

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08511

研究課題名(和文) 活性化好中球が動脈硬化症における慢性的血管炎症を進展させる機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism for development of chronic vascular inflammation in atherosclerosis by activated neutrophil

研究代表者

吉田 雅幸 (Yoshida, Masayuki)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：80282771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：好中球細胞外トラップ(neutrophil extracellular trap; NET)は好中球の活性化によって起こるが、その形成過程で起こる好中球ヒストンタンパクのシトルリン化が動脈硬化症モデルマウスであるLDL受容体欠損マウスに対する高脂肪食摂取によって認められ、それは血中CXCL1の上昇による好中球に発現するインテグリンの活性化によって起こることが分かった。さらに、活性化した好中球ではCCL2の発現と分泌が増加し、単球遊走を誘導した。これらの結果からNETは動脈硬化症の発症や進展に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは動脈硬化症における血管炎症反応における単球・マクロファージの重要性が言われてきたが、本研究では好中球が重要な役割を果たしていることを明らかにした点に新規性がある。さらに、好中球ヒストンシトルリン化の制御は動脈硬化症における新しい治療ターゲットとしての可能性が示唆され、動脈硬化症に対する今後の創薬や予防に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil extracellular traps (NETs) are induced by activation of neutrophils, and citrullination of histone proteins in neutrophil that occurs during NETs formation were observed in LDL receptor null mice fed high-fat diet which are atherosclerosis model mice. Furthermore, it activated 2 integrin expressed in neutrophils by elevation of blood CXCL1. The expression and secretion of CCL2 significantly increased in activated neutrophils, and it caused monocyte migration. These results suggested that NET may be involved in the initiation and progression of atherosclerosis.

研究分野：動脈硬化、血管炎症、脂質異常

キーワード：好中球細胞外トラップ 白血球接着 血管炎症 動脈硬化症 好中球 in vivoイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) アテローム性動脈硬化症の発症や進展は炎症と密接に関与する。過剰な脂質摂取や脂質異常症などにより血管壁が障害され、傷害部位に単球が遊走・接着する血管炎症反応によって発症・進行する。さらに接着した単球は血管内皮下へ浸潤し、マクロファージに分化して血管壁に沈着した脂質を取り込み、泡沫化することによりその病態を増悪すると考えられている。これまでの動脈硬化症における炎症反応に関する研究成果は単球、マクロファージや慢性炎症の関与について多くの研究成果が発表されているが、申請者らは動脈硬化症発症原因のひとつである過剰な高脂肪食摂取による血管炎症反応初期の機序を明らかにし、好中球の重要性について下記の成果を論文発表した(Osaka M. et. al. SciRep. 2016)。

1. 高脂肪食摂取早期(4週間負荷)の血管炎症反応初期段階において血中の補体成分 C5a が特異的に上昇し、血管内皮への好中球接着が起こる。

2. 好中球特異的抗体の投与により好中球を消失させたマウスでは、高脂肪食摂取による内皮下での単球様白血球集積の増加を抑制する。

(2) LDL 受容体欠損マウスと野生型マウスともに4週間の高脂肪食摂取では血管炎症が起こるが、16週間の高脂肪食摂取では野生型マウスでは炎症反応が沈静化した。LDL 受容体欠損マウスでは血中の炎症性因子や好中球数、内皮下に集積する白血球数の増加がさらに亢進していた(未発表データ)。これらの結果から野生型マウスと LDL 受容体欠損マウスの動脈硬化巣形成の違いにおいて、炎症反応の違いが関与することが考えられた。

2. 研究の目的

申請者らは好中球の活性化が亢進することにより好中球細胞外トラップ(NETs)を起こし、血管内膜への接着が強固となり慢性炎症を惹起することで動脈硬化巣形成を誘導するのではないかと仮説を立てた。そこで、本申請では動脈硬化巣形成前の LDL 受容体欠損マウスを使って NETs が動脈硬化症に関与することを検証し、その機序の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化症モデル動物である LDL 受容体欠損(LDLR^{-/-})マウスあるいは野生型マウス(C57BL/6J; et)に20%脂質1.25%コレステロール含有高脂肪食(HFD)を与えて4週間後に大腿動脈における白血球接着現象を *in vivo* イメージングによって観察した。さらに、接着する白血球分画を同定するために、顆粒特異的に GFP を発現する LysM-eGFP-LDLR^{-/-}マウスに対する好中球特異的抗体 1A8 の投与による好中球枯渇下での白血球接着の観察を行った。さらに、高脂肪食を摂取した LDL 受容体欠損マウスに対する peptidylarginine deiminase4 (PAD4) 阻害剤の投与下での白血球接着を観察した。また、これらのマウスの末梢血から抗 Ly-6G 抗体結合ビーズを使って好中球を分離し、シトルリン化ヒストン H3 に対する免疫染色を行った。

