

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461374

研究課題名(和文) cPLA2 発現抑制による動脈硬化進展抑制効果と新規動脈硬化症治療法開発の試み

研究課題名(英文) Downregulation of cPLA2 suppress atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein-E deficient mice.

研究代表者

松村 剛 (Matsumura, Takeshi)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20398192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)阻害によるPPAR γ 活性化を介した動脈硬化進展抑制作用の有無を、cPLA2欠損/apoE欠損マウスを用いて検討した。cPLA2欠損マウスの腹腔マクロファージでは、PPAR γ 活性が上昇し、TNF- α 、MCP-1mRNA産生が低下、ABCA1/G1mRNA産生が上昇していた。cPLA2欠損/apoE欠損マウスの動脈硬化形成は、コントロールapoE欠損マウスに比し有意に減弱していた。この結果から、cPLA2欠損は、マクロファージの動脈硬化惹起応答を抑制することで、動脈硬化進展抑制効果を発揮し得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the anti-atherogenic effects on cPLA2 and apoE double knockout mice (cPLA2/apoE KO mice). PPAR γ activity was increased in peritoneal macrophage of cPLA2/apoE KO mice. LPS-induced mRNA expression of TNF- α and MCP-1 was decreased, and mRNA expression ABCA1/G1 was increased in peritoneal macrophage of cPLA2/apoE KO mice. Moreover, atherosclerotic lesion formation on cPLA2/apoE KO mice was lower than that on control apoE KO mice. These results suggest that cPLA2 is involved in atherosclerotic lesion formation in apoE KO mice, and that may be therapeutic target for diabetic macrovascular complications.

研究分野：代謝学

キーワード：動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省による平成 19 年度国民健康・栄養調査では、「糖尿病の可能性を否定できない人」も含めると 2210 万人の糖尿病もしくは糖尿病予備群が存在すると推定されており、その数も年々増加傾向にある。故に、糖尿病及びその合併症の発症・進展を阻止する新規治療法の開発は、医療財政や患者の QOL の改善に繋がる重要な命題である。

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)は、脂肪細胞分化に必須の転写因子であり、そのインスリン抵抗性改善作用から糖尿病治療のターゲット分子の一つとされている。thiazolidinedione (TZD) は PPAR γ の活性化を誘導するリガンドであり、実際に抗糖尿病薬として臨床応用されている。さらに PPAR γ の活性化は抗動脈硬化作用を誘導することが *in vitro*、*in vivo* の系あるいは大規模臨床試験でも証明されており、糖尿病大血管合併症治療としての PPAR γ 作動薬の新たな可能性が論じられている。

phospholipase A₂ (PLA₂)はリン脂質の 2 位の脂肪酸を加水分解することでアラキドン酸の生成を誘導する酵素である。その中でも特に、細胞内アラキドン酸カスケードに関与する細胞内在型の cytosolic PLA₂ (cPLA₂)は、cyclooxygenase を介した prostaglandin 群の生成や lipoxygenase を介した leukotrien 群の生成を介してさまざまな細胞応答を引き起す。最近申請者は、細胞内在型の cPLA₂ の特異的阻害が脂肪細胞において PPAR γ の活性化を誘導すること、その結果脂肪細胞の分化誘導を促進することを見出した。さらに、cPLA₂ 特異的阻害剤 (AACOCF₃)が高脂肪食負荷マウスの耐糖能を改善させ、脂肪細胞の小型化を誘導することも見出した。このことは、cPLA₂ の負の制御が 2 型糖尿病に対し有益な効果を導く可能性を示している。加えて申請者は、マクロファージにおいて PPAR γ の活性化を誘導すること、その結果様々な抗動脈硬

化作用を発揮することを見出した。さらに AACOCF₃ の投与により、アポ E 欠損マウスの動脈硬化進展を抑制させることを見出した。申請者が見出したこれら cPLA₂ 特異的阻害による PPAR γ 活性を介した抗動脈硬化作用発現は、これまでに報告例のない全く新しい発見であり、また cPLA₂ の負の制御が糖尿病大血管合併症に対し有益である可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究では、cPLA₂ 阻害による PPAR γ 活性化を介した動脈硬化進展抑制作用の有無を、cPLA₂ 欠損マウスと apo E 欠損マウスとのダブルノックアウトマウスを用いて分子レベルで検討することで、動脈硬化症進展における cPLA₂ の意義を解明するとともに、動脈硬化症の新規治療法確立に繋がる可能性を探求することを主目的とする。

