

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08590

研究課題名(和文)リンパ管内皮細胞を基軸とした動脈硬化制御機構の解明：免疫寛容不全の奏功起点を探る

研究課題名(英文) Regulation of atherosclerosis by lymphatic endothelial calpain systems

研究代表者

宮崎 拓郎 (Miyazaki, Takuro)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：80398693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで血管機能を制御する極めてユニークな機構として、ストレス応答性細胞内プロテアーゼ「カルパイン」ファミリーを検証してきた。本研究提案では、カルパインの解析を通して、リンパ管内皮細胞がいかにして動脈硬化症の形成に寄与するか、免疫抑制の解析を中心に分子メカニズムを検討した。その結果、カルパインはリンパ管内皮細胞のTGF- β 1産生に干渉し、循環血中の制御性T細胞を不安定化させる作用を有することが明らかとなった。この機構は、脂質異常症存在下でリゾリン脂質によって顕在化することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一連の結果から、リンパ管内皮細胞のカルパインシステムは、脂質異常症存在下のリンパ管の形態維持だけでなく、制御性T細胞の安定性や動態にも影響することが判明した。既報から、脂質異常症においてリンパ管がリポタンパク質や免疫細胞の輸送経路として重要であることは明らかとなっていたが、直接的な免疫細胞の制御に関わっていることは本研究において初めて解明された。本研究は、動脈硬化症の発症原因の包括的な理解に資するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated whether the calpain systems in lymphatic endothelial cells (LECs) associate with the LEC-lymphocyte interaction under hypercholesterolemia. Lipidomic analysis in hypercholesterolemic mice showed that several lysophospholipids, including lysophosphatidic acid (LPA), accumulated in the lymphatic environment. LPA enables the potentiation of calpain systems in cultured LECs, which limits their ability to stabilize regulatory T cells (Treg) without altering other T cell subsets. Targeting calpain systems in LECs expanded Tregs in the blood circulation under hypercholesterolemia, concomitant with the redistribution of Tregs in lymphoid organs. Moreover, LPA-induced calpain overactivation potentiated the IL-18/NF- κ B/VCAM1 axis in LECs, thereby inhibiting lymphocyte mobility on the cells. Thus, calpain systems in LECs have a key role in controlling Treg stability and trafficking under hypercholesterolemia.

研究分野：血管生物学 循環器内科 内分泌代謝 栄養学 病態生化学

キーワード：カルパイン リンパ管内皮細胞 タンパク質分解 制御性T細胞 動脈硬化症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脂質異常症・動脈硬化症に起因する虚血性心疾患の一次予防はスタチンの登場により著しい進歩を遂げたが、それでもなお脳卒中・心血管疾患は本邦の死因の25%以上を占め(平成27年厚生労働省人口動態統計)、スタチンと併用可能な革新的な治療戦略の開発が喫緊の課題とされる。近年、大血管の周囲に走行する微小リンパ管がコレステロール逆転送の主要な経路となることが解明され、動脈硬化症の新たな切り口として脚光を浴びている(Martel *et al.*, *J Clin Invest.*, 2013; Vuorio *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2014)。コレステロール逆転送系は、HDLを介して末梢組織で余剰となったコレステロール分子を肝臓へ運搬・排泄するシステムであり、動脈硬化モデルマウスにおいて人為的にリンパ管の形成不全を惹起すると病態が増悪化する。しかしながら、脂質異常症存在下でリンパ管自体にいかなる病態生理学的な変化が引き起こされるか解明されておらず、想定される免疫システムの機能不全も検討されていない。

近年、オートファジーおよびプロテアソーム系に代表されるタンパク質分解系の制御不全が、異常タンパク質の蓄積を介して動脈硬化症を増悪化するとの新規概念が提唱されている。細胞内タンパク質恒常性の低下は死細胞の集積、ならびに線維化などの組織変性を引き起こす(Mizushima *et al.*, *Cell*, 2011; Jaisson *et al.*, *Diabetologia*, 2014; Miyazaki T *et al.*, *Cell Mol Life Sci.*, 2017)。申請者は、タンパク質分解系の中でも極めてユニークな細胞内制御性プロテアーゼ「カルパイン」ファミリーを検証してきた(Miyazaki T *et al.*, *Circulation*, 2011; *Circ Res.*, 2015; *J Clin Invest.*, 2016)。カルパインファミリーは哺乳類で15のホモログを有するストレス応答性のタンパク質プロセッシング機構で、主にタンパク質の翻訳後修飾を介して細胞形質を制御する。従来型に分類されるカルパイン-1、-2は血管内皮細胞に発現しており、申請者らの過去の検討から、その機能が過剰になると動脈硬化性の血管透過性亢進ならびに網膜症および腫瘍血管などの病的血管新生に関与することが明らかとなった。これらの知見はカルパインシステムが内皮細胞の病態生理学的制御に極めて重要であることを示す。