(2) 好中球ヒストンシトルリン化を誘導する炎症性因子を同定するために、LDLR^{-/-}マウスあるいは野生型マウスの血漿に対してサイトカインビーズアレイ (BD[™] Cytometric Bead Array ; BD Pharmingen) を行った。また、同定された CXCL1 刺激と PAD4 阻害剤処理を行った骨髓由来好中球におけるシトルリン化ヒストンタンパクに対する免疫染色を行った。さらに、CXCL1 を刺激したヒト好中球に対して PAD4 阻害剤を処理してヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) に対する接着実験を行い、好中球ヒストンのシトルリン化による血管内皮細胞に対する好中球接着への影響について *in vitro* で検証した。

シトルリン化による好中球接着の機序を調べるために、好中球様培養細胞株である分化 HL-60 に CXCL1 を刺激して、活性化 $\beta 2$ インテグリンに対する免疫染色とファロイジン染色によるアクチン重合を評価し、PAD4 阻害剤によるこれらの変化についても同様に観察した。

(3) 補体成分 C5a を刺激した活性化好中球様分化 HL-60 をボイデンチャンバーの下層に添加し、上層にはヒト単球細胞株 THP-1 を加えて活性化好中球による単球遊走を評価した。さらに、活性化 dHL-60 による CCL2 発現変化をリアルタイム PCR と培養上清に対する ELISA により測定を行った。

(4) 血中脂質の関与を調べるために、LDLR^{-/-}マウスに選択的 PPAR α モジュレーター (ペマフィブラート) を 0.3mg/kg/day, 28 日間経口投与を行った後に *in vivo* イメージングによる白血球接着の観察、免疫染色による好中球ヒストンタンパクのシトルリン化の評価、ELISA による血中炎症性因子の濃度測定を行った。

4. 研究成果

(1) LDLR^{-/-}マウスに対する高脂肪食摂取は、野生型に対して大腿動脈における白血球接着は有意に増加していた(図1)。さらに、高脂肪食を摂取させた LDLR^{-/-}LysM-eGFP マウスに対する特異的抗体 1A8 投与による好中球枯渇下では白血球接着が消失し(図2)、クロドロネートリポソームによる単球枯渇下では変化がみられなかったことから、接着する白血球分画は好中球で

あることが示された (図3)。さらに、高脂肪食摂取をした LDLR^{-/-}マウスの好中球は、野生型マウスや普通食摂取をした LDLR^{-/-}マウスに対してヒストン H3 タンパクのシトルリン化が亢していた (図4)。

