OxLDL 取り込みの主役であるスカベンジャー受容体 (SR) の発現を介して Mφ の機能を制御するか解析を進めた。主要な SR(CD36、CD204)を中心に、両マウスの腹腔及び骨髄由来 Mφ から mRNA を抽出し、Plg による遺伝子発現の影響を検討した。Plg の遺伝子型の影響を検討した骨髄由来 Mφ において、Plg 欠損は SR 遺伝子発現に影響は与えなかった。また、腹腔由来 Mφ においても、Plg による SR 遺伝子発現に影響は認められなかった。引き続き、Plg の SR のタンパク発現や LDL 側への影響を検討することで、Plg/Plm による Mφ の泡沫化の制御について詳細なメカニズムを明らかにし動脈硬化の治療や制御の解明に大きく貢献する。

また、Plg/Plm 活性化システムが動脈硬化の形成に及ぼす影響を解明するため、新規の遺伝子改変マウス作製法である iGONAD 法を用いて病態モデルマウスを作製した。Ldlr^{-/-}/ApoBec1^{-/-}マウス由来の Plg-RKT ノックアウトマウスの作製では、Plg-RKT 遺伝子の Exon 3 にヘテロ 1 塩基欠損を持つマウスの作製に成功した(図 1)。また、SR および uPA ノックアウトマウスはバッククロスが終了し、現在、病態解析を行っており、今後新たな研究結果を得る予定である。本研究の成果のよって、Plg/Plm の受容体をはじめとする関連因子の動脈硬化へ寄与が明らかとなり、新たな病体メカニズムと治療標的の同定に繋がること期待できる。

図 1. Ldlr^{-/-}/ApoBec1^{-/-}/Plgrkt^{+/+} マウス (変異ヘテロ) の作製に成功した



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishikawa Sakiko, Inoue Yasumichi, Hori Yuka, Miyajima Chiharu, Morishita Daisuke, Ohoka Nobumichi, Hida Shigeaki, Makino Toshiaki, Hayashi Hidetoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-Inflammatory Activity of Kurarinone Involves Induction of H0-1 via the KEAP1/Nrf2 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 842 ~ 842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9090842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyajima Chiharu, Kawarada Yuki, Inoue Yasumichi, Suzuki Chiaki, Mitamura Kana, Morishita Daisuke, Ohoka Nobumichi, Imamura Takeshi, Hayashi Hidetoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcriptional Coactivator TAZ Negatively Regulates Tumor Suppressor p53 Activity and Cellular Senescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 171 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9010171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyajima Chiharu, Iwaki Takayuki, Uemura Kazuo, Ploplis Victoria A., Castellino Francis J.	4. 巻 2018
2. 論文標題 Characterization of Atherosclerosis Formation in a Murine Model of Type IIa Human Familial Hypercholesterolemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/1878964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宮嶋ちはる
2. 発表標題 転写共役因子 TAZ によるがん抑制遺伝子 p53 の活性抑制を介した細胞老化制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮嶋ちはる
2. 発表標題 Transcriptional Coactivator TAZ Negatively Regulates Tumor-Suppressor p53 Activity
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柏原翔陽
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素USP17による 脂質代謝関連転写因子SREBPタンパク制御機構の解析
3. 学会等名 第19回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中本 遥菜
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素USP28はEMT関連転写因子Snai1を安定化してがん細胞の浸潤を促進する
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中本 遥菜
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素USP28はEMT関連転写因子Snai1を安定化してがん細胞の浸潤を促進する
3. 学会等名 日本薬学会 東海支部2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮嶋ちはる
2. 発表標題 高LDL血症におけるマクロファージ泡沫化に対するPlasmin活性の役割
3. 学会等名 第20回 pharmaco-hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮嶋ちはる
2. 発表標題 Foam Cell Formation is Regulated by Plasmin in a Murine Model of Type a Familial Hypercholesterolemia
3. 学会等名 第92回日本薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiharu Miyajma
2. 発表標題 The Activation of Plasmin/Plasminogen system Accelerates Atherosclerosis in a Murine Model of Type a Familial Hypercholesterolemia
3. 学会等名 第18回慶北-浜松合同医学シンポジウム浜松会議(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiharu Miyajma
2. 発表標題 Plasmin Activity Promotes Atherosclerosis in a Murine Model of Type IIa Familial Hypercholesterolemia Plasminogen Deficiency Attenuates Atherosclerosis in a Murine Model of Type a Familial Hypercholesterolemi
3. 学会等名 第40回血栓止血学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiharu Miyajma
2. 発表標題 Plasminogen Deficiency Attenuates Atherosclerosis in a Murine Model of Type IIa Familial Hypercholesterolemia
3. 学会等名 XXVI Isth Congress and 63rd Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関