

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790735

研究課題名（和文）動脈硬化の発生・進展におけるキチナーゼの役割

研究課題名（英文）Role of Chitinase in the Development and Advance in Atherosclerosis

研究代表者

北本 史朗（KITAMOTO SHIRO）

九州大学・大学院医学研究院・客員助教

研究者番号：00380436

研究成果の概要（和文）：

培養マクロファージにおける過剰発現・抑制実験で、キチナーゼは PPAR $\gamma$ 、LXR $\alpha$  を介して CD36、ABCA1、ABCG1 発現を増加することによりコレステロール取込み及び Apo-AI 依存性排泄を亢進し、AP-1 活性化抑制により炎症性サイトカイン MCP-1、TNF $\alpha$  発現を低下することが明らかとなった。ApoE 欠損マウスの動脈硬化病変はキチナーゼ阻害剤投与により有意に増加したことから、キチナーゼは抗動脈硬化的に働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Experiments overexpressing or inhibiting chitinase in cultured macrophages revealed that chitinase increased CD36, ABCA1, and ABCG1 expression via PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$  pathway, promoted cholesterol uptake and Apo-AI dependent cholesterol efflux, and decreased inflammatory cytokines MCP-1 and TNF $\alpha$  expression by suppressing AP-1 transcriptional activity. Administration of chitinase inhibitor increased atherosclerotic lesion in ApoE knockout mice. These data suggest that chitinase has anti-atherosclerotic effects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化、キチナーゼ、マクロファージ、炎症、コレステロール代謝

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、虚血性心疾患（狭心症、心筋梗塞）、脳卒中（脳梗塞、脳出血）、大動脈疾患（大動脈瘤、大動脈解離）、閉塞性動脈硬化症など様々な疾患の原因となる重要な血管疾患であり、その治療・予防は現在の重要な課題となっている。

申請者はカニクイザルの動脈硬化モデルの研究で、スタチン（プラバスタチン）投与

あるいは変異型 MCP-1 遺伝子導入により動脈硬化病変が縮小することを報告しているが、同研究においてマイクロアレイアッセイにより多遺伝子発現解析を行ったところ、スタチン投与群および変異型 MCP-1 遺伝子導入群では動脈硬化病変におけるキチナーゼ遺伝子の発現が減少していること、キチナーゼ遺伝子の発現は動脈硬化病変の程度と相関することを発見した。キチナーゼは糖質分解酵

素であり、生体内においては主に活性化マクロファージから多量に分泌され、栄養源キチナーゼの分解、生体構成成分の分解、生体防御機構などに関わることが報告されている。これまでに動脈硬化との関連では、キチナーゼ活性がヒトの動脈硬化病変で最大 55 倍上昇していること、冠動脈狭窄病変を有する患者では血中キチナーゼ活性が上昇し冠動脈狭窄病変の重症度と相関することが報告されている。しかし、動脈硬化の発症機序におけるキチナーゼの直接的な役割を明らかにした研究は今までに全くなされていない。また、喘息のない人に比べてキチナーゼファミリーである YKL-40 の血中濃度が重症喘息の患者で高いこと、酸性哺乳類キチナーゼ (AMCase) が喘息のヒト肺組織およびマウスの喘息モデルにおいて増加しており、マウスの喘息モデルで AMCase を阻害すると Th-2 関連サイトカインの IL-13 を介して炎症を抑制することが報告されている。このようにキチナーゼファミリーの免疫シグナルへの関与が明らかにされていること、動脈硬化は慢性炎症性疾患であることから、動脈硬化の発生過程においてキチナーゼが何らかの役割を果たしている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、キチナーゼが動脈硬化の発生・進展においてどのような役割を果たしているのか (促進的に働いているのか抑制的に働いているのか)、またその作用機序は何かを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro* 実験

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞を用いて、以下の検討を行った。

① <キチナーゼの発現調節の検討>  
RAW264.7 細胞に IFN- $\gamma$  (Th1) あるいは IL-4、IL-13 (Th2) 刺激を行った。また、アセチル化 LDL、AGE-BSA、LPS、MCP-1 刺激による影響についても検討を行った。

② <キチナーゼ過剰発現・抑制によるマクロファージ機能への影響の検討>

キチナーゼの過剰発現には pcDNA3.1 マウスキチナーゼ発現プラスミド遺伝子の導入、キチナーゼの抑制にはキチナーゼ阻害剤ア

ロサミジン (東京大学 作田庄平先生より供与) 投与またはマウスキチナーゼ miR RNAi 発現プラスミド (BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Kit, Invitrogen) 遺伝子の導入を行い、以下について検討した。

(a) 遊走能 (Boyden chemotaxis chamber)

