

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08429

研究課題名(和文) 動脈硬化の革新的治療薬開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of cell death in macrophages and foam cells

研究代表者

高江洲 義一 (TAKAESU, Giichi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：60403995

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)：動脈硬化の中で最も多い「粥状動脈硬化」の進展・発症には、マクロファージによる酸化LDLの貪食とそれに伴う泡沫化が深く関わっている。泡沫細胞はアポトーシスまたはネクローシスを起こすが、前者は保護的に働き、後者は病態の増悪化に働くと考えられている。したがって、マクロファージ/泡沫細胞の細胞死制御機構を解明することにより、動脈硬化性疾患の新たな治療法開発に繋がると期待される。本研究では、マクロファージ/泡沫細胞の細胞死制御におけるアダプタータンパク質TAB2の役割解明に取り組み、泡沫細胞およびLPS刺激したマクロファージにおけるネクローシスの抑制にTAB2が必須の役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are the major immune cells in the atherosclerotic lesions and play important roles in disease progression. Macrophages uptake oxidized low density lipoproteins (oxLDL) and differentiate into foam cells. Foam cells eventually undergo apoptosis or necroptosis. The former is thought to be protective, but the latter is thought to be detrimental. To develop new therapeutics for atherosclerosis, it is necessary to understand the molecular mechanisms of programmed cell death in macrophages and foam cells. In this study, I have investigated the roles of TAB2 and its close homolog TAB3 in macrophages and foam cells. Tab2/3-deficient foam cells underwent necrosis. In addition, TAB2, but not TAB3, was essential for suppression of TNF-induced necroptosis, which was responsible for the inflammasome activation in LPS-primed Tab2-deficient macrophages. These findings will help to develop novel strategies to treat atherosclerosis and other inflammatory diseases.

研究分野：自然免疫

キーワード：マクロファージ 細胞死 炎症

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患(心疾患と脳血管疾患)は、日本人の死因の約4分の1を占め、トップのがん(28.7%)に次ぐ多さである。世界的には、先進国における死因の約半分が動脈硬化性疾患であり、2025年までには発展途上国においても本疾患が死因の第一位になると予想されている。動脈硬化が進行して心筋梗塞や脳梗塞が起こると高い確率で死亡するほか、たとえ死に至らなくとも重篤な後遺症が残る場合が多い。したがって、動脈硬化がもたらす社会的損失は極めて甚大であり、その治療法開発は人類共通の重要課題である。現在、動脈硬化を治すには、食事や運動などの生活習慣の改善や、必要な場合は薬を用いて、血中のコレステロールと中性脂肪を減らすのが有効とされている。もし、プラークそのものを縮小させる薬があれば動脈硬化の特効薬として人類の健康増進に大きく寄与すると期待されるが、そのような薬は未だ存在しない。

動脈硬化の中で最も多いのが脂質代謝異常によって起こる「粥状動脈硬化」で、そのプラーク形成にはマクロファージ(M ϕ)による酸化LDL(oxLDL)の貪食とそれに伴う泡沫化が深く関わっている。グラム陰性菌の細胞壁成分LPSの受容体として有名なTLR4は、M ϕ によるoxLDLの貪食にも関与する(Choi et al., *Circ. Res.*, 2009)。oxLDLの貪食はM ϕ /泡沫細胞のアポトーシスを誘導するが、通常、泡沫細胞は核内受容体を介してapoptosis inhibitor of macrophage(AIM)を発現し、AIMタンパク質を産生することでアポトーシスに耐性となっており、これがプラークの成長・増大の大きな要因と考えられている(Arai et al., *Cell Metab.*, 2005)。したがって、泡沫細胞のアポトーシスを誘導すれば、プラークの縮小・除去に繋がると期待されるが、その制御機構には未だ不明な点が多い。

