

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15060

研究課題名(和文) 動脈硬化病態形成機構におけるマクロファージに高発現するMKL1遺伝子の役割

研究課題名(英文) The role of macrophagic MKL1 in the pathogenesis of atherosclerosis

研究代表者

安 健博 (An, Jianbo)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40723771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：樹立したマクロファージ特異的にMKL1遺伝子を高発現するトランスジェニックマウス(MKL1-TgM)を用いて、動脈硬化モデル動物であるApoE欠損マウス(ApoE-KO)と交配して作製したApoE-KO/MKL1-TgMは、動脈硬化病態形成が促進し、動脈硬化巣におけるマクロファージの蓄積がより顕著であることを見出した。MKL1遺伝子による動脈硬化促進の分子メカニズムを解析したところ、ApoE-KO/MKL1-TgM由来のマクロファージは細胞増殖能が亢進しており、一方でアポトーシスが抑制されていた。さらに、MKL1の発現増強は、CDK1遺伝子ファミリーの発現を抑制していることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冠動脈硬化症の成因については、生活習慣の蓄積と同時に、遺伝的背景が発症や進展を左右することが知られており、従って、ゲノム多様性の観点から、冠動脈硬化症の形成機構を分子レベルで解明し、その知見を予防または治療に繋ぐ研究成果を提供することが、社会的にも要請されている。先行研究において、網羅的ゲノム解析から新たな冠動脈疾患関連遺伝子座としてのMKL1遺伝子多型の同定し、本研究課題において、MKL1による動脈硬化症の分子機構を明らかにすることは、とりわけ世界的にも例のない高齢化社会を迎えているわが国において、健康長寿社会を実現するために必要な研究成果である。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that promoter polymorphism of MKL1 is associated with coronary atherosclerosis. However, the contribution of MKL1 to the development of atherosclerosis remains unclear. Macrophages are known to be important mediators of atherosclerosis. In this study, it was found that MKL1 was highly expressed in lesional macrophages in human carotid atherosclerotic plaque. To investigate the role of macrophagic MKL1 in the pathogenesis of atherosclerosis, I generated ApoE null MKL1 transgenic mice (ApoE-KO/MKL1-TgM), in which human MKL1 was specifically overexpressed in monocytes/macrophages. ApoE-KO/MKL1-TgM aggravated atherosclerosis and accumulated prominent lesional macrophages in the aortic sinus. It was also found that MKL1 promoted proliferation of macrophages and mitigated apoptosis both in vitro and in vivo due to downregulation of the expression of CDK1.

研究分野：分子免疫学

キーワード：動脈硬化症 MKL1 マクロファージ 細胞増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、治療技術の進歩及び医薬品や医療機器の普及が循環器疾患による死亡率を改善しているにもかかわらず、その発症率は未だに減少していない。特に、冠動脈疾患(冠動脈硬化症)は多大な医療費を要し、先進国における主要な死因となることから、その克服が医学的・社会的に解決すべき喫緊の課題である。

先行研究では、全ゲノムの網羅的多型解析から新たな冠動脈硬化症関連遺伝子座として Megakaryoblastic Leukemia-1 (MKL1) 遺伝子座を同定し、MKL1 遺伝子の高発現性をもたらすプロモーター多型が冠動脈硬化症と関連することが報告されていた。

動脈硬化の病態モデルとして ApoE 欠損マウス (ApoE-KO) が用いられているが、これまでの共同研究から、ApoE-KO の大動脈で MKL1 遺伝子が高発現していること、MKL1 をさらに欠損した ApoE-KO (dKO) では動脈硬化が改善することを明らかにしている。

一方、ヒト動脈硬化巣病理切片を用いた組織免疫染色によって、新生内膜内に浸潤した活性化マクロファージが MKL1 を高発現することを見出した。このことから、これまで不明な点が残されていた MKL1 の動脈硬化病態形成における役割について、MKL1 の発現亢進によるマクロファージの関与が考えられた。しかしながら、マクロファージに発現する MKL1 がいかなる分子機序で動脈硬化に関わるかについては全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、動脈硬化において重要な役割を持つマクロファージに焦点を当て、遺伝子組換えマウスを用いた個体レベルでの解析と細胞レベルでの解析から、動脈硬化症の発症や進展における MKL1 遺伝子の役割とその分子機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 作製したマクロファージ特異的に MKL1 遺伝子を高発現するトランスジェニックマウス (MKL1-TgM) を用いて、ApoE-KO と交配して樹立した ApoE-KO/MKL1-TgM の大動脈における動脈硬化の進行程度を検討した。また、動脈硬化巣において、組織化学染色及び組織免疫染色を用いて詳細を解析した。