(b) コレステロール代謝 (コレステロール取込み能・排出能、泡沫化)・コレステロール代謝関連遺伝子 (ABCA1、ABCG1、SR-A1、CD36、PPAR  $\gamma$ 、LXR  $\alpha$ ) 発現

(c) 動脈硬化関連サイトカイン発現 (IL-1、IL-6、IL-12、TNF  $\alpha$ 、MCP-1 を realtime PCR により測定)・転写因子活性 (AP-1、NF- $\kappa$ B の活性化をゲルシフトアッセイにより評価)

### (2) *in vivo* 実験

<ApoE 欠損マウスの動脈硬化の発生におけるキチナーゼの役割の検討>

12 週齢の ApoE 欠損マウスにミニ浸透圧ポンプ (ALZET Model 2006) を用いて対照液、あるいはアロサミジン (1mg/kg/日) を投与し、同時に 6 週間高脂血症食 (21%脂肪、0.15%コレステロール) を与えた (各群 6 匹作製)。2 週間毎に採血を行いキチナーゼ活性、血中コレステロール値を測定し、6 週間後に血圧・脈拍を測定し、心臓~左右腸骨動脈分岐部を採取した。心臓~大動脈基部は新鮮凍結連続切片を作製し、各切片は mac-3 (マクロファージ) 免疫染色、CD4 (T 細胞) 免疫染色、 $\alpha$ -actin (平滑筋細胞) 免疫染色、Ki67 (細胞増殖) 免疫染色、Oil red-O (脂肪) 染色、Sirius Red (コラーゲン) 染色、Verhoeff-van Gieson (エラスチン) 染色を行い、動脈硬化病変の大きさ・性状を解析した。大動脈弓部~左右腸骨動脈分岐部はホルマリン固定後に切開・展開・ピン固定し、Oil red-O 染色を行い動脈硬化病変の表面積を計測した。

## 4. 研究成果

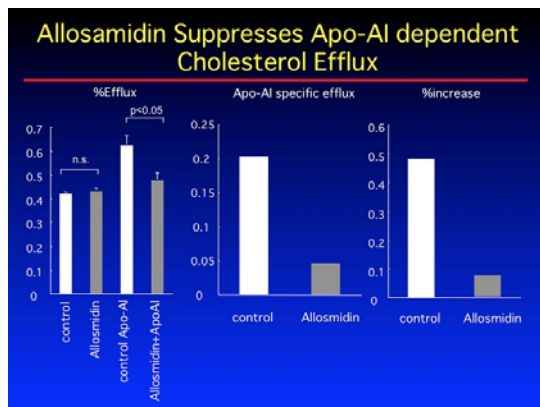
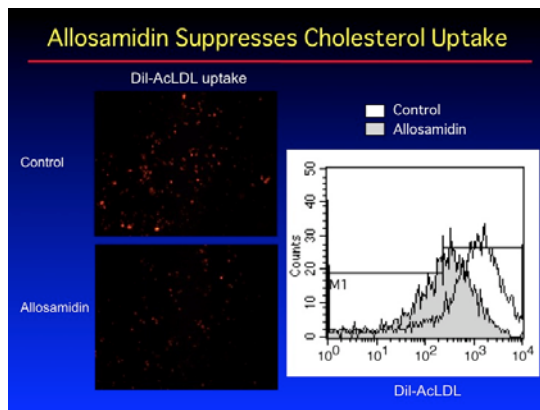
### (1) *in vitro* 実験

① <キチナーゼの発現調節の検討>  
RAW264.7 細胞において、IFN- $\gamma$ 、アセチル化 LDL、AGE-BSA、LPS 刺激によりキチナーゼ mRNA 発現増加 (realtime PCR 法) およびキチナーゼ活性増加を認めた。

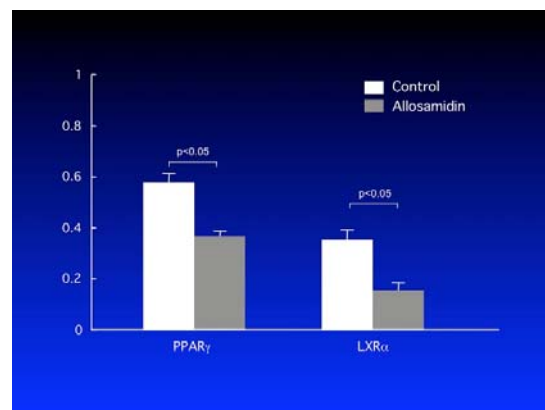
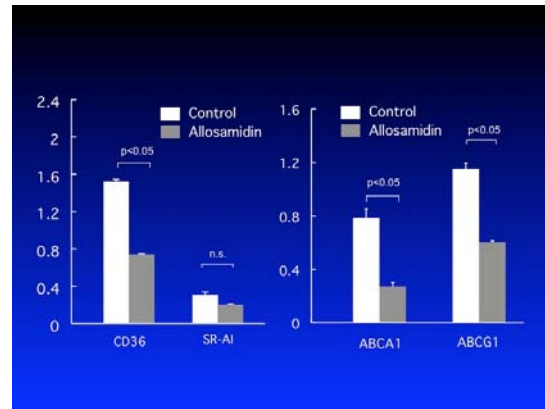
②<キチナーゼ過剰発現・抑制によるマクロファージ機能への影響の検討>

