

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790930

研究課題名(和文)マクロファージ特異的AMPK活性調節を介した動脈硬化発症抑制の試みと分子機序解明

研究課題名(英文)AMP-activated protein kinase in macrophage; its potential as a therapeutic target for atherosclerosis

研究代表者

石井 規夫(Ishii, Norio)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10599111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：AMPK活性化による大血管合併症進展抑制機序として、動脈硬化症進展への関与が示唆されているマクロファージ(M ϕ)増殖への影響についてAMPK活性化剤であるAICARを用いて検討した。Apo E欠損マウスのAICAR投与群では、有意に動脈硬化巣が縮小していた。AICAR投与群の動脈硬化巣では増殖細胞(PCNA陽性細胞)が有意に少なく、増殖細胞中のM ϕ の割合も少なかった。AICARによるM ϕ 増殖抑制の機序としてRbのリン酸化抑制、p53のリン酸化、p21cipおよびp27kipの蛋白発現誘導が関与する可能性が示された。薬剤によるAMPK活性化が動脈硬化症の治療標的となり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) could suppress macrophage proliferation, using AICAR, which is a pharmacological AMPK activator. AMPK activation suppressed Ox-LDL-induced macrophage proliferation by suppressing GM-CSF expression and inducing cell cycle arrest. Moreover, treatment with AICAR suppressed atherosclerotic lesion formation, and decreased the number of PCNA-positive macrophages in apolipoprotein E-deficient mice. In conclusion, we found that AICAR-mediated AMPK activation suppressed Ox-LDL-induced macrophage proliferation by suppressing GM-CSF expression and inducing cell cycle arrest, and suppressed the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Because the proliferation of vascular cells including macrophages is a key event in the development and progression of atherosclerosis, these effects of AMPK activation may represent therapeutic targets for atherosclerosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：マクロファージ AMPK 動脈硬化 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化症は、心筋梗塞・脳梗塞を代表とする致死性の動脈硬化性疾患の主要な原因疾患である。現在わが国を含む先進諸国では食生活の充実や利便性の高い生活スタイルへの変化により、脂質異常症や糖尿病、高血圧といった生活習慣病が急増し、それに伴い動脈硬化性疾患患者数も急増している。現在のところ、動脈硬化症発症・進展メカニズムは血管内皮障害を起点とした血管の炎症反応として理解されている (*N Engl J Med.* 340:115, 1999.)。血管内皮障害にตอบสนองした血中の単球は、血管内皮下に遊走・浸潤しマクロファージ(M₁)へ分化するとともに生理活性物質を分泌する。また、低比重リポ蛋白(LDL)は血管内皮下では酸化修飾を受け酸化 LDL (Ox-LDL)へと変性して存在する。動脈硬化症の発症・進展には、この炎症性反応にตอบสนองに加え血管内皮下における Ox-LDL による M₁ 増殖の関与が重要視されている。

これまでに申請者らは Ox-LDL による M₁ 増殖の分子機序 (特に Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) と Protein kinase C の関与) と抗動脈硬化作用 (*J Biol Chem.* 275:5810, 2000. *J Biol Chem.* 284:34561, 2009.) や PPAR α 活性化作用を介した M₁ の機能制御による抗動脈硬化作用の機序 (*J Biol Chem.* 280:6627, 2005, *Circ Res.* 100:1442, 2007, *Arterioscler Thromb Vasc Bio.* 30:1598, 2010) を明らかにし M₁ の機能が多岐にわたって動脈硬化の病態に関与していることを報告している。

AMP-activated protein kinase (AMPK) は、ATP の欠乏を感知し活性化され、消費された ATP を補填するよう作用するエネルギーセンサー酵素であるが、血管構成細胞における役割の解明は未だに不十分である。申請者らの所属する教室では、これまでに血管内皮細胞において AMPK 活性化がミトコンドリア reactive oxygen species (ROS) 産生を抑制していること (*Diabetes* 55:120, 2006)、血管平滑筋細胞において AMPK 活性化が細胞増殖抑制作用を示すこと (*Circ Res.* 97:837, 2005) を報告している。

最近、幼若な M₁ がサイトカイン環境によって炎症を惹起する機能を持つ古典的活性化 M₁ (M1) と炎症を抑制する機能を持つ代替活性化 M₂ (M2) という異なる表現型に分化し、それぞれ特徴的な活性を持つことが注目されている。動脈硬化病変には M1, M2 両表現型の M₁ が存在し M2 表現型の M₁ の割合を増加させることが動脈硬化抑制的に作用する可能性が報告されている (*Cell Metab.* 6:137, 2007)。また、AMPK が M₁ 表現型の調節の中心的な役割を果たしている可能性を示唆する報告がなされている (*J Immunol.* 181:8633, 2008)。

2. 研究の目的

以上の学術的背景から M₁ 表現型の変化は生理活性物質の産生による周囲への影響ばかりでなく M₁ 増殖や M₁ の組織浸潤を介し病態に関与している可能性があり、動脈硬化症の発症・進展の病態にも M₁ 表現型の変化に伴う M₁ 増殖と動脈硬化巣への M₁ 組織浸潤が関与することが考えられる。さらに、M₁ における AMPK 活性化が M₁ 増殖と M₁ 組織浸潤のいずれにも抑制的に作用し、動脈硬化症の発症を抑制する可能性が考えられる。これまでに申請者は AMPK 活性化が M₁ の細胞周期の進行を阻止することで M₁ 増殖を抑制することを報告している (*J Biol Chem.* 284:34561, 2009)。

本研究では動脈硬化巣における M₁ 表現型の変化と M₁ 増殖および M₁ 組織浸潤との関連を証明し、AMPK 活性化による M₁ 表現型制御が M₁ 増殖および M₁ の組織浸潤を抑制し動脈硬化症の治療標的になりうるという仮説を証明することを目的とする。

3. 研究の方法

実験

～ AMPK 活性制御による M₁ 増殖能との関連 (*in vitro*) ～

M₁ 増殖が AMPK により制御されていることを証明する目的で以下の検討を行った。

<実験 - a> 各増殖誘導刺激による M₁ 増殖を解析した。

細胞は DDY マウスから採取したマウス腹腔 M₁ を用いた。

これまでに確立した増殖誘導刺激 (Ox-LDL, GM-CSF) による M₁ 増殖能と AMPK の関連を解析した。

細胞増殖の評価は、[3H]チミジン取り込み法を用いて行った。

細胞周期の評価は、Propidium iodide を用いた Flow cytometry 法で行った。

<実験 - b>

～ AMPK 活性制御 M₁ に増殖誘導刺激を行うことで M₁ 表現型の変化の解析 ～

AMPK 活性制御には、AMPK 活性化剤 AICAR およびアデノウイルスベクターを用いて優位抑制型 dominant negative mutant (T172A)-AMPK (DN-AMPK) を過剰発現することによって行った。

AMPK 活性制御した M₁ に増殖誘導刺激を行うことで M₁ 増殖能の変化を解析した。

実験

～ 動脈硬化巣における M₁ 増殖及び M₁ の組織浸潤の評価 (*in vivo*) ～

動脈硬化モデルマウス (アポ E 欠損マウス) の大動脈弁輪部の組織薄切片及び大動脈全体を enface した組織サンプルを Oil-red O 染色し粥状動脈硬化病変のサイズを定量化した。

大動脈弁輪部の連続切片を用いて M₁ 特異的な表面抗原マーカー (CD11b) と細胞増殖のマーカー (PCNA) で多重免疫染色を行い増殖

細胞と一致の程度を評価した。

実験

~ AMPK 活性化剤による動脈硬化症の発症・進展抑制機序の解明 (*in vivo*) ~

アポ E 欠損マウスに AICAR を 8~10 週間連日皮下注射投与後に sacrifice し、上記 実験

と同様の検討で動脈硬化病変のサイズを定量化し増殖細胞および M についてコントロールマウスと比較検討した。

4. 研究成果

マウス腹腔 M において、AICAR は濃度依存性に AMPK の Thr172 をリン酸化し、主要な下流分子である ACC のリン酸化を誘導した。この効果は AICAR 添加後 1 時間以内で誘導され、24 時間以上持続した。

腹腔 M において、AICAR は酸化 LDL、あるいは GM-CSF により誘導された M 増殖を濃度依存性に有意に抑制した。

DN-AMPK を遺伝子導入し過剰発現させた M では、AICAR により誘導される AMPK のリン酸化が誘導されず、下流の ACC のリン酸化も誘導されなかった。この M では、AICAR による酸化 LDL 誘導性マクロファージ増殖の抑制効果が、解除された。

GM-CSF 誘導性 M においては AICAR 添加により G0/G1 期にある M の増加と、S 期と G2/M 期にある M の減少を認めた。

G0/G 期: $180.3 \pm 1.5\%$ $93.4 \pm 1.8\%$

S 期: $13.2 \pm 0.9\%$ $6.1 \pm 0.5\%$

G2/M 期: $7.2 \pm 0.7\%$ $2.5 \pm 0.3\%$

Apo E 欠損マウスに AICAR 投与することで脂質プロファイルに有意な変化は認めなかった (図 1-1)。AICAR 投与群では CTRL 群と比較し有意に動脈硬化巣が縮小していた (図 1-2)。

	CTRL (n=7)	AICAR (n=7)
BW (g)	30.1 ± 1.6	31.7 ± 2.8
TC (mg/dl)	1013 ± 82	914 ± 34
TG (mg/dl)	166 ± 52	94 ± 40
HDL-C (mg/dl)	35 ± 7	18 ± 26

図1-1

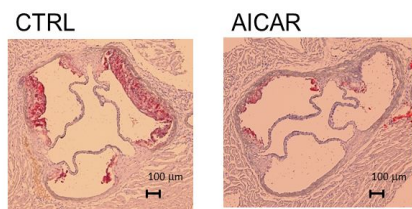
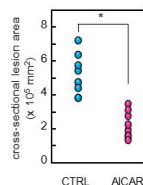


図1-2



ApoE 欠損マウスの動脈硬化巣において増殖細胞の 38%が M であった (図 2-1)。AICAR 投与群では CTRL 群と比較し増殖細胞が有意に少なく、増殖細胞中の M の割合も有意に少なかった (図 2-2)。

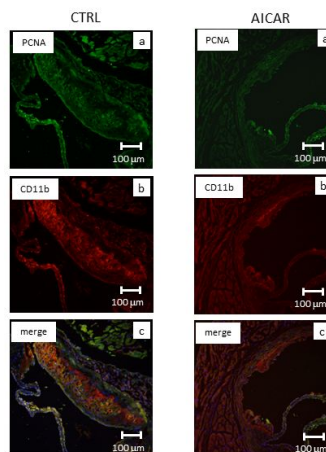


図2-1

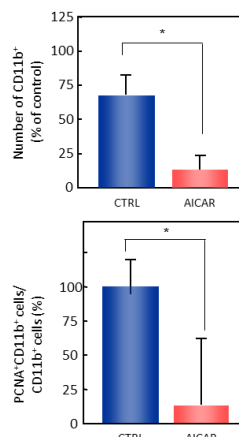


図2-2

M における AMPK の役割は未だに十分に解明されていない。今回の研究結果で、AMPK 活性化が M の細胞周期の進行を G1 期で停止 (G1 arrest) させることで M の増殖を抑制する作用があること、AMPK 活性化剤の投与によりマウス生体内でも動脈硬化の進行が抑制され、動脈硬化巣における増殖 M の割合が減少されること、が示された。これらの知見から、M における AMPK の役割は、M の細胞周期の進行を介した M の増殖の調節にあり、薬剤で AMPK 活性を調節することは動脈硬化症の治療標的となりうる可能性があることを証明し得た。

AMPK 活性化剤の投与による動脈硬化巣での増殖 M の減少は、M の増殖が抑制されたことが主因と考えられるが、それ以外にも、M 表現型が変化された可能性や動脈硬化巣への M の組織浸潤が抑制された可能性、これらの機序が総合的に作用した可能性も考えられる。

M の組織浸潤は、動脈硬化巣ばかりでなく、脂肪組織、肝臓、膵臓など多くの組織で観察されている。脂肪組織、肝臓への浸潤や浸潤した組織でM の表現型がM2 優位となることで組織のインスリン感受性が高まり耐糖能が改善することが明らかとされており (*Cell Metab.* 7:485,2008)、膵臓への M の組織浸潤はインスリン分泌能低下の原因となることも示唆されていることから、2 型糖尿病の病態にも深く関連があると考えられている。さらには、中枢神経系への炎症性細胞の浸潤が病因の一つと考えられている多発性硬化症のモデルマウスに AMPK 活性化剤を投与することで、中枢神経系への単球や M の組織浸潤が抑制され多発性硬化症の病態も改善を示すことが報告されており (*J Immunol.* 182:8005, 2009) 中枢神経系への M の組織浸潤が神経変性疾患の原因となっている可能性がある。また、悪性腫瘍の転移に M 表現型の変化が先行するという報告など、M 表現型の変化や M の組織浸潤が関与する病態は数多く存在する。

以上より M における AMPK 活性は、動脈硬化症のみならず、2 型糖尿病や神経変性疾患、悪性腫瘍など M の関与する様々な疾患の病態形成に深く関わっていると考えられる。本研究をさらに発展させ、M における AMPK 活性の役割の解析をさらに進めることで、これら多くの疾患の発症機序を一元的に解明することに繋がる可能性がある。本研究を進めることで得られる知見は、多くの疾患の病態の解明や治療法の開発に多大な貢献をすると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

第 28 回日本糖尿病合併症学会

会期：2013 年 9 月 13 日～9 月 14 日

会場：北海道 (旭川グランドホテル)

発表演題：AMPK 活性化によるマクロファージ増殖抑制を介した糖尿病大血管合併症発症抑制効果の解析

演者：石井 規夫、松村 剛、木下 博之、福田 一起、瀬ノ口 隆文、本島 寛之、西川 武志、荒木 栄一

第 2 回 Kyushu Diabetes Research Conference

会期：2013 年 7 月 13 日

会場：福岡 (ヒルトン福岡シーホーク)

演題名：糖尿病大血管合併症発症・進展におけるマクロファージ AMPK の役割 (最優秀奨励賞)

演者：石井 規夫、松村 剛、本島 寛之、西川 武志、荒木 栄一

第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会

会期：2013 年 5 月 22 日～24 日

会場：熊本 (ホテル日航熊本ほか)

発表演題：マクロファージ AMPK 活性化を介した糖尿病大血管合併症進展抑制効果の解析

演者：石井 規夫、松村 剛、木下 博之、福田 一起、瀬ノ口 隆文、本島 寛之、西川 武志、荒木 栄一

第 44 回日本動脈硬化学会

会期：2012 年 7 月 19 日～7 月 20 日

会場：福岡 (ヒルトン福岡シーホーク)

発表演題：Activation of AMP-activated protein kinase suppresses the progression of atherosclerosis via inhibition of macrophage proliferation (High Score Poster)

演者：Norio Ishii, Takeshi Matsumura, Hiroyuki Kinoshita, Kazuki Fukuda, Takafumi Senokuchi, Takeshi Nishikawa, Eiichi Araki

〔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：

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

石井 規夫 (ISHII, Norio)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10599111

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：