

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16059

研究課題名（和文）核酸受容体が血管の炎症と動脈硬化に与える影響の検討

研究課題名（英文）Macrophage-specific DNase II deficiency stimulates vascular inflammation and atherosclerosis

研究代表者

数藤 久美子（SUTO, Kumiko）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・徳島大学専門研究員

研究者番号：10843807

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：「マクロファージに存在するDNase IIが、障害を受けた血管構成細胞から放出される遊離核酸断片を分解し、核酸受容体を介した炎症応答を減弱することで、血管の炎症や動脈硬化病変の形成を抑制する」という新しい仮説に基づく研究である。今回の研究課題では、核酸断片やDNase IIに注目し、マクロファージ活性化や血管の炎症機序を明らかにすることを目的としている。動脈硬化病変の形成や不安定化の程度を様々な組織学的・分子生物学的手法により比較検討することで、動脈硬化病変形成におけるDNase IIの影響を検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、核酸断片を分解するDNase IIのマクロファージ活性化における影響を検討することで、動脈硬化の新規メカニズムを解明すると共に、動脈硬化の新規治療方法の開発を目的とした。動脈硬化病変の形成や不安定化の程度を様々な組織学的・分子生物学的手法により比較検討することで、動脈硬化病変形成におけるDNase IIの影響を検討を行った。核酸断片やDNase IIに注目し、マクロファージ活性化や血管の炎症機序を明らかにすることを目的としており、これらを分子標的とした動脈硬化の新規治療・予防方法の開発につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：DNase II expressed in macrophages degrades DNA fragments taken up into cells, suppressing DNA receptor-mediated inflammation. The aim of this study was to investigate the role of DNase II in macrophages in atherogenesis.

Macrophage-specific DNase II deletion accelerated Ang II-induced atherogenesis in ApoE KO mice. DNA fragments accelerated inflammation in DNase II-KO macrophages. iODN 2088, a specific antagonist of TLR9, significantly suppressed atherosclerotic lesion development in ApoE KO mice. Genetic deletion of TLR9 attenuated atherogenesis in DNase II KO ApoE KO mice. DNase II suppresses vascular inflammation and atherosclerosis by inhibiting DNA sensor response.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 核酸受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は動脈壁における慢性炎症を基盤に発症するという概念が確立している (Libby P, et al. *Circ J.* 2010;74:213-220.)。生体内外からの有害な刺激に対する応答の一つに炎症反応がある。炎症は、体内に侵入してきた異物の排除や組織損傷の修復の過程で生じる自己防衛反応と長らく考えられてきたが、近年、それだけではなく慢性炎症が生活習慣病をはじめとする様々な疾患病態の共通基盤となっていることが明らかとなってきた。しかし、慢性炎症が動脈壁にどのように惹起されるのか不明な点が多い。近年、外来性核酸断片だけでなく、内因性核酸断片によって TLR や stimulator of IFN gene (STING) などの核酸受容体が活性化され、種々の生活習慣病の発症に関与することが報告されている。実際に、研究代表者の研究室でも、動脈硬化やインスリン抵抗性などの生活習慣病と TLR9 (Fukuda D, et al. *J Am Heart Assoc.* 2019;8:e010860. Nishimoto S, et al. *Sci Adv.* 2016;2:e1501332.) や STING (Phuong Tran Pham, et al. *J Am Heart Assoc.* 2023 Nov 10;12(22):e030084) の関係を報告している。一方、細胞内には、取り込んだ核酸断片による炎症を制御するため、核酸分解酵素が存在する。DNase II は酸性環境下で遊離核酸断片の分解を促進し、細胞内に取り込まれた核酸断片を分解し、核酸受容体を介したマクロファージなどの炎症性細胞の活性化を抑制すると考えられる (Nagata S, et al. *Adv Immunol.* 2011;110:139-61.)。しかし、DNase II の血管の炎症や動脈硬化発症における役割は十分に検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では「マクロファージに存在する DNase II が、障害を受けた血管構成細胞から放出される遊離核酸断片を分解し、核酸受容体を介した炎症応答を減弱することで、血管の炎症や動脈硬化病変の形成を抑制する」という仮説を検討することで、新たな動脈硬化発症機序を明らかにし、動脈硬化の新規治療方法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) DNase II の動脈硬化病変形成における役割の検討 (in vivo)