3. 研究の方法

mouse cPLA₂ α の siRNA を作製、マウス腹腔マクロファージ(遺伝子導入し、細胞を 24-48 時間培養後に、cPLA₂ α の発現低下を Real-time RT-PCR 法にて確認した。

上記の腹腔マクロファージに PPAR γ のリガンド結合部位の N 端側に Gal4 蛋白を結合させた変異蛋白発現ベクター (pMX-PPAR γ)と Gal4 の DNA 結合領域をその上流に持つ Luciferase reporter plasmid (p4xUASg-tk-luc)を遺伝子導入、RPMI1640 + 10%FCS にて 24 時間培養後、Luciferase 活性を測定することで PPAR γ 活性化能を検討した。

上記の腹腔マクロファージに LPS を添加し、4 から 24 時間培養の後、mRNA、細胞蛋白及び培養液を回収。TNF- α 、MCP-1、ABCA1、ABCG1 産生を Real-time RT-PCR 法、Western blot 法、ELISA 法にて検討した。

東京大学医学部生化学教室から供与いただいた cPLA₂α 欠損マウスの腹腔マクロファージを採取の後、細胞を 24-48 時間培養、cPLA₂α の発現の有無を Western blot 法、real-time RT-PCR 法にて確認した。

上記のマウスの腹腔マクロファージに pMX-PPAR γ と p4xUASg-tk-luc を遺伝子導入し、RPMI1640 + 10%FCS にて 24 時間培養後、Luciferase 活性を測定することで PPAR γ 活性化能を検討した。

上記の腹腔マクロファージに LPS を添加し、4 から 24 時間培養の後、mRNA、細胞蛋白及び培養液を回収。TNF- α 、MCP-1、ABCA1、ABCG1 産生を Real-time RT-PCR 法、Western blot 法、ELISA 法にて検討した。

cPLA₂α 欠損マウスを apoE 欠損マウスと交配させ、cPLA₂α 欠損/apoE 欠損マウスを作成した。そのマウスに 6 週間高コレステロール食負荷を行い、終了と同時に上下行大動脈の組織を採取し、大動脈を切開・展開したのちにホルマリン固定を行い、Oil-Red-O 染色を行うことで粥状動脈硬化巣の進展度を観察した。

同マウスの大動脈洞部(大動脈弁上部)を採取ののち同組織の凍結切片を作成し、Oil-Red-O 染色を行うことで大動脈洞部での粥状動脈硬化巣の進展度を観察した。

同マウスより採取した大動脈組織及び作成した大動脈洞部の凍結切片に対し、TNF- α 、MCP-1、ABCA1、ABCG1 発現量を Real-time RT-PCR 法及び免疫組織染色法にて解析した。

4 . 研究成果

マウス腹腔マクロファージに mouse cPLA₂α の siRNA を遺伝子導入することで、cPLA₂α の発現が約 80%抑制し得た。このマクロファージを用いて、PPAR γ 活性を検討したところ、コントロールマクロ

ファージに比し有意に PPAR γ 活性が上昇した。

cPLA₂α 欠損マウスの腹腔マクロファージにて同様の検討を行ったところ、野生型マウスのマクロファージに比し有意に PPAR γ 活性が上昇した。

これらのマクロファージに対し、LPS 刺激による TNF- α 、MCP-1 の発現、無刺激での ABCA1、ABCG1 の発現を Real-time RT-PCR 法で検討したところ、いずれのマクロファージにおいても、コントロールに比し TNF- α 、MCP-1、ABCA1、ABCG1 mRNA の有意な発現を認めた。

次に、作成した 8 週齢の cPLA₂α 欠損/apoE 欠損マウスを用い、6 週間の高コレステロール食負荷ののち、回収した胸腹部大動脈内側部及び大動脈洞部の Oil-Red-O 染色による動脈硬化進展度についてコントロール apoE 欠損マウスと比較検討したところ、胸腹部大動脈の内側面及び大動脈洞部の動脈硬化進展度は、コントロール apoE 欠損マウスに比し cPLA₂α 欠損/apoE 欠損マウスで有意に減弱していた。

これらの結果から、cPLA₂α の遺伝的欠損は、マクロファージの動脈硬化惹起応答を抑制することで、動脈硬化進展抑制効果を発揮し得ることが示唆され、cPLA₂α は動脈硬化症に対する治療ターゲットになりうる可能性が考えられる。

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 13 件)

1. Kawasaki S, Motoshima H, Hanatani S, Takaki Y, Igata M, Tsutsumi A, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Kawashima J, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Regulation of TNF α

