

令和 3 年 2 月 15 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08606

研究課題名(和文)微小接着環境の変化がもたらす細胞機能異常を標的とした革新的動脈硬化治療法の開発

研究課題名(英文) Progression of atherosclerosis by enhanced macrophage foam cell formation by matrixcryptic site of tenascin-C

研究代表者

伊豫田 拓也 (Iyoda, Takuya)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80465715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では TN-C 分子内に存在し、接着分子に由来するシグナルを活性化する生理活性領域Xに着目し、これが動脈硬化の病態進展に鍵となる可能性について評価したものである。各種検討により領域Xはマクロファージや血管平滑筋細胞の発現形質を変化させることで、動脈硬化病態の形成およびその進展に中心的に関わる可能性が明らかになり、さらに領域Xの生理活性を無力化するペプチドYの投与により、動脈硬化モデルマウスにおける病態形成を有意に抑制できることを示した。これらの結果は、本課題にて着目する領域Xが動脈硬化治療の標的として、ペプチドYがこれを実現する候補薬物として、共に価値高いものであることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化を含む各種慢性炎症性病態の多くでは tenascin(TN)-Cの高発現が認められるが、その生理・病理学的意義には未だ不明な点が多い。また動脈硬化治療においては有効な治療薬としてスタチンが確立しているが、本剤が不適な患者も一定数居り、新たな治療アプローチの創生が求められている。本課題の成果はTN-C内の一部活性領域Xが動脈硬化の病態形成に重要な役割を担うことを示し、この領域の無力化により動脈硬化病態の改善が可能であることを示した。新たな動脈硬化治療法の提起と同時に、病態促進的なTN-Cの正体として領域Xに注目する意義を提起した。

研究成果の概要(英文)：Although enhanced expression of tenascin(TN)-C is frequently observed in atherosclerotic lesion, pathological role of TN-C in progression of atherosclerosis is still unknown. In this study, we focused into "region X" in TN-C molecule, and found that the ability of this region to elicit pro-atherosclerotic phenotypes from not only macrophages but vascular smooth muscle cells(VSMC). Foam cell formation was enhanced by adding region X to macrophage cell culture. Exposure to region X in high dose led VSMC to apoptotic cell death, whereas acceleration of TN-C expression was induced by low dose of region X. Moreover, we demonstrated that the progression of atherosclerosis in model animals are significantly suppressed by injection of peptide Y, which could attenuate region X's bioactivity. These results suggest that region X might be a promising target for clinical atherosclerosis treatment. Peptide Y should be a powerful candidate for a new anti-atherosclerosis drug.

研究分野：細胞接着、分子病態学、自然免疫

キーワード：マクロファージ 動脈硬化 慢性炎症 細胞接着 テネイシン-C

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の死亡原因疾患の第1位はがんであり、2位に心臓病、3位に脳卒中と続く。しかし「がん」は全身に生ずる全てのがんの総数であり、心臓病・脳卒中の大多数が動脈硬化に起因する事実を考慮すれば、実質的な死亡原因1位は動脈硬化といえる。米国統計においても、既に動脈硬化病態を原因とする死亡者数のがんに因るものを越えており、また全世界的に見た本疾患の罹患率も、食環境の欧米化に伴い上昇傾向にある。これらより動脈硬化は今後世界的に主たる死因になると推測され、がんと同等級以上に対策が急務な疾患である。

動脈硬化病態では、マクロファージ(M $\phi$ )を中心に、血管内皮細胞(VEC)、血管平滑筋細胞(VSMC)に形質(機能)異常が観察される。中でもM $\phi$ が自身の処理能力を超えて脂質(LDL)を取り込み、その結果として生ずる泡沫細胞(脂質過剰蓄積M $\phi$ )が局所集積することが、動脈硬化巣(プラーク)形成の端緒となる。また本疾患の終末期には、M $\phi$ に由来する炎症性プロテアーゼがプラーク部位の組織分解を亢進し、その結果血管壁より剥離するプラーク塊が血栓形成の核となることで、遠心性に脳梗塞や心筋梗塞などの致死性病態を引き起こす。対して現在動脈硬化患者には、主としてスタチンを用いた血中脂質量の調節がなされる。本剤は動脈硬化予備群も含めて広く処方される優れた薬剤であるが、(a)標的が病態構成細胞そのものでない、(b)高脂質血症を伴わない動脈硬化患者が一定の割合で存在する、(c)副作用(横紋筋融解症)により投薬停止に至る事例が少なからず存在する、ことから、作用点をスタチンとは異にする新規治療法の創出が期待されている。