申請者はこれまでに、IL-1 β 、TNF- α 、およびLPSシグナル伝達経路において、MAPKKKファミリーキナーゼTAK1の活性制御に関与するアダプター分子TAB2とそのホモログTAB3(以下、両分子を”TAB2/3”と表す)を同定し、これらの作用機序を解明した(Takaesu et al., *Mol. Cell*, 2001など)。最近では、LPS刺激で活性化したM ϕ のアポトーシス抑制にTAB2が必須の役割を果たすことを報告した(Mihaly et al., *PLOS ONE*, 2014)。TLR4およびその下流で働く因子(MyD88, IRAK4など)は、いずれも動脈硬化の増悪に働くことが報告されている(Sheedy et al., *Nat. Immunol.*, 2013; Michelsen et al., *PNAS*, 2004; Kim et al., *J. Immunol.*, 2011)。また、興味深いことに、冠動脈疾患を持つ患者の末梢血ではTAB2 mRNAの量が健常者に比べて有意に上昇しているとの報告がある(Grayson et al., *Genes & Immunol.*, 2011)。

2. 研究の目的

本研究目的は、泡沫細胞の細胞死制御におけるTAB2/3の役割を解明するとともに、M ϕ におけるTAB2/3の機能阻害がもたらす副作用の可能性について検証し、炎症性疾患の新たな予防法や治療法の開発に資することである。

3. 研究の方法

培地:RPMI1640培地(SIGMA, R8758)に次のものを加えてマクロファージ分化誘導培地(L929-conditioned medium, LCM)とした。L929細胞培養上清(30% v/v)、ウシ胎児血清(10% v/v)、ペニシリン・ストレプトマイシン。細菌感染実験では、抗生剤不含DMEM(SIGMA, D5796)を用いた。

食食細胞特異的TAB2欠損(*Tab2-mK0*)マウスおよびTAB3欠損(*Tab3-/-*)マウスの作製:*LysM-Cre*トランスジェニックマウスと*Tab2-flox*マウスを交配させることにより、*LysM-Cre Tab2-flox/flox*マウスを得、これを*Tab2-mK0*マウスとして実験に用いた。ヘテロコントロールとして*LysM-Cre Tab2-flox/+*マウスを用いた。また、*Tab3-/-*マウスとの交配により、*LysM-Cre Tab2-flox/flox Tab3-/-*のTAB2/3二重欠損(*Tab2/3-DK0*)マウスを作出し、実験に供した。

骨髄由来マクロファージ(BMDM)の調製:6-13週齢マウスの脛骨及び大腿骨から骨髄細胞を採取し、LCM培地で6~7日間培養することでBMDMを得た。

細胞生存率の判定:細胞を4%パラホルムアルデヒド/PBS(-)で固定した後、0.1%クリスタルバイオレット(CV)で染色し、0.1Mクエン酸ナトリウム/50%エタノール溶液でCVを抽出した。CV抽出液の吸光度(波長595nm)を測定し、細胞生存率を求めた。また、CellTiter-Gloキット(プロメガ社)およびLDHアッセイキット(Dojindo社)を用いて細胞生存率を求めた。

サイトカイン濃度の測定:マウス用ELISAキットを用いて、培養上清中およびマウス血清中のIL-1 β (eBioscience社)、TNF- α 、IL-6(BioLegend社)の濃度を測定した。

4. 研究成果

まず、泡沫細胞の細胞死制御へのTAB2/3の関与を明らかにするため、*Tab2/3-DK0*マウスより調製したBMDMにoxLDLを添加し、細胞生存率をCV染色で調べた。その結果、*Tab2/3-DK0* BMDMはoxLDL刺激によって生存率が野生型BMDMに比べて有意に低下することが明らかとなった(図1A)。そこで、oxLDL添加前にNecrostatin-1を加えたところ、oxLDLによる生存率の低下が完全に抑えられた(図1B)。したがって、*Tab2/3-DK0* BMDMはoxLDL刺激によりネクロプトーシスを起こすことが示唆された。これまでに研究代表者らは、*Tab2-mK0* BMDMがTNF- α 刺激によってネクロプトーシスを起こすことを報告している。そこで、oxLDL