- converting enzyme activity in visceral adipose tissue of obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 430:1189-1194, 2013.
2. Kinoshita H, [Matsumura T](#), Ishii N, Fukuda K, [Senokuchi T](#), [Motoshima H](#), Kondo T, Taketa K, Kawasaki S, Hanatani S, Takeya M, Nishikawa T, Araki E. Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 431:124-130, 2013.
 3. Shimoda S, Iwashita S, Ichimori S, Matsuo Y, Goto R, Maeda T, Matsuo T, Sekigami T, Kawashima J, Kondo T, [Matsumura T](#), [Motoshima H](#), Furukawa N, Nishida K, Araki E. Efficacy and safety of sitagliptin as add-on therapy on glycemic control and blood glucose fluctuation in Japanese type 2 diabetes subjects ongoing with multiple daily insulin injections therapy. *Endocr J* 60:1207-1214, 2013.
 4. Miyagawa K, Kondo T, Goto R, Matsuyama R, Ono K, Kitano S, Kawasaki S, Igata M, Kawashima J, [Matsumura T](#), [Motoshima H](#), Araki E. Effects of combination therapy with vildagliptin and valsartan in a mouse model of type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 12:160, 2013.
 5. [Matsumura T](#), Taketa K, [Motoshima H](#), [Senokuchi T](#), Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Yamada S, Kukidome D, Kondo T, Hisada A, Katoh T, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Association between circulating leukocyte subtype counts and carotid intima-media thickness in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 12:177, 2013.
 6. Uchimura K, Hayata M, Mizumoto T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Morinaga J, Onoue T, Yamazoe R, Ueda M, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi N, Ogawa W, Fukuda K, Kondo T, [Matsumura T](#), Araki E, Tomita K, Kitamura K. The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. *Nat Commun* 5:3428, 2014.
 7. Shimoda S, Iwashita S, Sekigami T, Furukawa N, Matsuo Y, Ichimori S, Goto R, Maeda T, Watanabe E, Kondo T, [Matsumura T](#), [Motoshima H](#), Nishida K, Araki E. Comparison of the efficacy of sitagliptin and glimepiride dose-up in Japanese patients with type 2 diabetes poorly controlled by sitagliptin and glimepiride in combination. *J Diabetes Investig* 5:320-6, 2014.
 8. Kondo T, Ono K, Kitano S, Matsuyama R, Goto R, Suico MA, Kawasaki S, Igata M, Kawashima J, [Motoshima H](#), [Matsumura T](#), Kai H, Araki E. Mild electrical stimulation with heat shock reduces visceral adiposity and improves metabolic abnormalities in subjects with metabolic syndrome or type 2 diabetes: Randomized crossover trials. *EBioMedicine* 1:80-89, 2014.
 9. Kondo T, [Motoshima H](#), Igata M, Kawashima J, [Matsumura T](#), Kai H, Araki E. The role of heat shock response in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab J* 38:100-6, 2014.
 10. Shimoda S, Okubo M, Koga K, Sekigami T, Kawashima J, Kukidome D, Igata M, Ishii N, Shimakawa A, [Matsumura T](#), [Motoshima H](#), Furukawa N, Nishida K, Araki E. Insulin requirement profiles in Japanese hospitalized subjects with type 2 diabetes treated with basal-bolus insulin therapy. *Endocr J* 62:209-216, 2015.
 11. Fukuda K, [Matsumura T](#), [Senokuchi T](#), Ishii N, Kinoshita H, Yamada S, Murakami S, Nakao S, [Motoshima H](#), Kondo T, Kukidome D, Kawasaki S, Kawada T,

Nishikawa T, Araki E. Statins mediate anti-atherosclerotic action in smooth muscle cells by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Biochem Biophys Res Commun* 457:23-30, 2015.

12. Yamanaka M, Matsumura T, Ohno R, Fujiwara Y, Shinagawa M, Sugawa H, Hatano K, Shirakawa J, Kinoshita H, Ito K, Sakata N, Araki E, Nagai R: Non-invasive measurement of skin autofluorescence to evaluate diabetic complications. *J Clin Biochem Nutrition* 58:135-140, 2016.