(2) 動脈硬化発症メカニズムとして、ApoE-KO/MKL1-TgM におけるマクロファージの細胞増殖・生存機能に着目し、骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) 及びの動脈硬化巣におけるマクロファージの蓄積量、細胞増殖、細胞死について、フローサイトメトリー及び組織免疫染色を用いて検討した。

(3) BMDMs から RNA を精製し、マイクロアレイ解析によって MKL1-TgM とコントロールマウスの間で網羅的に mRNA の発現量を比較し、マクロファージの MKL1 がいかなる分子的メカニズムで細胞増殖・生存機能を制御するかを検討した。

4. 研究成果

(1) これまでの観察から、ApoE-KO/MKL1-TgM において突然死が生じており、一年生存率がコントロールマウスに比べて明らかに低い。ズダン IV を用いた *en face* staining による解析から、ApoE-KO/MKL1-TgM では、大動脈全体に脂質がより多く蓄積することを見出し、動脈硬化が著しく進行していた (図 1)。さらに、ApoE-KO/MKL1-TgM の大動脈基部に形成した動脈硬化巣におい

て、脂質の沈着に伴い、マクロファージの蓄積がより顕著であった（図2）。

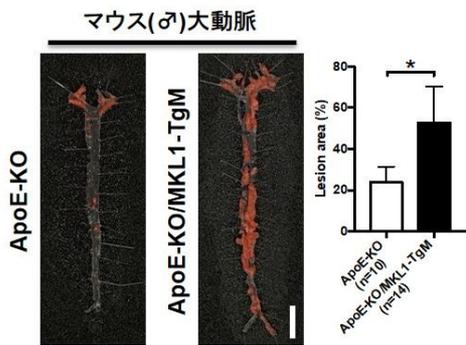


図1 マクロファージ特異的MKL1の高発現は動脈硬化進行を増悪する。

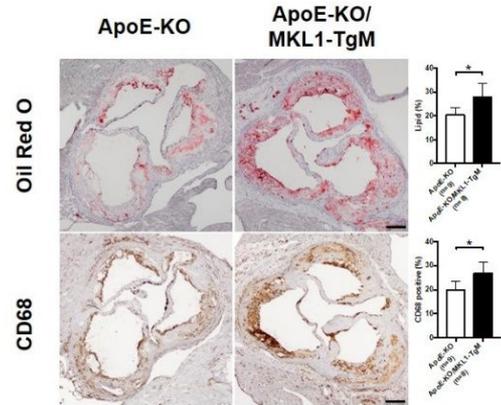


図2 動脈硬化巣における脂質とマクロファージの蓄積程度

(2)BMDMsを用いた *in vitro* 実験では、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 依存性の細胞増殖及びアポトーシスはMKL1の発現によって制御された。具体的に、MKL1-TgM由来のマクロファージでは細胞増殖が亢進しており、アポトーシスが抑制されていた（図3）。一方、ApoE-KO/MKL1-TgMの動脈硬化巣におけるマクロファージに関しても同様な細胞機能変化が観察された。さらに、MKL1によるマクロファージの制御はPI3K/Akt及びMAPK/Erkといった細胞生存・増殖に関わる細胞内シグナル伝達経路の増強と関連することを見出した（図4）。

