

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790707

研究課題名（和文） マクロファージの分化/機能におけるアンジオテンシンII 1型受容体の役割

研究課題名（英文） Role of angiotensin II type 1 receptor in macrophage polarization and function

研究代表者：鈴木 純（SUZUKI JUN）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40452693

研究成果の概要（和文）：AT<sub>1a</sub>受容体刺激はマクロファージの極性を炎症性（M1）に誘導することや、マクロファージの食食能を活性化して容易に泡沫化を起こしうる可能性が示唆された。さらに、AT<sub>1a</sub>受容体刺激はスカベンジャー受容体であるCD36の発現を亢進させ、FAKの活性化を介してマクロファージの遊走能を減弱し、動脈硬化巣内に留まらせることによって更なる持続炎症・組織破壊をもたらし、動脈硬化性プラークの脆弱化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Stimulation of the angiotensin II type 1 receptor induces macrophage polarization to inflammatory M1 state and activates macrophage phagocytic function. Angiotensin II type 1 receptor also plays an important role in oxidized LDL-induced macrophage trapping in the atherosclerotic lesions via enhancing CD36 expression and focal adhesion kinase activation. Our results suggest that stimulation of the angiotensin II type 1 receptor modulates macrophage polarity and functions, resulting in atherosclerotic plaque instability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：マクロファージ、動脈硬化、プラーク破綻、アンジオテンシンII、受容体

## 1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患は欧米諸国における死因の第1位であり、我が国では死因の第3位である心疾患の約半数を占めている。心筋梗塞に対する急性期治療法が進歩し、我が国における冠動脈疾患の死亡率は減少傾向に

あるが、生活習慣の欧米化に伴って罹患率自体は増加しているのが現状である。冠動脈疾患の原因である動脈硬化を抑制することは、循環器分野における最重要テーマの1つであり、動脈硬化のメカニズム解明や予防・治療に関する基礎・臨床研究が世界

各国で精力的に進められている。

近年、「動脈硬化=炎症」の概念が定着し、動脈硬化の発症や進展における炎症性細胞の関与が注目されている。動脈硬化巣に遊走してきた単球はマクロファージに分化・泡沫化し、炎症性サイトカインやケモカインの産生を介して炎症反応を増幅させるとともに、matrix metalloproteinase (MMP) などのプロテアーゼを産生して組織障害を引き起こす。よって、マクロファージは動脈硬化プラークの不安定化や破綻に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、プラークの破綻を予測して捉えることは時間的にも空間的にも困難であることから、プラークの破綻を対象とした研究は十分になされていないのが現状であり、そのメカニズムについての詳細は明らかになっていない。これまでに、申請者をはじめ国内外の研究者らは、レニン-アンジオテンシン (RA) 系が炎症や酸化ストレスを介して動脈硬化を促進させることを明らかにしてきたが、プラーク破綻・マクロファージの分化や機能における RA 系の役割についての報告は少なく、不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

これまで申請者らは、動脈硬化の進展に RA 系が深く関与していることを報告してきた。また最近の研究では、Apolipoprotein E (ApoE) KO マウスの総頸動脈結紮・ポリエチレンカフ留置後に認められるプラーク破綻が、Angiotensin II type 1a (AT<sub>1a</sub>)受容体遺伝子欠損によって有意に抑制され、プラーク内のマクロファージ浸潤、脂肪沈着、酸化ストレス、MMP 活性も著明に減少していることを確認した。これらの結果は、RA 系が酸化ストレスや炎症を介して動脈硬化の発症や進展に重要な役割を果たしており、特に AT<sub>1a</sub> 受容体刺激は動脈硬化促進、プラークの不安定化や破綻に大きく関与している可能性を示唆している。マクロファージを介した炎症反応や組織傷害は、プラークの不安定化や破綻の中心的な役割を果たしていると推測されている。申請者は、AT<sub>1a</sub> 受容体遺伝子欠損による動脈硬化巣のマクロファージ浸潤・脂肪沈着の減少とプラーク破綻の有意な抑制を確認した研究成果を踏まえ、AT<sub>1a</sub> 受容体がマクロファージの分化や機能制御

にも深く関与している可能性が高いと考えるに至った。そこで本研究では、プラーク破綻との関連性に着目し、これまで明らかにされていなかったマクロファージの分化・機能における AT<sub>1a</sub> 受容体の役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) プラーク破綻モデルマウスの作製

生後 9 週齢の ApoE KO マウス、ApoE/AT<sub>1a</sub> KO マウスに麻酔を行った後、総頸動脈の分岐部直下を結紮した。4 週後に麻酔を行った後、結紮した総頸動脈の近位部に内径 0.58 mm、長さ 2 mm のポリエチレンカフを留置した。

### (2) マウス腹腔常在マクロファージの採取、培養

生後 9 週齢の ApoE KO マウス、ApoE/AT<sub>1a</sub> KO マウスの腹腔に PBS を注入・マッサージ後に PBS を回収することで、マウス 1 匹から約  $5 \times 10^5$  個の腹腔常在マクロファージが採取できる。採取したマクロファージは 10% 胎児ウシ血清含有 RPMI1640 培地で培養した。マクロファージを効率良く採取する目的で、しばしばチオグリコレート培地の腹腔内投与が行われているが、この方法では活性化マクロファージが誘導されてしまうことが知られている。本研究はマクロファージの機能的な検討を目的としているため、チオグリコレート培地は使用せず、常在マクロファージの採取、培養を行った。

### (3) マクロファージの分化/表現型に関する検討

マクロファージには、M1 (炎症性) マクロファージと M2 (抗炎症性) マクロファージの 2 種類の分化・表現型があることが知られおり、動脈硬化との関連性が注目されている。そこで、LPS 刺激が ApoE KO、ApoE/AT<sub>1a</sub> KO マウス腹腔常在マクロファージの M1/M2 極性に与える影響を検討した。マクロファージの M1/M2 極性化は、サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、IL-12) 産生、表面受容体発現 (CCR7、CD163)、誘導型一酸化窒素合成酵素の蛋白発現を Real-Time PCR で解析した。

(4) マクロファージ機能 (食食、遊走) に関する検討

ApoE KO マウスおよび ApoE/AT<sub>1a</sub> KO マウス腹腔常在マクロファージにおいて、以下の項目をそれぞれ比較検討することで、マクロファージ機能における AT<sub>1a</sub> 受容体の役割を明らかにする。

4-1. IgG オプソニン化した赤血球の食食能を定量評価する。

4-2. Boyden Chamber 法を用いて遊走能を測定する。

#### 4. 研究成果

(1) マクロファージの分化/表現型に関する検討

ApoE KO マウス、ApoE/AT<sub>1a</sub> KO、ApoE/AT<sub>2</sub> KO マウス腹腔常在マクロファージに LPS 刺激 (1 μg/ml、6 時間) を行ったところ、M2 マクロファージのマーカである IL10 mRNA 発現が ApoE KO や ApoE/AT<sub>2</sub> KO マクロファージに比し ApoE/AT<sub>1a</sub> KO マクロファージで有意に亢進していた。また、有意差は認めなかったが、ApoE/AT<sub>2</sub> KO マクロファージでは IL10 mRNA 発現が ApoE KO マクロファージに比し減少している傾向にあった (図 1)。さらに、動脈硬化性プラーク破綻モデルマウスの病変内において、M1 マクロファージマーカである炎症性サイトカイン TNF-α、IL6 の蛋白発現は ApoE KO マウスに比し ApoE/AT<sub>1a</sub> KO で有意に減少していた (図 2)。

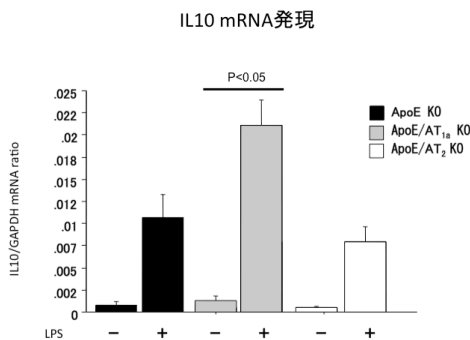


図1

(2) マクロファージ機能 (食食、遊走) に関する検討

IgG オプソニン化した赤血球の食食能を検討した結果、ApoE KO マウスに比し ApoE/AT<sub>1a</sub> KO で赤血球の食食能が有意に

低下していた (図 3)。

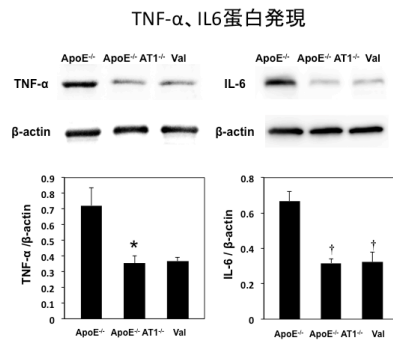


図2

#### マクロファージ食食能

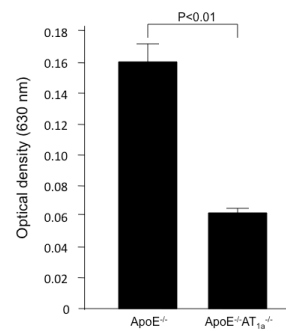


図3

酸化 LDL 刺激によってマクロファージの遊走能が低下し、動脈硬化組織内にマクロファージが trapping されることで持続炎症や組織破壊が惹起され、動脈硬化の進展やプラークの脆弱化を来すことが推測されている。本研究では、酸化 LDL によるマクロファージの遊走能に及ぼす AT<sub>1a</sub> 受容体の役割についても検討した。MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) 刺激による遊走能は ApoE KO、ApoE/AT<sub>1a</sub> KO マクロファージで差を認めなかったが、酸化 LDL 刺激によって ApoE KO マクロファージの遊走能は著しく低下したのに対し、ApoE/AT<sub>1a</sub> KO マクロファージでは酸化 LDL 刺激による遊走能の低下が回避されていた (図 4)。酸化 LDL 刺激によってマクロファージの遊走能が低下するメカニズムとして、酸化 LDL がスカベンジャー受容体である CD36 を刺激することで FAK (focal adhesion kinase) の活性化を引き起こすことが報告されている。そこで、CD36 の蛋白発現および FAK のリン酸化を検討したところ、ApoE/AT<sub>1a</sub> KO マクロファージでは ApoE KO マクロファージに

## マクロファージ遊走能

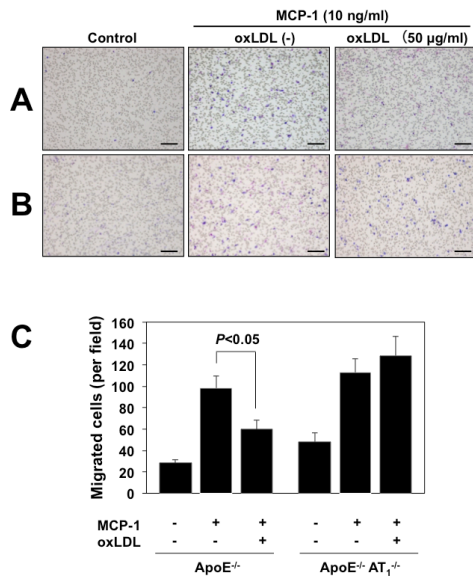


図4

比し酸化 LDL 刺激による CD36 の蛋白発現が減弱しており (図 5)、FAK のリン酸化も抑制されていることが判明した (図 6)。

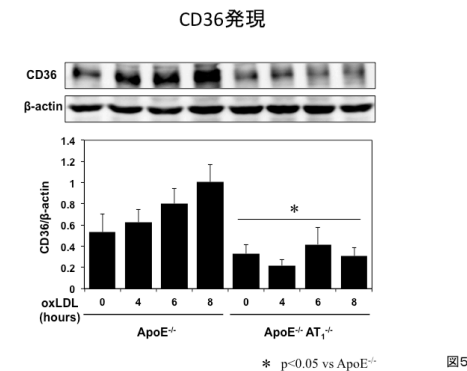


図5

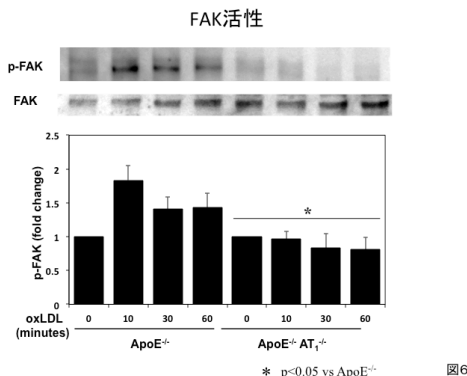


図6

以上の結果より、AT<sub>1a</sub> 受容体刺激はマクロファージの極性を炎症性 (M1) に誘導させ、持続的な炎症をもたらすことで動脈硬化性プラークの脆弱化にはたらくことが示唆された。また、AT<sub>1a</sub> 受容体刺激はマク

ロファージの貪食能を活性化し、容易に泡沫化を起こしうる可能性が示唆された。さらに、AT<sub>1a</sub> 受容体刺激はスカベンジャー受容体である CD36 の発現を亢進させ、FAK の活性化を介してマクロファージの遊走能を減弱し、動脈硬化巣内に留まらせることによって更なる持続炎症・組織破壊をもたらし、動脈硬化性プラークの脆弱化に寄与している可能性が示唆された。

## 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 2 件)

- ① Aono J, Suzuki J, Iwai M, Horiuchi M, Nagai T, Nishimura K, Inoue K, Ogimoto A, Okayama H, Higaki J. Deletion of the Angiotensin II Type 1a Receptor Prevents Atherosclerotic Plaque Rupture. *Arterioscle Thromb Vasc Biol*. 査読有, 2012, in press
- ② 青野潤、鈴木純、大木元明義、檜垣實男、動脈硬化の進展とレニン・アンジオテンシン系、愛媛医学、査読無、30 巻、2011、86-90

[学会発表] (計 2 件)

- ① 鈴木純、青野潤、大木元明義、岩井将、堀内正嗣、檜垣實男、動脈硬化性粥腫破綻におけるアンジオテンシン II 1 型受容体の役割 ~動脈硬化性粥腫破綻マウスモデルを用いた検討、第 34 回日本高血圧学会総会、高血圧関連疾患モデル学会 合同シンポジウム、2011 年 10 月 22 日、宇都宮
- ② Aono J, Suzuki J, Ogimoto A, Okayama H, Iwai M, Horiuchi M, Higaki J. Deletion of the Angiotensin II Type 1a Receptor Prevents Atherosclerotic Plaque Rupture in Apolipoprotein E<sup>-/-</sup> Mice. American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010 年 11 月 17 日、シカゴ、アメリカ合衆国

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 純 (SUZUKI JUN)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40452693