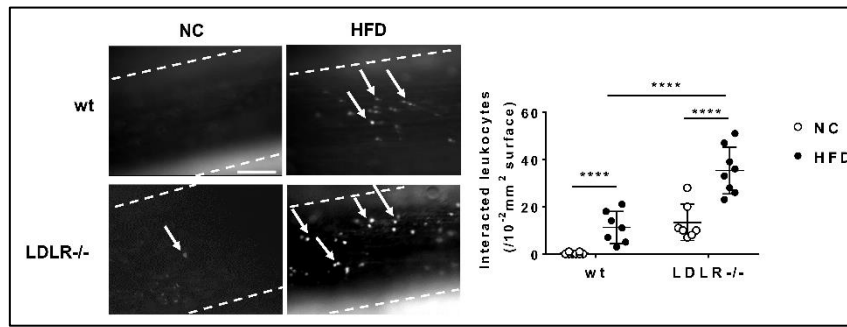


図1 高脂肪食あるいは普通食摂取による野生型あるいは LDLR^{-/-}マウスにおける白血球接着

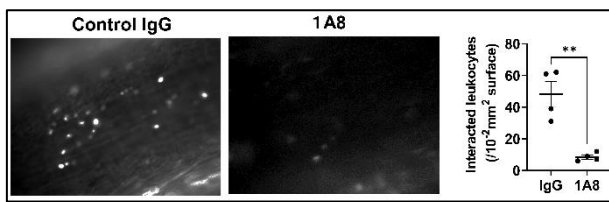


図2 好中球消去下での白血球接着

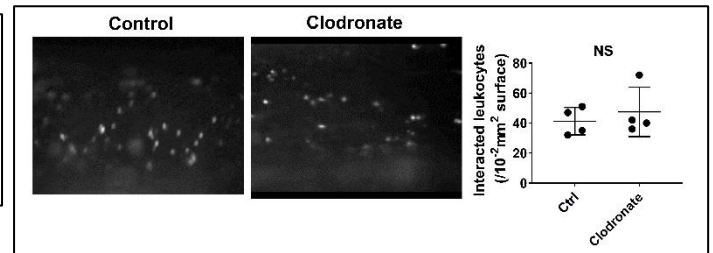


図3 単球消去下での白血球接着

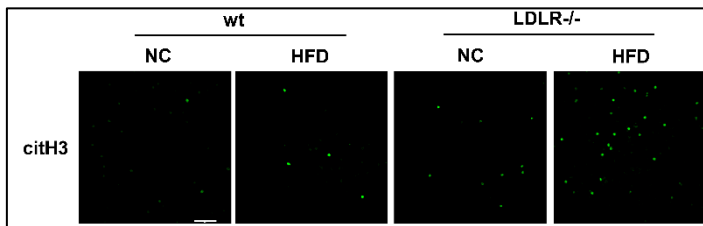


図4 分離した好中球におけるシトルリン化ヒストン H3 に対する免疫染色。緑はシトルリン化ヒストンを示す。

(2) 高脂肪食摂取後の野生型マウスに対して LDLR^{-/-}マウスでは CXCL1 の特異的な上昇がみられた。また、ELISA でも CXCL1 は有意に上昇していた (図5)。さらに、CXCL1 を刺激したマウス骨髄由来好中球はヒストン H3 のシトルリン化を呈した。さらに、CXCL1 を投与した LDLR^{-/-}マウスでは大腿動脈における好中球接着が起こり、PAD4 阻害剤投与によって接着現象は有意に減少した (図6)。同様に、CXCL1 はヒト好中球においても HUVEC に対する接着を増強し、PAD4 阻害剤はこれらの接着を減弱した (図7)。

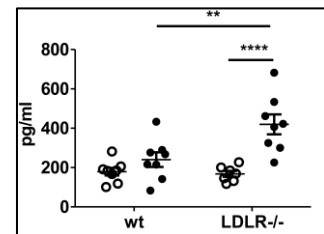


図5 血中 CXCL1 濃度

図6 PAD4 阻害剤 (TDFA) 投与下での好中球接着。

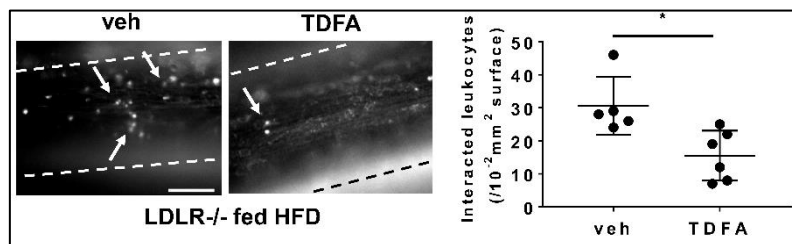
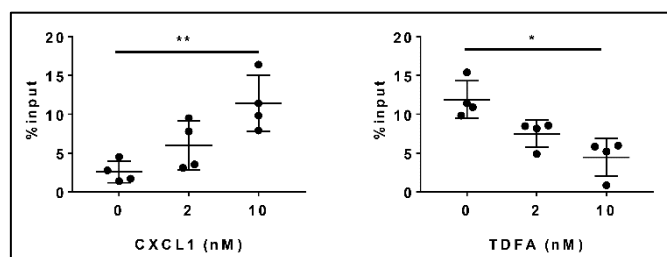