一方、申請者所属教室は、動脈硬化を含む種々炎症関連領域に特異的かつ一過的に高発現する細胞外マトリクス分子、テネイシンC(TNC)に注目している。近年、本分子内には細胞の接着調節に関わる生理活性領域が存在し、本領域Xが、通常はTNC分子構造内に隠されているものの、炎症性プロテアーゼによる限定分解を介して表出すると報告をした(Saito et al, 2007, *J Biol Chem*)。つまり領域Xの表出は、炎症応答の進展に伴って亢進すると考えられるが、炎症領域には必ずM $\phi$ が集積し、これが局所生体応答の調節に責を負うことから、申請者は、TNC内領域Xが、細胞接着状態の変化を介してM $\phi$ の発現形質を調節し、その結果として動脈硬化を進展させる可能性を推察した。即ち微小接着環境の調節が、スタチンに代わる新規動脈硬化治療法の候補になると考えている。

### 2. 研究の目的

今後世界的死亡原因の1位になると推測される動脈硬化に対し、現在中心的に用いられる治療戦略は、スタチンを用いた血中脂質量抑制である。本病態形成の核を成す「種々細胞(マクロファージ;M $\phi$ 、血管平滑筋)形質異常の誘導」を直接標的とする治療法はない。動脈硬化患者中には高脂質血症を伴わない群が存在し、またスタチンには副作用も認められることから、スタチンとは作用点の異なる新規治療法が望まれる。最近申請者らは、M $\phi$ における接着分子の活性化が、M $\phi$ 泡沫化の亢進を介して、動脈硬化病態の形成に関わるとの知見を得た(H27-28 科研費若手(B))。そこで、M $\phi$ を含む病態構成細胞が示す種々向動脈硬化形質の「微小接着環境変化を介した調節機構」を解明し、これを標的とした新規治療法を提案することを、本課題の目的とした。

### 3. 研究の方法

- TNC分子内領域Xを含むペプチドXを動脈硬化モデルマウスに投与し、動脈硬化の病態形成に及ぼす影響について評価した。
- TNC分子内領域X生理活性をキャンセルするペプチドYを動脈硬化モデルマウスに投与し、動脈硬化の病態形成に及ぼす影響について評価した。
- TNC分子内領域Xを含むペプチドXを用いてM $\phi$ を刺激し、各種形質発現に生ずる変化を評価することで、これが動脈硬化病態形成に貢献する可能性を検討した。
- TNC分子内領域Xを含むペプチドXにて刺激したM $\phi$ を網羅的遺伝子発現解析に処し、M $\phi$ に生ずる変化の全体像の把握を試みた。
- TNC分子内領域Xを含むペプチドXを用いてVSMCを刺激し、各種形質発現に生ずる変化を評価し、これが動脈硬化病態形成に貢献する可能性を検討した。

#### 4. 研究成果

先行研究より TNC 分子内領域 X によるマクロファージ(Mφ)の泡沫細胞化促進作用が示されていたことから、本結果が動物の病態形成過程に外挿可能か否かについて検討した。TNC 分子内領域 X の生理活性を無力化するペプチド Y の投与により動脈硬化モデルマウスにおける病態形成は明確に抑制され、ペプチド Y の活性領域のアミノ酸配列をシャッフルしたコントロールペプチドの投与には病態抑制効果が認められなかったことから、ペプチド Y には抗動脈硬化役としての可能性が、TNC 分子内領域 X には動脈硬化治療ターゲットとしての可能性が、それぞれ示唆された (Fig. 1, 特願 2020-097565)。一方で TNC 分子内領域 X を含むペプチド X の動物への投与は病態形成促進作用を示さなかったが、この結果は病態モデル動物において既に一定量以上に当該領域の発現が生じているためと推測された。

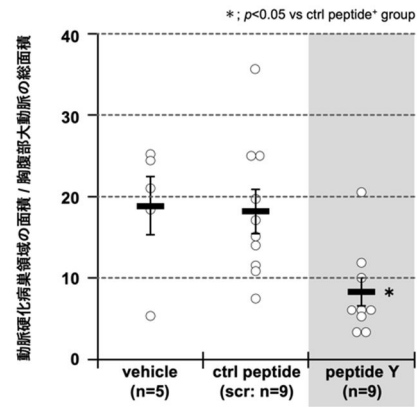


Fig.1 動脈硬化病態形成における peptide Y 投与の影響

先行研究にて見出した「TNC 分子内領域 X が Mφ に示す向動脈硬化形質誘導作用」は短期刺激によるものであったことから、本検討では領域 X への長期的暴露において Mφ に生ずる変化に纏わる基礎的な検討を行った。Mφ を領域 X に 48 時間程度まで晒したところ、IL-1β および NLRP3 の発現に顕著な上昇が観察された。タンパク質レベルにて行った評価では活性型 IL-1β (cleaved IL-1β) の発現上昇が認められたことから、領域 X による長期的な Mφ の刺激は、NF-κB 依存的な IL-1β 前駆体の発現調節と、inflammasome 依存的な IL-1β 前駆体の活性化調節という独立する 2 つのステージを共に活性化させ、結果として炎症の長期的維持に関わる可能性が推察された。

