

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860263

研究課題名(和文) 全身性慢性炎症・早老症の新規モデルマウスの確立とその病態解析

研究課題名(英文) Establishment and pathological analysis of novel model mice of systemic chronic inflammation and progeria

研究代表者

川瀬 良太 (Kawase, Ryota)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：60727650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：通常飼育においてProgranulin(PGRN)・ApoE double KOマウス(DKO)は手足の関節腫脹や皮膚炎はApoE KOマウスに比して早期から有意に発生率が高く、寿命も有意に短いことから、DKOマウスが全身性慢性炎症・早老症の新規モデルマウスになりうる可能性が考えられた。またPGRNの抗炎症作用の機序としてこれまでにTNF受容体(TNFR)のアンタゴニストとしての役割が報告されているが、TNFR KOマウスの検討によりTNFR以外の作用機序がある可能性を示した。マクロファージから分泌されるPGRNの持つ抗動脈硬化作用やPGRN結合HDLの抗酸化作用なども明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We revealed that Progranulin (PGRN)・ApoE double KO mice (DKO) died significantly earlier than ApoE KO and often suffered joint swelling and dermatitis, which is considered to be the manifestations of chronic inflammation. Therefore, we hypothesize that DKO might be novel model mice of systemic inflammation and progeria. PGRN have been already reported to bind TNF receptors (TNFRs) and exert anti-inflammatory effects. We find possibility of another pathway other than TNFRs in TNFR KO mice. We also revealed that macrophage-derived PGRN plays important athero-protective roles by using bone marrow transplantation method. And we found that PGRN binding HDL has an anti-oxidative effect. Taken together, PGRN might play essential roles in anti-inflammation and successful aging.

研究分野：動脈硬化

キーワード：progranulin 慢性炎症 老化

1. 研究開始当初の背景

Progranulin(PGRN)は多くの機能を有する蛋白であり、PGRNの遺伝子変異が神経変性疾患の一つである前頭側頭変性症の原因となることやAlzheimer型認知症とも深く連関することが報告されている蛋白である。またPGRNは抗炎症作用も有することが知られており、我々は血管の慢性炎症と考えられている動脈硬化におけるPGRNの役割に関して検討を行ってきた。そして、PGRNが抗動脈硬化作用を有することを世界で初めて報告した【Kawase R et al, Cardiovasc Res, 2013】。動脈硬化の検討のために作成したPGRN-ApoE Double KOマウス(DKO)であったが、驚くべきことに通常飼育を続けていると激しい関節炎・皮膚炎・炎症性腸疾患・白内障・腫瘍形成などを自然発症し、コントロールであるApoE KOマウスに比して有意に早期に死亡することがわかった。PGRNが欠損することにより慢性炎症を基盤とする様々な疾患が起こり、短命になること、また様々な認知症とも関連する蛋白であることから、慢性炎症の制御や健全な老化のためにPGRNが非常に重要な役割を担っていることが推察された。

これまでにPGRNの持つ抗炎症作用の機序として、「PGRNがTNF受容体(TNFR)に結合することにより、TNF/TNFRの相互作用を競合阻害することで抗炎症作用を発揮する」という報告がscience誌に2011年にされているが、その機序だけではこれだけ様々な表現型を説明することはできないと考えている。

また、full lengthのPGRNは抗炎症作用を持つが、好中球エラスターゼなどの蛋白分解酵素などによりPGRNが分断され、個々のGRNになってしまうと逆にGRNは炎症惹起的に働くとも考えられている。我々は、ヒト単球由来マクロファージから分泌され、HDL/アポA1に結合する蛋白としてPGRNを同定し報告しているが、この「PGRNがHDL/アポA1に結合している」ということが蛋白分解酵素による分断からPGRNを守っているということも報告している【Okura H et al, J Atheroscler Thromb, 2010】。HDL結合蛋白としてのPGRNという観点も抗炎症作用の機序として重要であると考えている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、大きく分けて、

1) DKOマウスが全身性慢性炎症・早老症

モデルマウスになりうるかの検討

及び

2) その病態(主にPGRNの抗炎症作用の機序)の解明

を研究目的とした。

3. 研究の方法

全身性慢性炎症・早老症のモデルマウスの確立

DKOマウスの検討では、経時的に様々な表現型が、どのタイミングでどれくらいの割合で起こっているのかという検討を行った。また組織サンプルを採取し、形態学的・組織学的な詳細な検討も行った。

PGRNの抗炎症作用の機序の解明

TNFRアゴニスト以外のPGRNの機序の検討

これまでにPGRNの抗炎症作用の機序として、TNFRアゴニストとしての役割の報告があるが、それ以外のPGRNの抗炎症機序の解明のために、TNFR1/TNFR2ダブルノックアウトマウス(TNFR KOマウス)を用いることでTNFRが全く無い状態のマクロファージを採取し、PGRNの添加実験を行うことで検討を行った。

マクロファージから分泌されるPGRNの役割の検討

ApoE KOマウスに放射線を照射し、そこにDKOマウスから採取した骨髄を移植することで、骨髄由来細胞からのPGRNのみをKOした状態を作りマクロファージから分泌されるPGRNの動脈硬化に対する影響を検討した。

具体的な方法としては、ApoE KOマウスに、約8.5Gyの放射線を照射し、その後DKOマウスもしくはApoE KOマウスから採取した骨髄を 1×10^8 個尾注により移植した。その2群に、その後4週間は通常飼育した後、60%高脂肪食負荷に変更し12週間飼育した。そこで動脈硬化巣の検討(大動脈全体のOil Red O染色)を行い、プラークエリアを測定した。