2. 研究の目的

脂質異常症に伴うリンパ管内皮細胞のタンパク質恒常性低下が免疫抑制ならびに動脈硬化症におよぼす影響を探る。

3. 研究の方法

(1) リンパ管内皮カルパインシステムの意義

Ldlr欠損背景のコントロールマウスに12週間高脂肪食を負荷し、動脈硬化症を惹起する。同様の検討をリンパ管内皮特異的カルパスタチンTgマウス(従来型カルパインを下方制御)およびリンパ管内皮特異的カルパインS1欠損マウス(全ての従来型カルパインを消去)でも行う。通常食・高脂肪食を負荷したLdlr欠損マウスのリンパ節において、FACSによりgp36+CD31+リンパ管内皮細胞を検出し、カルパイン・カルパスタチン発現を検討すると同時に、同細胞におけるTGF- β 発現も評価する。免疫組織化学的解析により大動脈起始部および腹部大動脈周囲のGp36+リンパ管の密度、形態を検討する。さらに、大動脈においてOil-red染色により動脈硬化病変のサイズを定量するとともに、病変内のマクロファージ/平滑筋細胞の分布、死細胞コアのサイズ、コラーゲン蓄積を組織学的に検討する。病変からtotal RNAを抽出し各種細胞マーカー(T細胞系、好中球系、マスト細胞、マクロファージサブセット)、サイトカイン・ケモカイン、細胞外マトリクスなどをqPCRで定量する。

(2) カルパインシステムと免疫抑制不全

ナイーブT細胞を体外から導入した場合の制御性T細胞への変換がリンパ管内皮機能に依存するか検討するとともに、リンパ管内皮機能と内因性TGF- β の関連性を検討する。上記マウスで制御性T細胞の体内分布(リンパ節、血管など)およびAnnexin V染色により同細胞のviabilityをFACSで評価する。リンパ節における樹状細胞も併せて検討する。野生型マウス脾臓からナイーブT細胞を単離し、蛍光(CFDA)ラベル後に動脈硬化モデルマウス(コントロール、リンパ管内皮特異的カルパスタチンTgマウス、リンパ管内皮特異的カルパインS1欠損マウス)の静脈内に導入する。1-3日後のCFDA陽性細胞における制御性T細胞存在比(末梢血、リンパ節)を検討する。通常食および高脂肪食群間の比較も行う。

(3) 血中TGF- β の意義

モデルマウスにTGF- β 受容体阻害剤を投与し、動脈硬化病変および制御性T細胞を解析する。Oil-red染色により動脈硬化病変のサイズを定量する。また、組織学的解析により病変内コラーゲン蓄積を定量し、細胞外マトリクスをqPCRで網羅的に発現解析する。FACSを用いて、制御性T細胞の体内分布(末梢血、動脈硬化病変、リンパ節)ならびにAnnexin V染色により同細胞のviabilityを評価する。

(4) カルパイン基質の同定

脂質異常症マウスリンパ節において DNA アレイを行い、環境中に優位なメディエーターを検出する。培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞またはマウスリンパ管内皮細胞 (SVEC4-10) に上記メディエーターを負荷し、siRNA によるカルパインノックダウンにより TGF- β 、ID01 および PD-L1 など制御性 T 細胞関連分子の発現に変化を来すか網羅的に検討する。上流に位置する制御因子について、in silico でカルパイン感受性を予測し、有望な基質候補については western blot で安定性を検討する。

(5) 制御性 T 細胞分化と表現型

リンパ管内皮細胞がナイーブ T 細胞を制御性 T 細胞に分化誘導するか共培養系で検討する。また、培地中の TGF- β を ELISA 法で定量し、TGF- β 1 誘導性とリンパ管内皮誘導性の制御性 T 細胞間で遺伝子プロファイルが異なるか、次世代シーケンスで評価する。