一方でこの時の ROS 産生について検討したところ、領域 X への長期暴露により Mφ による産生 ROS レベルは上昇した。しかしながらその増加幅は劇的な変化でないことから、組織障害に直接的に関わるというよりは、細胞内シグナル変化を誘導するレベルのものとして推察している。現在網羅的な遺伝子発現解析を通し、本 ROS レベル上昇の意味について解析中である。

動脈硬化病態の形成には Mφ 以外に血管平滑筋細胞(VSMC)の形質異常も貢献している。VSMC に注目した。本細胞は動脈硬化の初期に異常な増殖を示す一方、病態の終末化に伴って顕著な細胞死を起こすことで、動脈硬化病巣の不安定化と血栓形成への移行の基盤となる。TNC 分子内領域 X を含むペプチド X による刺激が VSMC に及ぼす影響について精査したところ、過去に Mφ への作用を認めたペプチド X 濃度による刺激では、VSMC の生存率に顕著な影響が生じなかった。しかしながら、VSMC 刺激に用いるペプチド X を高濃度へとシフトさせるにつれ、VSMC にはアポトーシスが誘導された (Fig.2, 右)。一方で低濃度のペプチド X による刺激においては、VSMC はペプチド X の親分子である TNC の発現を亢進させ (Fig.2, 左) かつ TNC からの領域 X 表出に鍵となるプロテアーゼ類の発現についても亢進させた。本結果より低濃度の TNC 刺激が引き金となって局所の TNC 濃度が上昇し、その結果として生ずる領域 X の表出を介した VSMC 細胞機能調節も、動脈硬化の病態形成メカニズムの 1 つとして、そしてペプチド Y による病態抑制効果のいち作用点として、機能する可能性が示唆された。

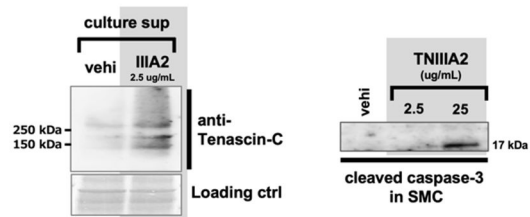


Fig.2 低濃度の peptide X は SMC に TNC 発現の上昇をもたらす一方、高濃度の peptide X は SMC に細胞死を誘導する。

以上の結果から、TNC 分子内領域 X を標的とすることで動脈硬化の病態コントロールが可能であることが示され、本領域が、Mφ および VSMC 各種発現の中心とした各種病態構成細胞の形質発現調節を介して動脈硬化病態調節に中心的に貢献する事が明らかとなった。

TNC は各種慢性炎症性疾患において血中レベルの上昇が認められている。今回 Mφ に対する領域 X の慢性的な暴露が、moderate な ROS レベル上昇作用と炎症性サイトカイン産生およびその活性化の促進作用を示したことから、領域 X による Mφ の機能調節が他の疾患の基盤となる可能性も推察され、今後検討を続ける価値があると考えている

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊豫田拓也, 横山雅シヤラ, 大石麻代, 王雨農, 中川嘉, 深井文雄
2. 発表標題 微小接着環境の変化がもたらす細胞機能調節と 加齢性疾患の進展
3. 学会等名 第一回 東京理科大学ー横浜市立大学 合同シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊豫田拓也, 深井文雄
2. 発表標題 細胞-細胞外マトリックス相互作用に基づく炎症性血管病態の調節
3. 学会等名 第三回 東京理科大学 総合研究院 再生医療とDDSの融合研究部門シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊豫田拓也, 中川嘉, 島野仁, 深井文雄
2. 発表標題 細胞外マトリックスによるマクロファージ機能調節と病態形成
3. 学会等名 第20回 Pharmaco-Hematology シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊豫田拓也, 中川嘉, 島野仁, 深井文雄
2. 発表標題 細胞外マトリックスに起因する貪食細胞機能調節と病態形成
3. 学会等名 第36回 薬学会・九州山口支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マクロファージ泡沫細胞化阻害剤	発明者 伊豫田拓也、深井文雄	権利者 山口東京理科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-097565号	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中川 嘉  (Nakagawa Yoshimi)  (80361351)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授    (12102)	