[学会発表](計 15件)

1. Senokuchi T, Yamada S, Negita E, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E. Inhibition of local macrophage growth ameliorates focal inflammation in the plaque and suppresses atherosclerosis in ApoE-deficient mice. The 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress, 2014/9/12-13, Kyoto, Japan.
2. 松村剛: Therapeutic approach focused on the inactivation of macrophages for diabetic macroangiopathy. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013/5/16-18, 熊本, シンポジウム
3. 松村剛, 本島寛之, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 山田沙梨恵, 西川武志, 荒木栄一: 肥満・メタボリックシンドロームにおける血清脂質値へのコレステロール合成・吸収能の影響. 第28回日本糖尿病合併症学会, 2013/9/13-14, 旭川, ワークショップ
4. 松村剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 山田沙梨恵, 本島寛之, 近藤龍也, 西川武志, 荒木栄一: 肥満・メタボリックシンドロームにおける血清脂質値へのコレステロール合成・吸収能の影響. 第63回日本体質医学会, 2013/10/5-6, 久留米, 口演
5. 松村剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 福田一起, 木下博之, 荒木栄一: 高血圧合併2型糖尿病における大血管・細小血管合併症進展の指標としての単球数の有用性. 第36回日本高血圧学会総会, 2013/10/24-26, 大阪, ポスター
6. 松村剛, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 瀬ノ口隆文, 近藤龍也, 本島寛之, 金谷絢子, 佐藤恵子, 西川武志, 荒木栄一: 肥満・メタボリックシンドロームにおける血清脂質値へのコレステロール合成・吸収能の影響. 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8-9, 沖縄, 口演
7. Matsumura T, Senokuchi T, Fukuda K, Ishii N, Kinoshita H, Yamada S, Murakami S, Kondo T, Motoshima H, Nishikawa T, Araki E. Association between circulating leukocyte subtype counts and carotid intima-media thickness in Japanese subjects with type 2 diabetes. The 6th AASD Scientific Meeting, 2014/12/21-24, SUNTEC, Singapore.
8. 松村剛: 糖尿病と大血管合併症～その発症をいかに防ぐか～. 第52回日本糖尿病学会九州地方会, 2014/10/31-11/1, 熊本
9. 松村剛, 木下博之, 本島寛之, 近藤龍也, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 村上彩子, 松嶋和美, 杉内博幸, 西川武志, 荒木栄一: 肥満2型糖尿病におけるHDL亜分画とインスリン抵抗性との関連. 第35回日本肥満学会, 2014/10/24-25, 宮崎, 口演
10. Matsumura T, Yamanaka M, Ohno R, Kinoshita H, Senokuchi T, Ishii N, Fukuda K, Murakami S, Nagai R, Araki E: Non-invasive measurement of skin AGEs and its association with diabetic

microvascular complications. Keystone Symposia Conference-Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies, 2015/10/25-29, Westin Miyako Kyoto, Kyoto, Japan.

11. 松村剛, 木下博之, 本島寛之, 近藤龍也, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 松嶋和美, 杉内博幸, 西川武志, 荒木栄一: 2型糖尿病におけるHDL亜分画とインスリン抵抗性との関連. 第112回日本内科学会, 2015/4/10-12, 京都.
12. 松村剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 山田沙梨恵, 村上彩子, 本島寛之, 近藤龍也, 西川武志, 荒木栄一: 肥満2型糖尿病におけるHDL亜分画とインスリン抵抗性との関連性の検討. 第65回日本体質医学会, 2015/7/4-5, 札幌, 口演
13. 松村剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 山田沙梨恵, 村上彩子, 西川武志, 荒木栄一: 肥満・メタボリックシンドロームにおける血清脂質値へのコレステロール合成・吸収能の影響. 第47回日本動脈硬化学会総会, 2015/7/9-10, 仙台
14. 松村剛, 片平聖子, 関谷春花, 藤本有紀, 深田和子, 吉富咲子, 荒木栄一: 2型糖尿病における経口糖尿病薬による体重、脂質代謝への影響. 第36回日本肥満学会年次学術集会, 2015/10/2-3, 名古屋
15. 松村剛, 木下博之, 山中幹宏, 福田一起, 石井規夫, 瀬ノ口隆文, 西川武志, 大野礼一, 永井竜児, 荒木栄一: 非侵襲指先部経皮蛍光AGEs測定による糖尿病細小血管合併症スクリーニング法の臨床的意義. 第53回日本糖尿病学会九州地方会, 2015/11/27-28, 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 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

松村 剛 (MATSUMURA, Takeshi)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20398192

(2) 研究分担者

瀬ノ口 隆文 (SENOKUCHI, Takafumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 00530320

(3) 連携研究者

本島 寛之 (MOTOSHIMA, Hiroyuki)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40398201