4. 研究成果

高コレステロール食を負荷した Ldlr 欠損マウスの血液、リンパ節、リンパ液にてリピドミクス解析を行い、リン脂質を網羅解析したところ、リンパ環境にてリゾホスファチジン酸を含むリン脂質の増加が認められた。リゾホスファチジン酸は培養リンパ管内皮細胞のカルパイン活性を増強することが可能であり、このカルパイン活性化により共培養した際の制御性 T 細胞の安定性が低下することが判明した。次世代シーケンスにて制御性 T 細胞の発現プロファイルを検討したが、リンパ管内皮細胞側のカルパイン発現は制御性 T 細胞の質に影響を及ぼさず、安定性にも影響していることを確認している。この現象は、カルパインによる MEKK1 のタンパク質分解と、これに引き続くリンパ管内皮細胞における TGF- β 1 産生の低下に起因するものと考えられる。Lyve1 プロモーターを用いてマウスリンパ管内皮細胞と造血系細胞のカルパインを下方制御したところ、血中に存在する制御性 T 細胞の割合が増加した。このような制御性 T 細胞の増加は、マウスに TGF- β type-I 受容体阻害剤である LY-364947 を投与することでキャンセルされた。さらに、制御性 T 細胞の安定性に対する骨髄由来細胞の関与を検討する目的で、コンディショナルマウスの造血幹細胞をレシピエントマウスに移植する骨髄移植モデルを検討した。その結果、少なくとも制御性 T 細胞の安定性低下や全身の TGF- β 1 産生低下に造血系細胞の寄与は認められなかった。

さらに、培養リンパ管内皮細胞にて検討を続けたところ、リゾホスファチジン酸による LPA 活性化はリンパ管内皮細胞の IL-18/NF- κ B/VCAM1 分子軸を賦活し、同細胞表面におけるリンパ球の可動性を低下させることが判明した。マウスにおける検討にて、足蹠から腋窩リンパ節へのリンパ球の移動は、脂質異常症の発症で低下したが、これはリンパ管内皮細胞/造血系細胞特異的なカルパイン下方制御、ならびに VCAM1 中和抗体の投与によりキャンセルされた。したがって、脂質異常症においてリンパ管内皮細胞のカルパインシステムは、血液中の制御性 T 細胞の安定性と、そのリンパ管内交通に寄与することが明らかとなった。

上記のような制御性 T 細胞の制御が動脈硬化症の発症に如何なる影響をおよぼすか、大動脈における動脈硬化病変を解析した。その結果、Lyve1 プロモーターを用いたカルパインの下方制御により、大動脈の動脈硬化病変が縮小することが判明した。一方で、脂質異常症は改善されていなかった。動脈硬化病変においては TGF- β 1 および IL-10 の発現が増加しており、iNOS を発現する M1 マクロファージの低下も認められ、これらは制御性 T 細胞が優位になった結果と考えられる。一方で、骨髄キメラ実験において、上記の動脈硬化に関する表現形についても、造血系細胞の寄与は認められなかった。したがって、動脈硬化症の発症に関してもリンパ管内皮細胞の制御が関与するものと考えられる。

さらに、リンパ節の形態についても検討を行った。脂質異常症の際に認められるリンパ洞の過形成は、Lyve1 プロモーターを用いたカルパインの下方制御により抑制されることが明らかとなった。培養リンパ管内皮細胞において、リゾホスファチジン酸によるリンパ管新生様の脈管形成は、siRNA によるカルパインの下方制御により抑制された。したがって、リンパ管内皮カルパインシステムはリンパ管の形態制御にも関与するものと考えられる。

一連の結果から、リンパ管内皮細胞のカルパインシステムは、脂質異常症存在下のリンパ管の形態維持だけでなく、制御性 T 細胞の安定性にも影響することが判明した。リンパ経路は腸管から脂質が吸収される際の経路でもあり、脂質バランスの影響を特に受けやすいと考えられる。リンパ環境の脂質バランスをモニターすることで、全身の免疫機能を推定できる可能性もある。カルパインは高血糖条件でも活性化すると考えられており、今後リンパ管カルパインが糖尿病下でどのような役割を担うのか検討する価値があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takuro Miyazaki, Risako Akasu, Akira Miyazaki	4. 巻 40
2. 論文標題 Calpain proteolytic systems counteract endothelial cell adaptation to inflammatory environments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00114-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Lin Gao, Xiao-Feng Lei, Aya Miyauchi, Masahito Noguchi, Tomokatsu Omoto, Shogo Haraguchi, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki, Joo-Ri Kim-Kaneyama	4. 巻 10
2. 論文標題 Hic-5 is required for activation of pancreatic stellate cells and development of pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76095-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takuro Miyazaki, Risako Akasu, Akira Miyazaki	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Calpain-Associated Proteolytic Regulation of the Stromal Microenvironment in Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Design	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1381612827666210311143053.	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 -
1. 著者名 Miyazaki T, Haraguchi S, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Endothelial calpain systems orchestrate myofibroblast differentiation during wound healing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 2037-2046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800588RR	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 -

1. 著者名 Han G, Yang H, Wang Y, Haraguchi S, Miyazaki T, Bungo T, Tashiro K, Furuse M, Chowdhury VS.	4. 巻 32
2. 論文標題 L-Leucine increases the daily body temperature and affords thermotolerance in broiler chicks.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian-Australas J Anim Sci.	6. 最初と最後の頁 842-848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5713/ajas.18.0677	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 -