図7 ヒト好中球に対する CXCL1 あるいは PAD4 阻害剤処理による HUVEC への接着数の変化



CXCL1 を刺激した好中球様分化 HL-60 ではアクチン重合が起こり、 $\beta 2$ インテグリンの活性化がみられ、PAD4 阻害剤によって活性化が抑制されたことから、ヒストンタンパクのシトルリン化

によってβ2インテグリンの活性化が起こり、血管内皮に対する好中球接着が起こることが示唆された(図8)。

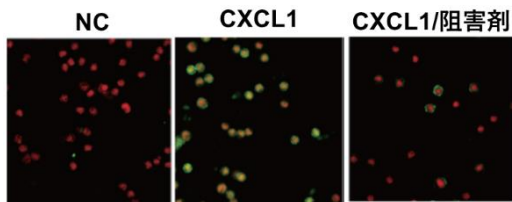


図8 好中球様分化HL-60における活性化β2インテグリンの免疫染色。

緑：活性化β2インテグリン、赤：核

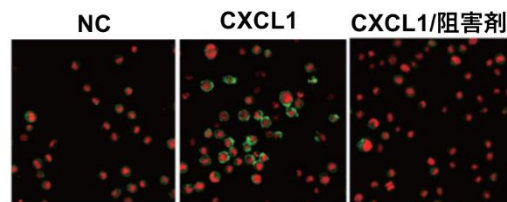


図9 好中球様分化HL-60に対するフェロイジン染色。

緑：フェロイジン、赤：核

(3) C5aによって活性化した好中球様分化dHL-60はTHP-1の遊走を有意に増加した(図10)。さらに、活性化したdHL-60はCCL2を分泌し(図11)、THP-1に対するCCR2アンタゴニスト(BMS)処理によって遊走が抑制されたことから、活性化好中球はCCL2を分泌することにより単球遊走を誘導することが示唆された。

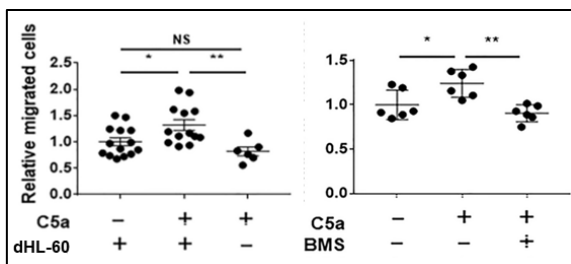


図10 活性化分化dHL-60によるTHP-1遊走

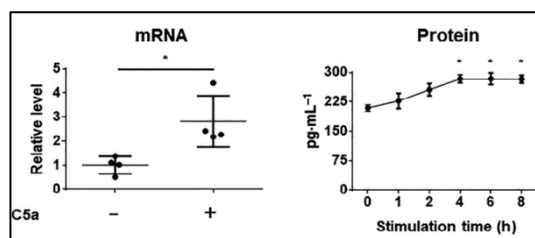


図11 活性化dHL-60におけるCCL2発現

(4) LDLR^{-/-}マウスに対するペマフィブラートの投与は血中中性脂肪を劇的に改善し、さらに血中CXCL1濃度の減少と好中球ヒストンのシトルリン化の抑制、好中球接着の減弱をみとめた(図12)。