によって誘導されるネクロプトーシスが自己分泌 TNF- α の作用によるものである可能性を考え、oxLDL 刺激で TNF- α の産生が誘導されているかどうかを ELISA 法で調べたところ、TNF- α の産生は全く認められなかった(図 1 C)。しかし興味深いことに、コントロールとして用いた LPS 刺激に応答して、Tab2/3-DKO BMDM から IL-1 β が産生されることを見出した(図 1 D)。通常、BMDM からの IL-1 β の産生には LPS 刺激に加えて、細胞外 ATP などの刺激によるインフラマソームの活性化が必要である。Tab2/3-DKO BMDM は LPS 刺激単独で IL-1 β を産生することから、TAB2, TAB3 の両方またはどちらか一方が、インフラマソームの活性化を負に制御することが示唆される。oxLDL によるマクロファージの活性化にも TLR4 が関与することから、LPS に対する細胞応答の解明は泡沫細胞の細胞死制御の理解に資すると考え、以後の研究では、LPS 刺激による IL-1 β 産生制御における TAB2/3 の役割に焦点を絞って解析を進めた。

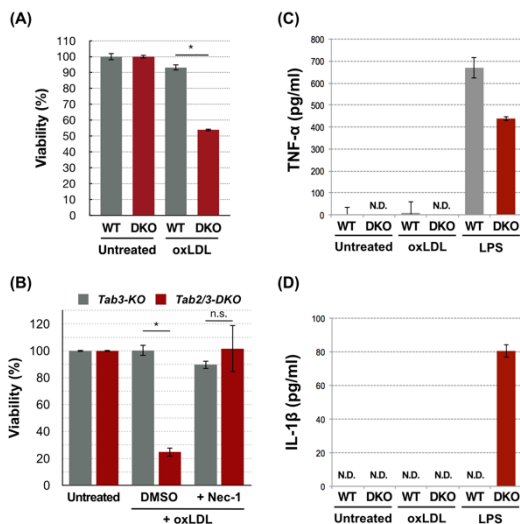


図 1 泡沫細胞の細胞死制御における TAB2/3 の役割。野生型(WT)または TAB2/3 二重欠損(DKO) BMDM を oxLDL (100 μ g/ml) で 48 時間刺激し、CV 染色(A, B) および ELISA (C, D) を行った。(N. D. =非検出)

IL-1 β 産生制御における TAB2/3 の役割を明らかにするため、Tab2-mKO, Tab3-KO, Tab2/3-DKO BMDM を用いて実験を行った。その結果、LPS 刺激によって誘導される細胞死および IL-1 β 産生亢進には TAB3 ではなく TAB2 が関与していることが明らかとなった(図 2 A)。LPS 刺激に応答した Tab2-mKO BMDM が IL-1 β 以外のサイトカインも同様に高産生するのについて、TNF- α と IL-6 の ELISA で検証した結果、これらのサイトカインの産生量はむしろ Tab2-mKO BMDM の方が少ないことが明らかとなった(図 2 B)。さらに、IL-1 β の産生亢進が mRNA レベルの変化によるものかを明らかにするため、qPCR 法を用いて調べたところ、WT と Tab2-mKO BMDM で差は認められなかった(図 2 C)。以上の結果から、BMDM において、TAB2 は IL-1 β 特異的に産生を抑制する働きを