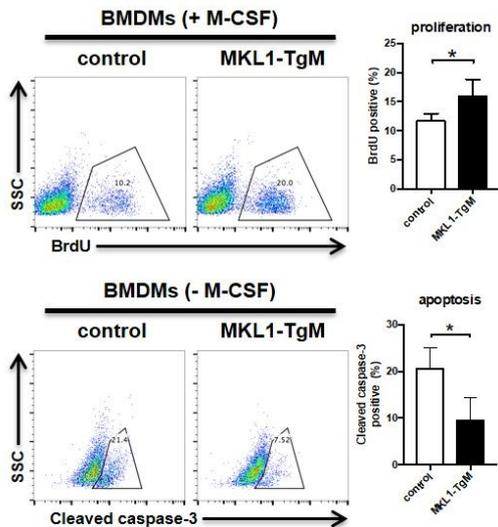


図3 MKL1はマクロファージの細胞増殖及びアポトーシスを制御する。

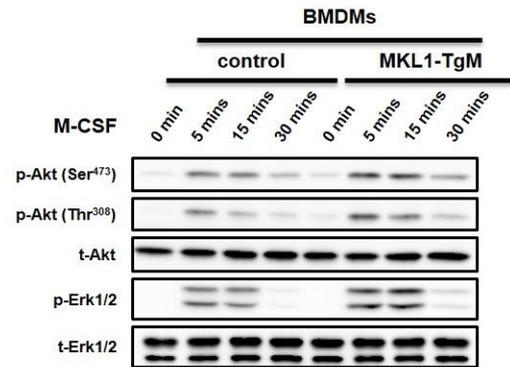


図4 MKL1の発現は、M-CSF刺激によるPI3K/Akt及びMAPK/Erkシグナル伝達経路の活性化を増強する。

(3)MKL1は、Rho-Rockシグナルを介して核移行し、serum response factor (SRF) 転写因子と結合して、様々な遺伝子の発現を制御する co-activator であるため、MKL1-TgMのマクロファージにおける遺伝子発現制御を網羅的に検討した結果、MKL1の発現増強は、冠動脈疾患との関連が最もよく知られているCDK12AとCDK12B遺伝子ファミリーの発現を抑制していることを突き止めた（図5）。

以上の遺伝子組換えマウスを用いた検討と細胞レベルでの解析によって、MKL1遺伝子が動脈硬化進展における危険因子であることを証明し、MKL1遺伝子による新たな動脈硬化発症・進展の分子機序を明らかにした。

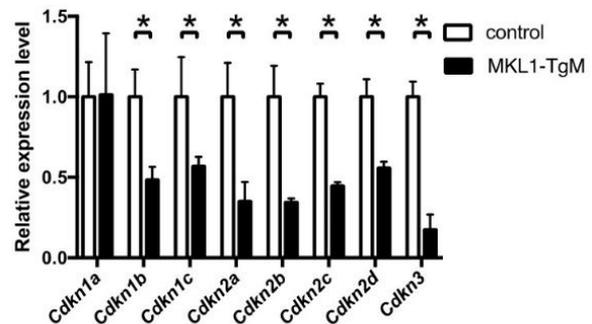


図5 MKL1はCDK1s遺伝子ファミリーの発現を抑制する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 An Jianbo, Naruse Taeko K., Hinohara Kunihiro, Soejima Yurie, Sawabe Motoji, Nakagawa Yasuaki, Kuwahara Koichiro, Kimura Akinori	4. 巻 133
2. 論文標題 MRTF-A regulates proliferation and survival properties of pro-atherogenic macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 26～35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安 健博、成瀬 妙子、日野原 邦彦、副島 友莉恵、沢辺 元司、中川 靖章、桑原 宏一郎、久場 敬司、木村 彰方
2. 発表標題 MRTF-Aはマクロファージ機能を制御して動脈硬化形成に関わる
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jianbo An, Taeko Naruse, Kunihiro Hinohara, Yurie Soejima, Motoji Sawabe, Yasuaki Nakagawa, Koichiro Kuwahara, Keiji Kuba, Akinori Kimura
2. 発表標題 MRTF-A regulates proliferation and survival properties of pro-atherogenic macrophages
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jianbo An, Taeko K Naruse, Akinori Kimura
2. 発表標題 MKL1 Affects Proliferation/Survival Property of Pro-Atherogenic Macrophages
3. 学会等名 Vascular Discovery: From Genes to Medicine 2018 Scientific Session (ATVB/PVD 2018)（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2018年度第1回難治疾患研究所国際研究者海外派遣プログラム報告
<http://www.tmd.ac.jp/mri/guide/program/h30/01.html>

プレスリリース
http://www.tmd.ac.jp/press-release/20190605_1/index.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----