

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390233

研究課題名(和文)新規HDL結合蛋白プログランユリンは全身性炎症・糖代謝異常・動脈硬化を抑制する

研究課題名(英文) Progranulin, a Novel HDL-Binding Protein, Suppresses Systemic Inflammation, Glucose Abnormality and Atherosclerosis

研究代表者

山下 静也 (Yamashita, Shizuya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：60243242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに細胞分化、創傷治癒、炎症との関連が報告されていたプログランユリン(PGRN)であるが、動脈硬化との関連についての直接的な報告はされていなかった。そこで我々は動脈硬化モデルマウスであるアポEノックアウトマウスとPGRNのダブルノックアウト(DKO)マウスを作成したところ、コントロールマウスと比較して動脈硬化が促進していることを見出した。他にもPGRNは様々な炎症性疾患との関連が示唆されており、動脈硬化性疾患も含め新たな治療ターゲットになりうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：While progranulin (PGRN) has been reported to be involved with cell proliferation, wound healing and inflammation, there were no direct information on the association of progranulin with atherosclerosis. Therefore, we crossed apoE-knockout(KO) mice with PGRN-KO mice to generate double-KO (DKO) mice. DKO mice exhibit more severe atherosclerosis compared with apoE-KO mice. Considering PGRN is associated with various inflammatory diseases, PGRN can be a novel therapeutic target for atherosclerotic and inflammatory diseases.

研究分野：動脈硬化、脂質代謝

キーワード：プログランユリン マクロファージ 炎症

1. 研究開始当初の背景

プログランニリン(PGRN)は細胞分化、創傷治癒、炎症などに関与する蛋白として知られ、その変異により前頭側頭変性症 (FTD)を引き起こすことが報告されており、脳神経分野では非常に注目されていた蛋白であった。一方、我々はヒト単球由来マクロファージから分泌されるPGRNがHDLの主要構成アポ蛋白であるアポA1と結合し、炎症惹起性のグラニユリン(GRN)への分解を阻害することを報告した(J Atheroscler Thromb. 2010 ;17: 568-577)。炎症との関連性については、PGRN-KO マウスから採取したマクロファージは、LPS 負荷で対照マウス由来マクロファージと比較してIL-6、TNF- α や MCP-1 などの炎症性サイトカイン、ケモカインの発現、分泌が有意に多い (J Exp Med. 2010; 207:117-128)など PGRN が抗炎症性に働くことを示す多くの報告がある一方で、2型糖尿病患者の血中PGRN濃度は耐糖能異常がない人と比べると高値であり、さらに血中PGRN濃度は血中 CRP 濃度と正相関すること (Diabetes. 2009; 58: 627-636)、などからPGRNが炎症惹起性の蛋白であるとの報告もあり、炎症に対するPGRNの作用について一定の見解はなかった。さらにPGRNの動脈硬化や各種動脈硬化性疾患や炎症疾患との関連性についてはほとんど報告がなかった。

2. 研究の目的

PGRN が動脈硬化に対してどのような影響を与えるのかを検討する。PGRNの機能発現メカニズムについては、PGRNがTNF- 受容体に結合して、その後の signalling を阻害するためであるとする報告がなされたが (Science. 2011; 332: 478-484)、TNF- 受容体には結合しないとする報告も出てきて (Neurosci; 2013; 33: 9202-9213)、コンセンサスは得られていないのが現状であり、そのメカニズムはどのようなものかを検討する。また、急性冠症候群などの動脈硬化性疾患や慢性関節リウマチなどの炎症性疾患における PGRN の役割についての検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1. まず、ヒト大動脈プラークにおける PGRN の発現を見るため、免疫染色を行った。次に動脈硬化モデルマウスであるアポE ノックアウト (ApoE-KO) マウスと PGRN-KO マウスを交配させ、ダブルノックアウト (Double-KO, DKO) マウスを作成し、12週間高脂肪食負荷をかけて、動脈硬化の程度を ApoE-KO マウスと比較検討した。またそのメカニズムについて脂質代謝や炎症の側面から解析した。

2. 熊本大学で臨床的に FTD と診断された患者で血中 PGRN 濃度が低値な場合は PGRN 変異が疑われるため PGRN 遺伝子変異の検索を行い、変異を認めた場合は、その患者の脂質代謝異常、糖代謝異常、動脈硬化性変化がないか検討することとした。

3. 急性冠症候群 (ACS) 患者における PGRN の血中濃度の動向を見るために ACS で緊急経皮的冠動脈形成術 (PCI) を施行された連続 51 症例で、来院時、退院時、外来受診時の静脈血、PCI 施行時の血栓吸引血、動脈血ならびに CK フォロー時採血時の静脈血で PGRN 濃度を ELISA を用いて測定した。