(a)マクロファージの遊走能は、キチナーゼの過剰発現、アロサミジンによるキチナーゼの抑制とともに抑制された。miR RNAi 発現遺伝子導入による特異的阻害実験では有意差を認めなかった。

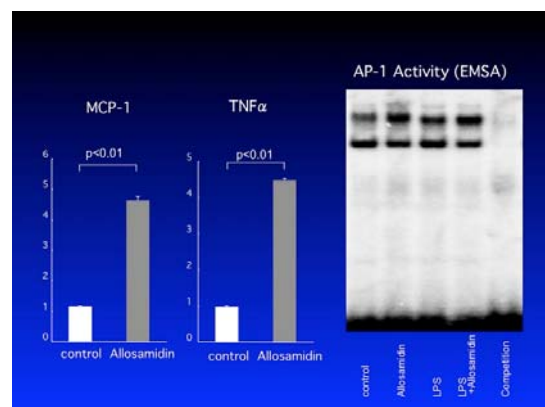
(b)コレステロール代謝では、アロサミジンによるキチナーゼの抑制により、コレステロールの取込み能および ApoAI 依存性排出能がともに抑制された（下図）。また、マクロファージの泡沫化（コレステロール取り込み能・排出能の変化の総合的な結果）に関しては、アロサミジン処置により明らかな変化を認めなかった。



キチナーゼ過剰発現、miR RNAi 発現遺伝子導入後に評価したコレステロール代謝では、一定の結果を得られなかった。コレステロール代謝関連遺伝子発現は代謝の結果と一致して、アロサミジンにより ABCA1、ABCG1、CD36 の mRNA 発現は低下し、それらの調節因子である PPAR $\gamma$ 、LXR $\alpha$  の発現低下を認めた（下図）。



(c)動脈硬化関連サイトカイン発現は、MCP-1 および TNF $\alpha$  がキチナーゼ過剰発現により減少し、アロサミジンおよび miR RNAi 発現遺伝子導入による抑制により増加した。その他のサイトカインに関しては有意な変化を認めなかった。また、アロサミジンにより転写因子 AP-1 の活性増加を認めた（下図）。



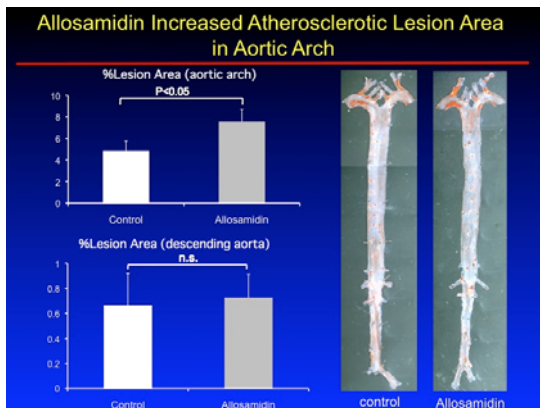
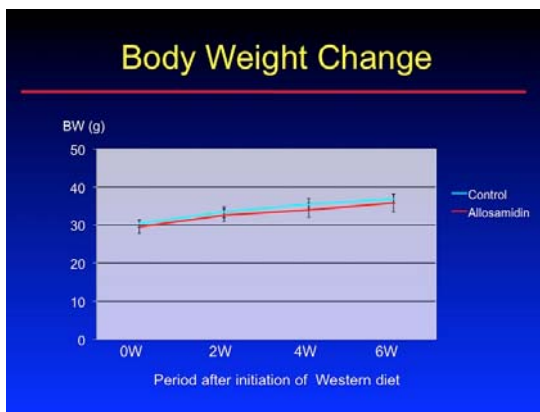
(2) *in vivo* 実験