全身性の DNase II 欠損は胎生致死となるため、Cre/loxP システムを用いて作製したマクロファージ特異的 DNase II KO (DNase II-flox/LysM-Cre) マウスとアポリポ蛋白 E 欠損 (ApoE KO) マウスを交配し、マクロファージ特異的 DNase II 欠損 ApoE KO (DNase II-KO/ApoE KO) を樹立した。対照群として、DNase II-flox マウスと ApoE KO マウスを交配して得られた (DNase II-flox/ApoE KO) を用いた。これらのマウスに、生後 7 週齢から西洋食を開始し、生後 9 週齢からアンジオテンシン II (Ang II, 1.0 µg/kg/min) を 4 週間持続皮下投与し、動脈硬化病変の形成や不安定化の程度を様々な組織学的・分子生物学的手法により比較検討することで、動脈硬化病変形成における DNase II の影響を検討した。また、実際に、DNase II の欠損により、動脈硬化病変内のマクロファージに核酸断片が蓄積するかどうかを、核酸断片を標的とした免疫電顕や共焦点顕微鏡を用いて検証した。

また、ApoE KO マウスに Ang II を投与するモデルは、大動脈瘤を発症するモデルでもあり、Daugherty らの論文 (Daugherty A, et al. *Br J Pharmacol.* 2001;134:865-870.) を参考にして DNase II が大動脈瘤の発症に与える影響も検討する。

#### (2) DNase II 欠損下における核酸受容体の役割の検討

本研究では、DNase II の欠損によりマクロファージ内に核酸断片が蓄積し、マクロファ

ージの炎症性活性化が促進し、動脈硬化が進展すると仮説している。そこで、DNase II-KO/ApoE KO マウスにおいて TLR9 を欠損したマウスを作製し、上述の<1>と同様に実験を行い、Ang II 投与下における動脈硬化の進展が抑制されるかどうかを検証する。それにより、核酸断片-DNase II-核酸受容体が血管の炎症や動脈硬化病変の形成に与える影響を検証し、DNase II だけでなく核酸受容体の動脈硬化の治療標的としての可能性を探索した。

### (3)核酸受容体を標的とした動脈硬化の治療方法の可能性の検証

DNase II-KO/ApoE KO に、核酸受容体である TLR9 の阻害薬 (iODN2088) を投与し、Ang II 誘導下における動脈硬化病変の形成が抑制されるかどうか検証し、核酸受容体を標的とした動脈硬化の治療方法の可能性を検証した。

### (4)マクロファージ活性化における DNase II の役割の検討 (in vitro)

DNase II-KO/ApoE KO マウスと DNase II-flox/ApoE KO マウスの腹腔内にチオグリコレートを注入し、腹腔内マクロファージを収集した。収集したマクロファージをミトコンドリア DNA やゲノム DNA などの核酸断片で刺激し、各種炎症性物質の発現を網羅的手法を含む分子生物学的な手法で検証することで、マクロファージ特異的 DNase II が、核酸断片によるマクロファージの活性化に与える影響を検証した。さらに、DNase II の欠損によって生じるシグナル分子の活性化の差異を検討した。

## 4. 研究成果

### (1)動脈硬化症の大動脈における DNase II および TLR9 の発現レベルが増加した

動脈硬化症の大動脈における DNase II、TLR9、および STING の発現を調べた。ApoE KO マウスと性年齢を一致させた野生型 (WT) マウスの腹部大動脈を用いた qPCR 解析の結果、ApoE KO マウスでは DNase II、TLR9、および STING の発現が有意に高いことが示された。これらの結果は、DNase II および DNA センサー、およびそれらの標的 DNA 断片が動脈硬化症の発症に役割を果たしている可能性があることを示唆している。動脈硬化発生における DNase II の役割を調査するために、マクロファージ特異的な DNase II 欠失 ApoE 欠損 (DNase II-KO/ApoE KO) マウスを作製した。この遺伝子型における DNase II の発現と酵素活性を調べた。DNase II 活性は、DNase II-flox/ApoE KO マウスよりも DNase II-KO/ApoE KO マウス由来のマクロファージで有意に低かった。腹腔マクロファージを用いた qPCR 解析の結果、DNase II-flox/ApoE KO マウスと比較して DNase II-KO/ApoE KO マウスでは DNase II の発現が有意に低いことが示された。動脈硬化プラークを用いた免疫電子顕微鏡分析により、DNase II 欠損マクロファージの細胞質における ssDNA の蓄積が実証された。これらの結果は、動脈硬化病変における DNase II 欠損マクロファージの細胞質内に未分解の DNA 断片が含まれており、これが動脈硬化症の発症に寄与している可能性があることを示唆している。

### (2) マクロファージ特異的 DNase II 欠失は血管炎症と動脈硬化発生を促進した

4 週間の Ang II 注入後の DNase II-KO/ApoE KO マウスと DNase II-flox/ApoE KO マウスの間で大動脈弓における動脈硬化病変の進行を比較した。血圧は 両方で同様に増加した。マクロファージ特異的 DNase II の欠失は総コレステロールレベルに影響を与えなかったが、中性脂肪と高密度リポタンパク質のコレステロールレベルを低下させた。SUDAN IV 染色の結果は、DNase II-flox/ApoE KO マウスと比較して、DNase II-KO/ApoE KO マウスにおける動脈硬化病変の有意な進行を示した。腹部大動脈を用いた qPCR 解析の結果、DNase II のマクロファージ特異的欠失により、マクロファージマーカーである F4/80 の

発現が増加することが示された。マクロファージ特異的 DNase II 欠失も、動脈硬化症大動脈における TNF- $\alpha$  (P<0.05) や MMP-9 (P<0.05) などの炎症性分子の発現を増加させた。これらの結果は、ApoE<sup>-/-</sup> マウスにおけるマクロファージ特異的 DNase II の欠失が血管の炎症と動脈硬化発生を促進することを示した。

### **(3)TLR9 の薬理的遮断は、DNase II-KO/ApoE KO マウスにおける動脈硬化発生と血管炎症を軽減した**

これまでの研究では、TLR9 が細菌 DNA などの PAMP だけでなく mtDNA などの DAMP も認識し、自然免疫を活性化することが報告されている。研究代表者の以前の研究で実証されたように、TLR9 の遺伝子欠失は、ApoE KO マウスの血管炎症と動脈硬化発生を軽減した。血管炎症および動脈硬化症の発症における DNase II および TLR9 の役割をさらに調査するために、TLR9 の薬理的阻害が DNase II-KO/ApoE KO マウスにおける血管炎症および動脈硬化発生を軽減するかどうかを調べた。DNase II-KO/ApoE KO マウスでは、TLR9 の阻害性オリゴヌクレオチドである iODN2088 を 4 週間投与すると、血圧は上昇したが、総コレステロール、中性脂肪、および HDL コレステロールには影響しなかった。大動脈弓の SUDAN IV 染色は、iODN2088 が DNase II-KO/ApoE KO マウスにおける動脈硬化性病変の形成を軽減することを示した。腹部大動脈を用いた qPCR 分析により、iODN2088 投与による TLR9 の薬理的遮断により、マクロファージマーカーである F4/80 の発現が有意に減少することが明らかになった。iODN2088 はまた、動脈硬化症の大動脈における炎症分子の発現を減少させた。これらの結果は、TLR9 の薬理的遮断が DNase II-KO/ApoE KO マウスにおける動脈硬化発生と血管炎症を軽減することを示した。

### **(4) TLR9 の遺伝子欠失は、DNase II-KO/ApoE KO マウスにおける動脈硬化発生と血管炎症を軽減した**

マクロファージ特異的 DNase II 欠損下での TLR9 の動脈硬化発生に対する影響をさらに調べるために、4 週間の Ang II 注入後の DNase II-KO/ApoE KO マウスと DNase II-KO/ApoE KO/TLR9 KO マウスの間で大動脈弓における動脈硬化病変の進行も比較した。血圧は両方の遺伝子型で同様に増加した。マクロファージ特異的 DNase II 欠失マウスにおける TLR9 欠損は、総コレステロールおよび中性脂肪レベルに影響を与えなかったが、HDL-C レベルは増加した。大動脈弓の SUDAN IV 染色は、TLR9 欠失が DNase II-KO/ApoE KO マウスにおける Ang II 誘発性動脈硬化性病変を有意に軽減することを示した。腹部大動脈を用いた qPCR 分析により、TLR9 の遺伝子欠失により、動脈硬化症大動脈における F4/80 および MIP-1 $\alpha$  などのいくつかの炎症性分子の発現が減弱することが明らかになった。TLR9 の薬理的遮断の結果と一致して、これらの結果は、TLR9 の遺伝子欠失が DNase II-KO/ApoE KO マウスにおける動脈硬化発生と血管炎症を軽減したことを示唆している。

### **(5)mtDNA – TLR9 経路は DNase II 欠失マクロファージの炎症促進性活性化を促進した**

DNase II のマクロファージ特異的欠失が血管炎症と動脈硬化性病変の発症を促進するメカニズムを調べるために、腹膜マクロファージを使用した *in vitro* 実験を実施した。私たちは、TLR9 などの DNA センサーの主要なリガンドの 1 つである mtDNA で腹膜マクロファージを処理した。qPCR 分析では、炎症性分子 (MCP-1、ICAM-1、VCAN-1、IFN- $\beta$ ) の発現が、DNase II-KO/ApoE KO マクロファージと比較して有意に高いことを実証した。ウエスタンブロッティングの結果は、DNase II の欠損により I $\kappa$ B $\alpha$  の分解が増加することを実証し、マクロファージにおける NF- $\kappa$ B の活性化を示唆した。これらの結果は、DNase

II の欠失が mtDNA の存在下でマクロファージの炎症促進性活性化を促進することを示唆した。研究代表者はさらに、TLR9 のアゴニストオリゴヌクレオチドである CpG-ODN 1826 が、DNase II 欠損マクロファージにおける炎症性分子の発現に及ぼす影響を *in vitro* で調べた。腹腔マクロファージを用いた qPCR 分析により、CpG-ODN 1826 は、DNase II-KO/ApoE KO マウスに比べて、DNase II 欠損マクロファージにおける ICAM-1 や MIP-1 $\alpha$  などの炎症性分子の発現を相対的に促進することが明らかになった。腹腔マクロファージを用いた qPCR 分析の結果は、MCP-1、VCAM-1、TNF- $\alpha$ 、INF- $\beta$  などの炎症性分子の mtDNA 誘導性過剰発現が、TLR9 アンタゴニストである iODN2088 の存在により相対的に減弱されることを実証した。これらの結果は、DNase II が mtDNA 誘導性の TLR9 を介したマクロファージの炎症反応に少なくとも部分的に関与していることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 数藤久美子、佐田 政隆、福田 大受
2. 発表標題 マクロファージ特異的DNase II欠損が動脈硬化に与える影響
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 数藤久美子、福田 大受、伊勢 孝之、楠瀬 賢也、山口 浩司、八木 秀介、山田 博胤、添木 武、若槻 哲三、佐田 政隆
2. 発表標題 マクロファージ特異的DNaseII欠損が動脈硬化に与える影響
3. 学会等名 第119回日本循環器学会四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 数藤 久美子、福田 大受、佐田 政隆
2. 発表標題 マクロファージのDNA分解機構が動脈硬化に与える影響
3. 学会等名 第116・118回日本循環器学会 中国・四国合同地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suto K, Fukuda D, Sata M
2. 発表標題 Macrophage-specific DNase II deletion promotes pro-inflammatory activation of macrophages and atherogenesis
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suto K, Fukuda D, Sata M
2. 発表標題 Macrophage-specific DNaseII deficiency stimulates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (ISA2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kumiko Suto, Tomoya Hara, Sachiko Nishimoto, Shuri Kaneyama, Masataka Sata, Daiju Fukuda
2. 発表標題 Macrophage-specific Dnase II Deficiency Stimulates Atherosclerosis In Apolipoprotein E-deficient Mice
3. 学会等名 AHA2021 American heart association (国際学会)
4. 発表年 2021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