しており、その作用点は NF- κ B の活性化以降、すなわちインフラマソームのレベルである可能性が示唆された。

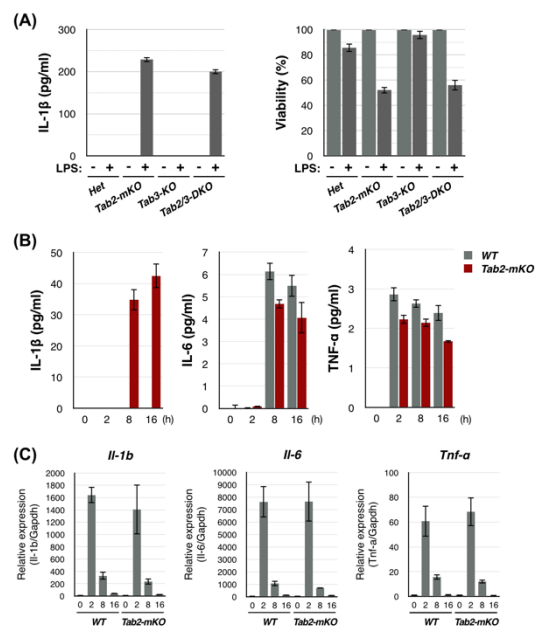


図 2 LPS 単独刺激による IL-1 β 産生制御における TAB2/3 の役割。図に示す遺伝子型の BMDM を LPS (100 ng/ml) で刺激し、ELISA (A, B)、CV 染色 (A)、qPCR (C) で解析した。

そこで、TAB2 が LPS 刺激によるインフラマソームの活性化を抑制するのかわ、ウェスタンブロットで調べた。その結果、野生型 BMDM においては LPS 刺激単独での pro-IL-1 β のプロセッシングおよび Caspase-1 の活性化はほとんど認められなかったが、Tab2-mKO BMDM では LPS 刺激後に pro-IL-1 β のプロセッシングと Caspase-1 活性化が強く起こることが明らかとなった(図 3)。

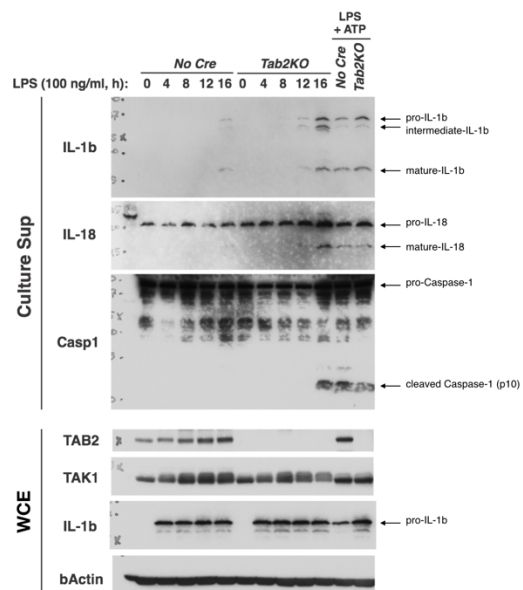


図 3 LPS 単独刺激による IL-1 β 産生制御における TAB2 の役割。野生型(No Cre)または TAB2 欠損(Tab2KO) BMDM を図に示したように LPS で刺激し、培養上清(Culture Sup)および細胞抽出液(WCE)をウェスタンブロットで解析した。

Tab2-mKO BMDM における IL-1 β の産生亢進がインフラマソームに依存するかどうかを明らかにするため、Caspase-1 との二重欠損マウス (Tab2/Casp1-DKO) および NLRP3 との二重 (Tab2/Nlrp3-DKO) を作出し、これらより調製した BMDM を用いて、IL-1 β の産生と細胞生存率を調べた。その結果、Tab2-mKO BMDM の LPS 刺激によって誘導される IL-1 β の産生亢進は NLRP3 および Caspase-1 に依存するが、細胞死はこのどちらにも依存しないことが分かった (図 4)。