<ApoE 欠損マウスの動脈硬化の発生・進展におけるキチナーゼの役割の検討>

西洋食投与期間中の体重、投与終了時の血圧、脈拍数、総コレステロール値、中性脂肪値に2群間で有意差は認められなかった(下図)。

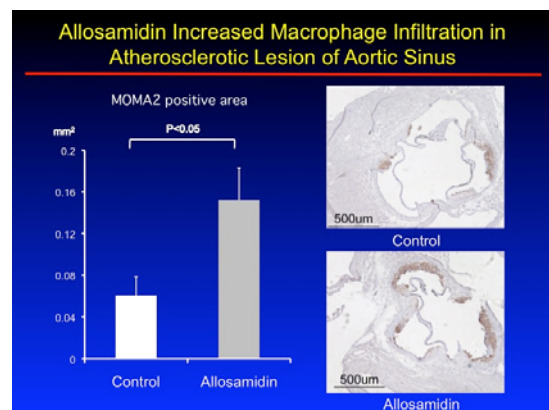
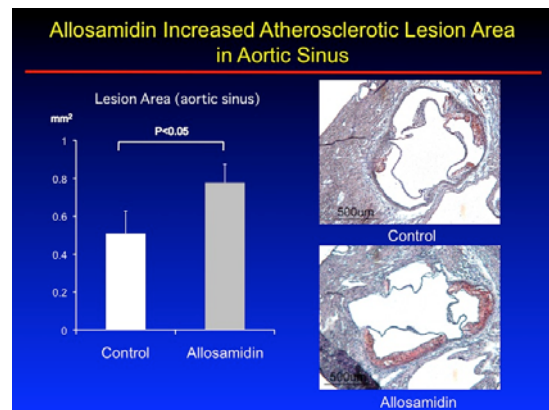
### BP, HR, and Lipid Profile of ApoE-KO Mice after Fed with 6 weeks of Western Diet

	Control	Allosamidin
n	6	6
BP, mmHg	115/67 ± 4.8/8.3	115/71 ± 5.2/9.9
HR, bpm	588 ± 47	597 ± 44
plasma total cholesterol level, mg/dl	908.6 ± 76.8	929.8 ± 114.4
plasma total triglyceride level, mg/dl	134.0 ± 34.1	140.4 ± 38.1
plasma total HDL level, mg/dl	ND	ND



また、アロサミジン投与によりキチナーゼ活性は37%抑制されていた。動脈硬化病変の解析では大動脈弓部における動脈硬化病変面積は有意に増加し、下行大動脈の動脈硬化病変面積については有意差を認めなかった(下図)。

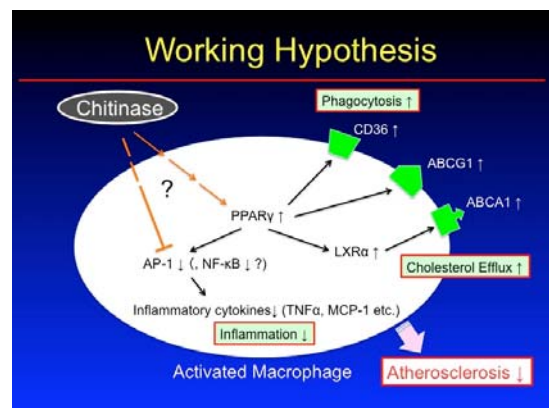
大動脈基部の動脈硬化病変およびマクロファージ (MOMA2 陽性細胞) の浸潤はアロサミジン投与群で有意に増加していた(下図)。



T細胞(CD4陽性細胞)に関しては浸潤数が少なく両群間に有意差を認めなかった。その他、平滑筋細胞、細胞増殖、エラスチン、コラーゲン含有量などについて、現在、引き続き解析中である。

#### <結論>

キチナーゼは少なくとも一部は炎症性サイトカイン発現を低下することにより抗動脈硬化的に働くことが示唆された。本研究結果によって得られた知見に基づく作業仮説を下図に示す。



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3件)

- ① Han X, Kitamoto S, Wang HW, Bosisvert WA. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *FASEB J.* 24:2869-80, 2010. (査読有)
- ② Yu W, Liu J, Shi MA, Wang J, Xiang M, Kitamoto S, Wang B, Sukhova GK, Murphy GF, Orasanu G, Grubb A, Shi GP. Cystatin C deficiency promotes epidermal dysplasia in K14-HPV16 transgenic mice. *PLoS One.* 15;5: e13973, 2010. (査読有)
- ③ Han X, Kitamoto S, Lian Q, Bosisvert WA. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J Biol Chem.* 284:32950-8, 2009. (査読有)
- ④ 北本史朗: スタチンによる動脈硬化性疾患の予防の分子メカニズム 循環制御 30(1):3-7, 2009. (査読無)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北本 史朗 (KITAMOTO SHIRO)  
九州大学・大学院医学研究院・客員助教  
研究者番号：00380436

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：