1. 著者名 Shibata K, Hashimoto T, Miyazaki T, Miyazaki A, Nobe K.	4. 巻 25
2. 論文標題 Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke: Past and Future.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Pharm Des.	6. 最初と最後の頁 242-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1381612825666190319115018	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 -

1. 著者名 Obama T, Miyazaki T, Aiuchi T, Miyazaki A, Itabe H.	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Evaluation of Protein-Protein Interactions using an On-Membrane Digestion Technique.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vis Exp.	6. 最初と最後の頁 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59733	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 -

1. 著者名 Haraguchi S, Kamata M, Tokita T, Tashiro KI, Sato M, Nozaki M, Okamoto-Katsuyama M, Shimizu I, Han G, Chowdhury VS, Lei XF, Miyazaki T, Kim-Kaneyama JR, Nakamachi T, Matsuda K, Ohtaki H, Tokumoto T, Tachibana T, Miyazaki A, Tsutsui K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Light-at-night exposure affects brain development through pineal allopregnanolone-dependent mechanisms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Elife.	6. 最初と最後の頁 e45306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.45306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyauchi A, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Chang SH, Saito T, Haraguchi S, Miyazaki T, Miyazaki A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Alleviation of murine osteoarthritis by deletion of the focal adhesion mechanosensitive adapter, Hic-5.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52301-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurotaki Y, Sakai N, Miyazaki T, Hosonuma M, Sato Y, Karakawa A, Chatani M, Myers M, Suzawa T, Negishi-Koga T, Kamijo R, Miyazaki A, Maruoka Y, Takami M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of lipid metabolism on mouse incisor dentinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61978-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki T, Akasu R, Miyazaki A.	4. 巻 40
2. 論文標題 Calpain proteolytic systems counteract endothelial cell adaptation to inflammatory environments.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00114-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takuro Miyazaki
2. 発表標題 Defective exon junction complex disturbs cholesterol handling in macrophages thereby exacerbating atherosclerosis
3. 学会等名 Splicing2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤須 里沙子、宮崎 拓郎、富塚 祐希、宮崎 章
2. 発表標題 カルパインによる血管内皮細胞機能異常が耐糖能におよぼす影響
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎 拓郎
2. 発表標題 しなやかな血管を手に入れる
3. 学会等名 平成31年健康大学第1回教養講座（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 拓郎
2. 発表標題 リンパ管のタンパク質恒常性低下を起点としたあらたな動脈硬化性血管炎の制御機構
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会 シンポジウム2：炎症病としてのCardiovascular Diseases（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyazaki T
2. 発表標題 Emerging roles of calpain-6 in macrophage cholesterol handling and atherogenesis. FASEB SRC The biology of Calpains in Health and Disease.
3. 学会等名 FASEB SRC The biology of Calpains in Health and Disease. Session title「CALPAIN IN DIABETES AND ATHEROSCLEROSIS」（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 拓郎
2. 発表標題 リンパ管のタンパク質恒常性低下を起点としたあらたな動脈硬化性血管炎の制御機構
3. 学会等名 第40回 日本炎症・再生医学会 シンポジウム2 炎症病としてのCardiovascular diseases (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 拓郎、原口 省吾、森戸 大介、金山 朱里、宮崎 章
2. 発表標題 リンパ管内皮細胞を起点とした動脈硬化症の発症機構
3. 学会等名 第51回 日本動脈硬化学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎拓郎、原口省吾、金山朱里、宮崎章
2. 発表標題 脂質異常症に起因するリンパ管内皮細胞のタンパク質恒常性低下は動脈硬化症を増悪化する
3. 学会等名 第61回 日本脂質生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤須里沙子、宮崎拓郎、冨塚祐希、宮崎章
2. 発表標題 血管内皮カルパインが耐糖能異常におよぼす影響
3. 学会等名 CVMW2019 心血管代謝週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富塚祐希 宮崎拓郎 赤須里沙子 宮崎章
2. 発表標題 血管内皮カルパインが肥満誘発性耐糖能異常におよぼす影響
3. 学会等名 2019年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Research map_Takuro Miyazaki https://researchmap.jp/miyazakitakuro/?lang=japanese 昭和大学医学部生化学講座ホームページ http://www10.showa-u.ac.jp/~biochem/Takuro_Miyazaki/Takuro_Miyazaki.html Researchmap 宮崎拓郎 https://researchmap.jp/miyazakitakuro/presentations Researchgate Takuro Miyazaki https://www.researchgate.net/profile/Takuro_Miyazaki2/
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------