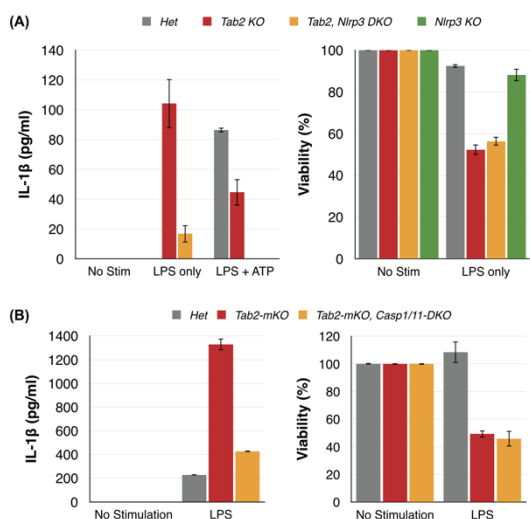


図 4 LPS 単独刺激による IL-1 β 産生制御における TAB2 の役割。図示した遺伝子型の BMDM を LPS (100 ng/ml) で刺激し、ELISA および CV 染色で解析した。

最後に、Tab2-mKO BMDM における IL-1 β の産生亢進の原因が、自己分泌 TNF- α によるネクロプトーシスを介したインフラマソームの活性化であるとの仮説を立て、Necrostatin-1 および抗 TNF- α 中和抗体を用いて検証した。その結果、Tab2-mKO BMDM の LPS 刺激によって誘導される IL-1 β の産生亢進は、Necrostatin-1 と抗 TNF- α 中和抗体のいずれによっても抑制された (図 5)。

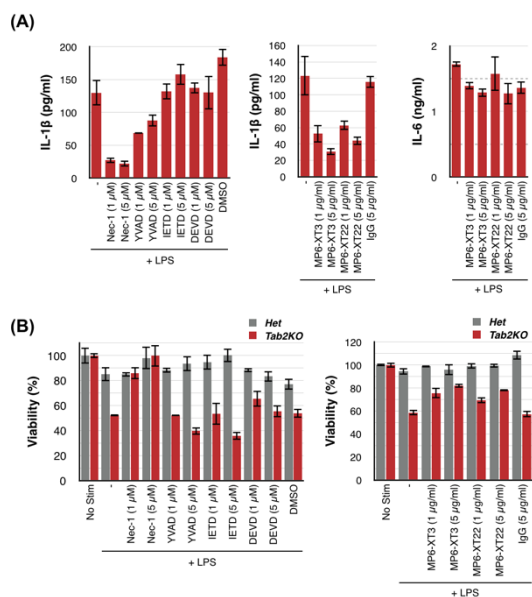


図 5 LPS 単独刺激による IL-1 β 産生制御における TAB2 の役割。(A) 図示した阻害剤または中和抗体の存在下で Tab2 欠損 BMDM に LPS 刺激を与え、培養上清を ELISA 方で解析した。(B) A と同様に野生型 (Het) または Tab2 欠損 (Tab2KO) BMDM を LPS で刺激し、CV 染色を行った。

以上のことから、BMDM においても TAB2 は TNF- α によるネクロプトーシスを抑制するのに必須の役割を果たしており、これが破綻すると、おそらく danger-associated molecular pattern (DAMP) を介した NLRP3 インフラマソームの活性化が起こり、IL-1 β の異常産生に繋がると考えられる。今後は、TNF- α によるネクロプトーシスを TAB2 がどのように抑制するのかを具体的に明らかにすることが必要である。本研究で得られた知見は、動脈硬化や痛風などさまざまな慢性炎症疾患の新規治療法の開発に役立つと期待される。

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)

[学会発表] (計 2 件)

高江洲義一、松崎吾朗、鈴木敏彦「TAB2 はマクロファージの細胞死と IL-1 β の産生を負に制御する」第 27 回日本生体防御学会学術集会、2016 年 7 月、福岡市

高江洲義一、仲宗根昇、トーマ・クラウディア、比嘉直美、鈴木敏彦「TAK1-binding protein 2 (TAB2) negatively regulate the processing of pro-interleukin-1 β 」第 44 回日本免疫学会学術集会、2015 年 12 月、札幌市

[その他]

ホームページ等

<http://www.tbc.u-ryukyu.ac.jp/> 分子感染防御学分野

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高江洲 義一 (TAKAESU, Giichi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授
研究者番号：60403995

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし