

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390094
 研究課題名(和文) アポトーシス抑制因子 AIM の動脈硬化に関連する機能と作用機序の包括的な研究
 研究課題名(英文) Analysis of entire roles for AIM in atherosclerogenesis.

研究代表者
 宮崎 徹 (MIYAZAKI TORU)
 東京大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：30396270

研究成果の概要：

- (1) AIM に結合するタンパク質の候補が複数得られた。
- (2) ヒト血中 AIM 濃度測定系 (ELISA 法) を確立した。これにより、動脈硬化あるいは大動脈瘤や脳心臓血管障害など動脈硬化を基盤とする疾患や、他のメタボリックシンドロームと血中 AIM 濃度の関連性、もしくは疾患の進行度と血中 AIM 濃度の関連性を解析することが可能となった。
- (3) 適時不活性化が可能な AIM コンディショナルノックアウトマウスのターゲティングベクターの構築を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：動脈硬化、マクロファージ、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は代表的な生活習慣病、メタボリックシンドロームの中心的な疾患であり、遺伝性もしくは栄養摂取の偏重による高脂血症が重要な素因の一つであるが、その後の動脈硬化病変巣の形成には様々な生理機能の異常が複雑に関与していることが明らかになってきている。動脈硬化巣形成において最も重要な病態生理は、(1) 酸化LDL

Lを取り込んだ泡沫化マクロファージの血管内皮下層での蓄積、と、(2) 蓄積したマクロファージによる病変部の慢性持続性炎症、である。興味深いことに病変部のマクロファージは、酸化LDLや炎症刺激が誘導するアポトーシスに対し強い抵抗性を示し、そのことが泡沫化細胞の蓄積、ひいては炎症反応の持続を強く促進していると考えられる。したがって、マクロファージのアポト

ーシス抵抗性を人為的に制御することができれば、高脂血症下でも動脈硬化の発症・増悪を抑制できる可能性があると考えられる。

病変部のマクロファージがなぜ顕著なアポトーシス抵抗性を示すのか、その生理的メカニズムは長らく不明であったが、我々は、我々自身が単離した、種々の細胞ストレスに対する抵抗性を細胞に誘起する分泌タンパク AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) が、酸化 LDL の摂取による核内受容体 LXR の活性化を介して動脈硬化巣のマクロファージに強く発現され、病変部のマクロファージのアポトーシス抵抗性を著しく高めていることを発見した。AIM によるマクロファージのアポトーシス抑制効果は、病変部での泡沫化マクロファージの蓄積を促進し、結果的に動脈硬化を増悪させており、したがって AIM を欠損した動脈硬化モデルマウス(LDL 受容体欠損マウス)では、動脈硬化の著しい軽減が観察された。すなわち動脈硬化に関連する AIM の機能と作用メカニズムを包括的に研究し、その結果を元に AIM の機能制御を効果的かつ安全に動脈硬化の予防・治療に応用することは、非常に有用であると考えられた。

2. 研究の目的

将来的に人における動脈硬化性疾患の制御を目指して、AIM の機能と作用メカニズムとその動脈硬化病態への関わりを、分子から個体レベルに至るまで詳細かつ包括的に解析する。

(1) AIM による抗アポトーシス作用メカニズムの解析: AIM 受容体およびその結合分子の同定・単離し、AIM によるアポトーシス抑制のメカニズムを明らかにする。

(2) 動脈硬化性疾患のマーカーとしての可能性の検討: 動脈硬化あるいは大動脈瘤や脳心臓血管障害など動脈硬化を基盤とする疾患を持つ患者の血清で AIM の濃度を計測し、疾患の種類や進行度との関係を調べ、将来的に AIM が動脈硬化性疾患の有効なマーカーとなりえるかを検討する。

(3) 動脈硬化の異なる病的段階(初期、増悪期、後期)における AIM の役割の検討: AIM 遺伝子の不活化を適時誘導できる動脈硬化モデルマウス系の確立し、それぞれの段階で AIM が不活性化したときに病態にどのような影響を与えるかを観察し、既存の動脈硬化巣に対する AIM 抑制の治療的效果を検討する。

3. 研究の方法

(1) AIM による抗アポトーシス作用の包括的解析: AIM 受容体とその結合分子の単離

Yeast two-hybrid 法: AIM を bait として結合分子をスクリーニングする。

プロトアレイ法: 293 細胞に過剰発現させたリコンビナントヒト AIM-HA タンパク質を用いてプロテインアレイを行い、AIM に結合するタンパク質をスクリーニングする。

免疫沈降-マスマスペクトル解析: リコンビナント AIM (rAIM) を添加したマクロファージ細胞や、AIM を過剰発現させた細胞、マウス(トランスジェニックマウス)から単離した細胞組織から AIM と共に結合分子を免疫沈降させ、マスマスペクトル解析法でアミノ酸配列を解析する。

(2) 動脈硬化性疾患のマーカーとしての可能性の検討: ヒト血中 AIM 濃度測定系の確立
ヒト AIM に対するモノクローナル抗体を作製し、ヒト AIM に対するサンドイッチ ELISA 測定系の確立を試みる。

(3) 動脈硬化の異なる病的段階における AIM 欠損の治療効果検討: ドキシサイクリンの体外からの投与により Cre リコンビナーゼの発現を誘導し、LoxP で挟まれた複数の AIM 遺伝子のエクソンを削除するシステム(コンディショナルノックアウトマウス)により、AIM 遺伝子の適時不活性化を誘導できるマウスを作製するためのターゲティングベクターの構築を行う。

4. 研究成果

(1) AIM による抗アポトーシス作用の包括的解析: AIM 受容体とその結合分子の単離

Yeast two-hybrid 法

全長マウス AIM タンパク質を bait として Yeast two-hybrid 法により、結合タンパク質を探索したところ、NADH 脱水素酵素などが候補タンパク質として得られた。これらについて実際の結合を検討中である。

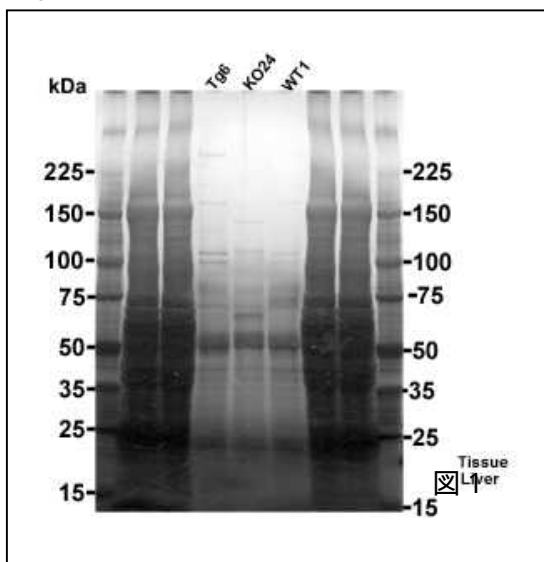
プロテインアレイ法

293 細胞に過剰発現させ、精製したヒト AIM-HA を用いてプロテインアレイ(プロトアレイ)を行い、結合タンパク質の候補を数種類得た。そのうち受容体の候補になりそうな膜タンパク質は 6 種類あった。現在これらについて実際の結合を検討中である。

免疫沈降-マスマスペクトル解析

より生理的な環境における AIM 結合タン

パク質を道程するために、マウス組織を用いて解析を行った。高脂肪食を負荷すると肝臓の Kupffer マクロファージが AIM を強く発現することがわかっていることから、高脂肪食を負荷した野生型 (WT) マウス、AIM-/- (KO) マウス、AIM トランスジェニック (TG) マウスの肝臓を摘出し、溶解して抗 AIM 抗体で免疫沈降した沈降物を SDS-PAGE で電気泳動し、タンパク質染色を行った。その際、KO になく WT もしくは TG にのみ見られるバンドが数種類得られた (図 1)



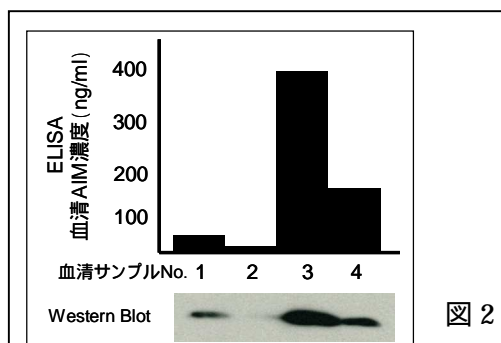
(2) 動脈硬化性疾患のマーカーとしての可能性の検討

抗ヒト AIM 抗体の作製:

まず、ヒトおよびマウスリコンビナント HA-AIM タンパク質の大量精製系の確立を行った。すなわち、293T 細胞に HA-AIM タンパク質を産生させ、大量の培養上清から抗 HA 抗体カラムを用い、精製 AIM-HA タンパク質を得られた。これをマウスに免疫し脾細胞からハイブリドーマを作製・スクリーニングし、35 種類の抗 AIM 抗体産生クローンを確立した。そのうち、17 クローンの抗体がヒト AIM タンパク質も認識することが分かった。

ヒト血中 AIM 濃度測定系の確立

AIM のヒト血清中の濃度を動脈硬化のマーカーとして応用するために、作製したなかから 2 種の抗体を用い、ヒト AIM に対する ELISA 測定系を確立した (図 2)。これらの抗体 (クローン # 6、# 7) は、それぞれヒト AIM の異なるドメインを認識するもので、認識部位が重ならないこと、また血清中の AIM を特異的に認識していること、を種々の AIM バリエーションタンパク質を用いた競合試験を行うことで確認した。現在、動脈硬化関連疾患を持つヒト患者血清について測定を行っている。



(3) 動脈硬化の異なる病的段階における AIM 欠損の治療効果検討: ドキシサイクリンの体外からの投与により Cre リコンビナーゼの発現を誘導し、LoxP で挟まれた複数の AIM 遺伝子のエクソンを削除するシステム (コンディショナルノックアウトマウス) により、AIM 遺伝子の適時不活性化を誘導できるマウスを作製するためのターゲティングベクターのデザイン、構築を行った。現在、ES 細胞に導入、相同組み換えを試みている。

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 4 件)

Kurabe, N., Arai, S., Nishijima, A., Kubota, N., Suizu, F., Mori, M., Kurokawa, J., Kondo-Miyazaki, M., Ide, T., Murakami, K., Miyake, K., Ueki, K., Koga, K., Yatomi, Y., Tashiro, F., Noguchi, M., Kadowaki, T., & Miyazaki, T. The death effector domain-containing DEDD supports S6K1 activity via preventing Cdk1-dependent inhibitory phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284:5050-5055 (2009). (査読有)

倉部誠也, 新井郷子, 宮崎 徹 DEDD による細胞周期と細胞サイズの調節, *生化学*, 81: 24-26 (2009). (査読無)

新井郷子, 宮崎 徹 マクロファージのアポトーシス制御による新しい動脈硬化治療の可能性, *実験医学*, 26: 3030-3036 (2008). (査読無)

Miyazaki, T. & Arai, S. Two distinct controls of mitotic Cdk1/cyclin B1 activity requisite for cell growth prior to cell division. *Cell Cycle* 6:1419-1425 (2007). (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

宮崎 徹, メタボリックシンドロームの新しい分子メカニズム, Metabolic Hypertension Conference, 2008/12/13, 大阪

宮崎 徹, メタボリックシンドロームと 2 型糖尿病の病態解析と新しい治療法の開発, 第 12 回 Molecular Cardiovascular Conference, 2008/9/6, キロ口

宮崎 徹, AIM と DEDD によるメタボリックシンドロームの新しい分子メカニズム, 日本動物科学技術 2008 大会, 2008/5/16, 仙台国際センター

宮崎 徹, アポトーシス抑制因子 AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) の機能抑制による動脈硬化の新しい治療法開発を目指して, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007/12/12, パシフィコ横浜

宮崎 徹, アポトーシス抑制因子 AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) の機能抑制による動脈硬化の新しい治療法開発を目指して, 第 24 回日本疾患モデル学会, 2007/9/1, つくば国際会議場

宮崎 徹, アポトーシス抑制因子 AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) の機能抑制による動脈硬化の新しい治療法開発を目指して, 日本アポトーシス研究会, 2007/8/4, 東邦大学

宮崎 徹, 動脈硬化とマクロファージのアポトーシス, 第 80 回日本内分泌学会学術総会, 2007/6/15, 東京国際フォーラム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 徹 (MIYAZAKI TORU)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30396270

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

新井 郷子 (ARAI SATOKO)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 60422276