4. 整形外科との共同研究で慢性関節リウマチ患者における PGRN 濃度測定を行った。

4. 研究成果

1. PGRN の動脈硬化に与える影響とそのメカニズムの検討

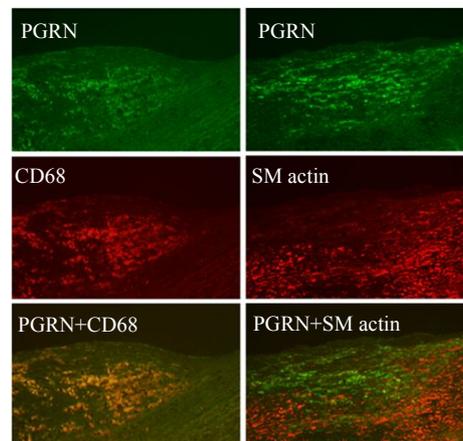
初めに、ヒト大動脈プラークに PGRN がどの程度発現しているのかを見るために PGRN の免疫染色を行った。

(図 1)



図 1 のように動脈硬化プラークの特にショルダー部位に PGRN が強発現しており、図 1 右図で分かる通り、主として泡沫化したマクロファージに一致して発現が見られた。実際にマクロファージのマーカーである CD68 と PGRN の共染色を行うと、平滑筋細胞のマーカーである SM actin と PGRN の共染色と比較して多くの部位で共染色しており、プラークではマクロファージで強い発現を認めることが確認された (図 2)。

図 2



次に DKO マウスと ApoE-KO マウスに 12 週間の高脂肪食負荷で大動脈の動脈硬化の程度を Oil Red O 法で検討した。

(図 3)

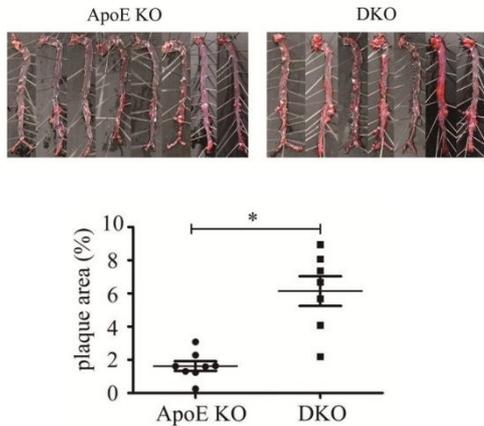
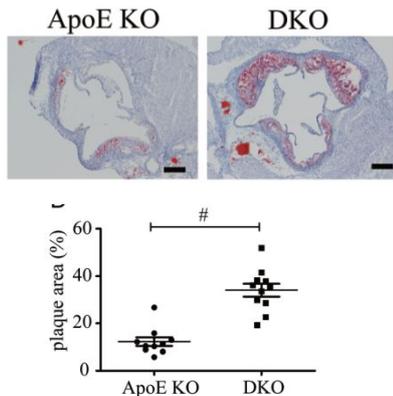


図 3 のように DKO マウスの動脈硬化は ApoE-KO マウスと比較して有意に促進していることを見出した。同様に大動脈の基部での Oil Red O 染色を行ったが、こちらの検討においても DKO マウスの方が有意に動脈硬化が進展していることが確認できた (図 4)。

両者における血中脂質解析を行うと、血中 HDL-C 濃度に有意な差は認めなかったが、総コレステロールレベルはむしろ ApoE-KO マウスの方が高いことが分かった。従って DKO マウスは炎症など他の要因で動脈硬化が進展していることが示唆された。

(図 4)



そこで、次に肝臓、大動脈での様々なサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現レベルを qPCR で検討した。肝臓では TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 が、大動脈では TNF- α 、ICAM-1、VCAM-1 が DKO マウスで有意に発現の亢進を認めた。

次に HUVEC を用いて TNF- α を添加して発現誘導をさせた接着因子である ICAM-1、VCAM-1 が PGRN の添加により、その発現が抑制されるか *in vitro* の検討を行ったが、ほぼ PGRN の濃度依存性に発現を抑制させた。また、DKO マウスの大動脈では eNOS のリン酸化も抑制されていることも見出した。

次に骨髓由来マクロファージを用いて酸化 LDL の取り込みを調べたところ、2 倍以上 DKO 由来マクロファージでは取り込みを認め

た。これについては酸化 LDL の取り込みに関与する CD36 や SRA の発現亢進を DKO マウス由来腹腔マクロファージで認めたため、取り込み亢進の一因になっているものと考えられた。

最後に DKO マウスのように炎症が亢進していると、HDL 粒子の構成蛋白が変化して、dysfunctional HDL になることが近年示唆されているため、HDL 構成蛋白について代表的な蛋白について検討した。

(図 5)

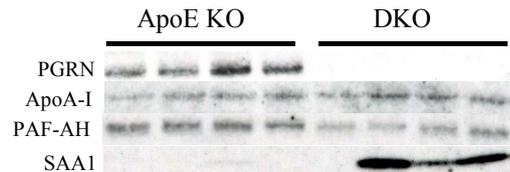


図 5 の通り、HDL 粒子の主要構成蛋白である ApoA1 については両群間で有意差は認めなかったが、抗酸化蛋白である PAF-AH は DKO マウスで有意に低下しており、一方炎症時に HDL 構成蛋白として増加すると言われている SAA1 は DKO マウスで全例ではないものの増加していた。この構成蛋白の変化に伴う HDL の抗動脈硬化作用についても検討を行ったところ、いわゆるコレステロール引き抜き能については有意差は認めなかったが、抗酸化能は DKO マウスで有意に低下していた。

また、PGRN の炎症抑制の機序として TNF- α の TNF 受容体への結合を競合阻害するという報告がされているが、我々の TNF-1,2KO マウス由来マクロファージを用いて PGRN を添加したところ、akt のリン酸化が亢進したことから PGRN 以外の受容体の存在が示唆された。

2. PGRN 変異を伴う FTD 患者における糖代謝異常、脂質代謝異常、動脈硬化の程度の検討

熊本大学で FTD と臨床的に診断された患者で血中 PGRN 濃度を測定して低値で PGRN 変異が疑われる例については遺伝子変異検索を行い、変異が確認されれば、標題の事項についての検討を行う予定であったが、残念ながら濃度低値例がなく検討を行うことができなかった。最近、アルツハイマー病においても PGRN 変異例が指摘されてきており、現在絶対数が多いアルツハイマー病にも範囲を広げて検索中である。

3. ACS 患者における血中 PGRN 濃度の動向とその役割の検討

吸引血栓でマクロファージが含まれるサンプルについては蛍光免疫染色すると、マクロファージと共に PGRN が共染色されることが認められ、PGRN が ACS 発症時のマクロファージに発現しており、発症に何らかの役割を果たしていることが示唆された。また、責任病

変近くの吸引血の PGRN 濃度は末梢静脈血や動脈血における PGRN 濃度と比較して低値であった。このことは、ACS の責任病変近くではプロテアーゼなどの発現、活性上昇などで PGRN が分断されている可能性が考えられた。このことについては in vitro の系で PGRN が ACS 発症に関与するとされている MMP-9 により濃度依存性に分解されることを確認している。これらから、ACS 発症時、PGRN が様々なプロテアーゼにより分化され、プラークの不安定性を引き起こしている可能性が考えられた。また、血中 PGRN 濃度は来院後 12 時間までは低値が続いたが、その後、上昇し、48 時間後では 30% 程度の上昇を認めた。このことは ACS 発症後、時間と共に局所や全身の炎症が軽減し、PGRN が分解されなくなったことによるものと考えられた。

4. 慢性関節リウマチにおける PGRN 濃度の検討

PGRN-KO マウスは、コラーゲン誘導性関節炎を誘導するとコントロールマウスと比較して関節炎の程度が有意に強く、PGRN を投与すると、関節炎がほぼ消失するという報告がされている。整形外科で慢性関節リウマチにおける PGRN 濃度を健常群と比較したところ有意に患者群で高値を示した。

5. 主な発表論文

(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 1 件)

Kawase R, Ohama T, Matsuyama A, Yamashita S (他 14 名) 2013, Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice. Cardiovasc Res.; 100:125-133 (査読有)

[学会発表](計 10 件)

1. R Kawase Progranulin Plays a Crucial Role in the development of Atherosclerosis 第 78 回日本循環器学会 2014.3.22 東京国際フォーラム

2. 川瀬良太、抗炎症性蛋白 Progranulin (PGRN) の急性冠症候群発症における役割 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2014.7.11 京王プラザホテル

3. R Kawase, A Role of Progranulin in Acute Coronary Syndrome AHA2014 2014.11.18 San Francisco

4. R Kawase Deficiency of Progranulin Aggravates Atherosclerosis Possibly due to Enhanced Inflammation 第 77 回日本循環器学会 2013.3.15 パシフィコ横浜

5. T Ohama Deletion of Progranulin Exacerbates Atherosclerosis by Changing HDL-associated Antiatherogenic Proteins and Altering Cholesterol Homeostasis 第 77 回日本循環器学会 2013.3.15 パシフィコ横浜

6. R Kawase Deficiency of Progranulin Aggravates Atherosclerosis Partly Due to Enhanced Inflammation and Impairment of Endothelial Function 第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2013.7.19 京王プラザホテル

7. T Ohama Deletion of Progranulin Exacerbates Atherosclerosis by Changing HDL-associated Proteins and Altering Cholesterol Homeostasis 第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2013.7.19 京王プラザホテル

8. R Kawase A Novel HDL-associated Protein, Progranulin, Is Involved in Lipid Metabolism and Macrophage Recruitment into Adipose Tissues XVI International Symposium on Atherosclerosis (ISA2012) 2012 年 3 月 27 日 Sydney

9. T Ohama Deletion of Progranulin Results in Various Metabolic Dysfunctions 第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2012 年 7 月 19 日 ヒルトン福岡

10. R Kawase Deficiency of Progranulin Exacerbates Atherosclerosis in ApoE Knockout Mice 第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2012 年 7 月 19 日 ヒルトン福岡

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下静也 (YAMASHITA, Shizuya)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
教授

研究者番号：60243242

(2)研究分担者

増田大作 (MASUDA, Daisaku)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：20568753

(3)連携研究者

()

研究者番号：