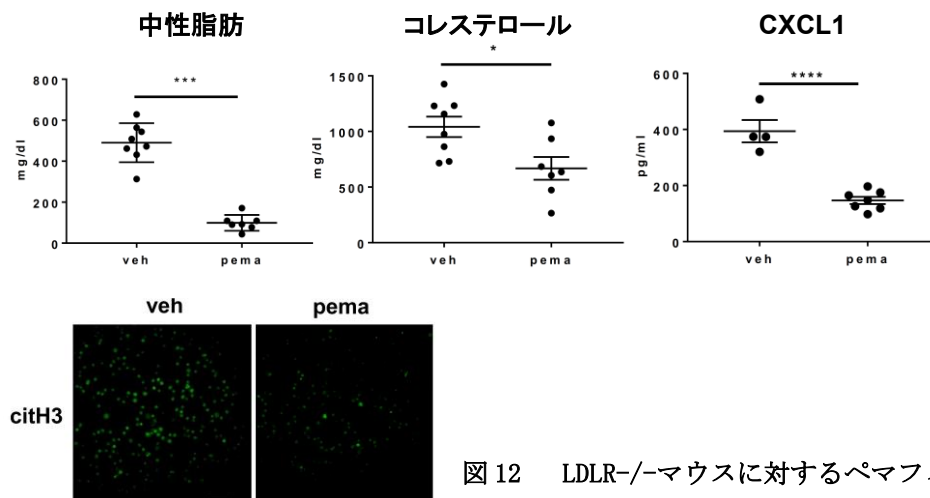


図12 LDLR^{-/-}マウスに対するペマフィブラートの効果

これらの結果から血中CXCL1の上昇が好中球のヒストンシトルリン化を招き、血管内膜への好中球接着が起こることで血管炎症が誘発することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aoyama Jiro, Osaka Mizuko, Deushi Michiyo, Hosoya Shoichi, Ishigami Akihito, Maehara Taketoshi, Yoshida Masayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 CXCL1-Triggered PAD4 Cytoplasmic Translocation Enhances Neutrophil Adhesion through Citrullination of PDIA1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.63237	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 Osaka M, Deushi M, Aoyama J, Funakoshi T, Ishigami A, Yoshida M	4. 巻 -
2. 論文標題 High-fat diet enhances neutrophil adhesion in LDLR null mice via hypercitrullination of histone H3.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青山 二郎, 大坂 瑞子, 細谷 祥一, 吉田 雅幸
2. 発表標題 蛋白シトルリン化は 2インテグリンの活性化を介して好中球の血管内皮細胞接着現象を亢進する
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坂 瑞子, 出牛 三千代, 吉田 雅幸
2. 発表標題 好中球のヒストンシトルリン化はLDL受容体欠損マウスにおける血管内膜への好中球接着を亢進する
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坂 瑞子
2. 発表標題 生化学で切り込む循環器研究の最前線 動脈硬化症関連血管炎症における好中球ヒストンのシトルリン化の重要性
3. 学会等名 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青山 二郎, 大坂 瑞子, 吉田 雅幸
2. 発表標題 CXCL1 誘導性好中球接着亢進に好中球 Peptidylarginine deiminase 4 による細胞 質シトルリン化を介する integrin 活性化が 関与する
3. 学会等名 29回日本血管生物医学会学術集会(心血管代謝週間2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坂 瑞子, 吉田 雅幸
2. 発表標題 高脂肪食によるマウス白血球接着亢進現象にはケモカイン CXCL1 を介する好中 球のヒストン H3 シトルリン化が関与する
3. 学会等名 29回日本血管生物医学会学術集会(心血管代謝週間2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuko Osaka, Masayuki Yoshida
2. 発表標題 Pemafibrate attenuates high-fat diet-induced neutrophil adhesion via inhibition of histoneH3 citrullination in LDLR-/- mice.
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jiro Aoyama, Mizuko Osaka, Masayuki Yoshida
2. 発表標題 CXCL1-induced neutrophil adhesion enhancement involves α 2 integrin activation via cytosolic citrullination by PAD4
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mizuko Osaka, Michiyo Deushi, Masayuki Yoshida
2. 発表標題 動脈硬化症関連血管炎症反応における好中球でのヒストンシトルリン化の重要性.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大坂 瑞子、出牛 三千代、吉田 雅幸
2. 発表標題 アテローム性動脈硬化症発症前血管炎症におけるヒストンシトルリン化好中球の重要性
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大坂 瑞子、出牛 三千代、吉田 雅幸
2. 発表標題 選択的PPAR α アゴニスト、ペマフィブラートはLDL受容体欠損マウス大腿動脈における高中性脂肪血症を改善し、白血球接着を抑制する
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大坂 瑞子
2. 発表標題 PAD4誘導性ヒストンシトルリン化によるLDL受容体欠損マウスにおける血管炎症のメカニズム
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大坂 瑞子
2. 発表標題 LDLR欠損マウスにおける高脂肪食誘発性血管炎症には好中球細胞外トラップが関与する
3. 学会等名 第27日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青山 二郎
2. 発表標題 シアストレス存在下の好中球 - 血管内皮細胞接着現象におけるケモカインCXCL1の役割
3. 学会等名 第27日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	大坂 瑞子 (Osaka Mizuko) (00581711)	東京医科歯科大学・統合研究機構・助教 (12602)	

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
---------	---------