PGRNがHDLと結合している意義についての検討

PGRNはHDL結合蛋白である。そこで、PGRNが結合しているHDLと結合していないHDLを作成し、PGRNがHDLに結合している意味を検討するためコレステロール引き抜き能や抗酸化能の測定を行った。

4. 研究成果

Progranulin(PGRN)・ApoE Double KO マウス(DKO)が全身性慢性炎症・早老症モデルになりうるかを検討した。

通常飼育にて(1)手足の関節腫脹(関節炎)(2)皮膚炎の発生率に関して検討を行った。(1)関節腫脹はDKOにのみ認め40週で50%、60週齢以上では80%以上で認めた。(2)皮膚炎もDKOは早期から発生率が高く、40週齢以降では80%以上で認めた。野生型では変化無く、PGRN KO・ApoE KOでは60週齢以降で50%程度であった。またDKOは有意に寿命も短く、全身の慢性炎症が起こりやすい老化モデルマウスとなる可能性が考えられた。

形態学的にDKOは関節周囲や皮下に炎症だけではなく通常蓄積しない何らかの物質が大量に蓄積しており、今後さらなる検討が必要と考えている。

PGRNの抗炎症作用はTNFRアゴニストとしての機序の報告があるが、それ以外の機序に関する検討を行った。PGRN添加によりAktのシグナルが入ることは既知であるが、TNFR1/TNFR2 KOマウスの腹腔マクロファージにrPGRN添加実験を行ったところ添加濃度依存的にAktのリン酸化が増えることがわかり、TNFRを介さないPGRNの作用経路の存在が示唆された。

マクロファージのPGRNの役割の検討として骨髄移植実験を行った。ApoE KOに放射線照射し、ApoE KOないしはDKOの骨髄を移植した2群に高脂肪食負荷をかけ動脈硬化を評価すると、DKOの骨髄を移植した群で有意に動脈硬化が増悪していた(4.3%,9.3%; $p<0.05$, $n=9$)。マクロファージのみPGRNを欠損させても動脈硬化が増悪することよりマクロファージのPGRNに抗動脈硬化作用があることが示唆された。

PGRNがHDLと結合している意味の検討として、コレステロール引き抜き能・抗酸化能の検討を行った。PGRN KOのHDLは野生型のHDLに比して引き抜き能が有意に低下していた。ApoE KOとDKOのHDLでは、コレステロール引き抜き能に有意な差はなかったが、抗酸化能はDKOのHDLでは有意に低下していた。

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3件)

Ohama T, Kawase R, Yamashita S.

Methods for studying the function of progranulin in atherosclerosis using both knockout mice models and in vitro studies, **Methods in Molecular Biology**, in press (査読あり)

Noguchi T, Ebina K, Hirao M, Kawase R, Ohama T, Yamashita S, Morimoto T, Koizumi K, Kitaguchi K, Matsuoka H, Kaneshiro S, Yoshikawa H;

Progranulin plays crucial roles in preserving bone mass by inhibiting TNF- α -induced osteoclastogenesis and promoting osteoblastic differentiation in mice.

Biochem Biophys Res Commun.

465(3):638-43. 2015

(査読あり)

Nakatani K, Watabe T, Masuda D, Imaizumi M, Shimosegawa E, Kobayashi T, Sairyō M, Zhu Y, Okada T, Kawase R, Nakaoka H, Naito A, Ohama T, Koseki M, Oka T, Akazawa H, Nishida M, Komuro I, Sakata Y, Hatazawa J, Yamashita S.

Myocardial energy provision is preserved by increased utilization of glucose and ketone bodies in CD36 knockout mice.

Metabolism 64(9):1165-74. 2015

(査読あり)

[学会発表](計7件)

Ryota Kawase, Progranulin Plays a Crucial Role in the development of Atherosclerosis, The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014)、2014年4月14日、京都国際会議場(京都府、京都市)

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年7月11日、京王プラザホテル(東京都、新宿区)

Ryota Kawase、Scientific Sessions 2014 of the American Heart Association (AHA2014)、A Role of an HDL-associated Anti-inflammatory Protein, Progranulin, in Acute Coronary Syndrome、2014年11月16日、シカゴ(アメリカ合衆国)

川瀬良太、第79回日本循環器学会総会、Roles of an HDL-associated Anti-inflammatory Protein, Progranulin, in Acute Coronary Syndrome、2015年4月24日、グランフロント大阪北館 B2 階ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンターホール(大阪府、大阪市)

Ryota Kawase、国際動脈硬化学会(ISA2015)、Roles of an HDL-associated Anti-inflammatory Protein, Progranulin, in Acute Coronary Syndrome、2015年5月26日、アムステルダム(オランダ)

川瀬良太、第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会、Roles of Progranulin in the stabilization of vulnerable coronary arterial plaques、2015年7月10日、仙台国際センター(宮城県、仙台市)

川瀬良太、第80回日本循環器学会総会、Macrophage-derived Progranulin Protects from Atherosclerosis、2016年3月18日、仙台国際センター(宮城県、仙台市)

〔図書〕
(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ:
<http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川瀬良太(KAWASE, Ryota)
大阪大学医学系研究科 特任研究員
研究者番号: 60727650