

平成30年 5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08914

研究課題名(和文) 加齢に伴う動脈硬化形成におけるマクロファージのCYLDの機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of macrophage CYLD in age-related atherogenesis

研究代表者

鷹見 洋一 (Takami, Yoichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90621756

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)：血管内皮細胞(EC)及びマクロファージ(M<sub>φ</sub>)は動脈硬化形成初期において重要な役割を担う。CYLDは炎症性刺激によりこれらの細胞で発現上昇を認めた。ECでCYLDをノックダウンすると、炎症性分子及び接着分子の発現が増加し、単球の接着増加を認めた。また、M<sub>φ</sub>でCYLDをノックダウンすると炎症性分子の発現上昇とともに泡沫化が促進し、スカベンジャーレセプター、脂質シャペロン分子、脂質合成分子が増加し、脂質排出に関わる分子が減少していた。更に、継代を繰り返す、細胞老化を誘導したECや高齢マウスのM<sub>φ</sub>ではCYLDの発現が低下していることが分かった。CYLDは加齢性動脈硬化発症の予防や治療標的分子になり得る。

研究成果の概要(英文)：Endothelial cells (EC) and macrophages (M<sub>φ</sub>) play pivotal roles in the early stage of atherogenesis. Inflammatory stimuli induced CYLD expression in these cells. Knockdown of CYLD in EC induced the expression of inflammatory and adhesion molecules, followed by increased monocytes adhesion. Knockdown of CYLD in M<sub>φ</sub> induced the expression of inflammatory as well as foam cell formation along with increased expression of scavenger receptors, lipid chaperones and lipid synthase and decreased expression of lipid efflux-related molecule. Intriguingly, CYLD expression was significantly reduced in EC which met replicative senescence and bone marrow-derived M<sub>φ</sub> harvested from aged mice. CYLD in the vasculature could be a novel therapeutic target molecule, especially in the early preventive intervention against the initiation of age-related atherogenesis.

研究分野：血管生物学

キーワード：CYLD 脱ユビキチン化酵素 動脈硬化 老化 マクロファージ 血管内皮 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢社会を迎え、健康寿命の延伸に寄与する医学研究の推進は益々需要が増している。特に老化に伴う慢性炎症が多大に関与するメタボリック症候群及びその予後を規定する心血管合併症の病態生理を分子レベルで解明し、それに基づき病態を的確に反映する新規バイオマーカーや創薬を開発することは社会的にも急務である。我々は独自に開発した遺伝子機能スクリーニング法を用いて見出した血管に内在する脱ユビキチン化酵素 (DUB) である UCHL1、CYLD が炎症の制御分子となり得ることを初めて報告した (Takami Y, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 & *Am J Pathol.* 2008)。これらの研究ではバルーン障害による血管リモデリングの急性変化に対し、DUB の発現が上昇し、炎症の中心的役割を担う NF- $\kappa$ B 活性を制御する内在性の“ブレーキ”としても作用することを明らかにした。

CYLD は家族性円柱腫症の原因遺伝子として同定されたユビキタスに発現する DUB であり、NF $\kappa$ B のシグナル伝達に関与するアダプター分子である TRAF2 や TRAF6 や IKK の調節サブユニットである NEMO を脱ユビキチン化し、活性を抑制することが知られている (Lakhani S, et al. *N Engl J Med.* 2004)。病態との関連では炎症性物質投与による大腸腫瘍の形成 (Zang. Jun, et al. *J Clin Invest.* 2006) や M $\phi$  において RANK-RANKL 系を介し、骨粗鬆症の病態に関連するとの報告もあり (Win J, et al. *J Clin Invest.* 2008) 当初の癌抑制分子としての機能以外にも多岐に渡る炎症性疾患との関連が想定される。我々のグループでは血管での機能に着眼し、解析を進めたところ、CYLD が血管内皮細胞において NF $\kappa$ B 活性及びその下流の接着分子の発現を抑制し、その結果、動脈硬化の初期段階に起こる血管内

皮細胞への単球の接着を抑制することが分かり、また、血管平滑筋細胞においても同様に抗炎症作用を有することを確認できた。その分子メカニズムの一つとして CYLD が血管細胞において TRAF2 を脱ユビキチン化して、NF $\kappa$ B 活性化のカスケードを制御することであることを証明した。CYLD の機能は *in vivo* での検討でも確認でき、ラットの頸動脈バルーン障害後の急性炎症に続き、新生内膜における内在性 CYLD の発現は上昇するが、更に CYLD を遺伝子導入することで抗炎症作用を呈して、新生内膜の形成が抑制された。

M $\phi$  は動脈硬化形成過程において重要な役割を担っているが、その機能を中心的に司る NF $\kappa$ B 活性を調節している重要な分子として CYLD があり、先行結果からその質的量的低下に伴い慢性炎症病態が悪化し、プラーク形成や不安定化に関与していると想定される。興味深いことに、動脈硬化巣全体では CYLD の発現は増加している一方で、M $\phi$  においては同様の慢性炎症状態と考えられる老化に伴い CYLD の内在性発現が低下しているとの報告があるため (Hinojosa CA, et al. *Exp. Gerontol.* 2014)、先行結果と合わせ、加齢性の動脈硬化形成において M $\phi$  における CYLD の発現低下が炎症増悪の一つのトリガーとなっている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では加齢性疾患としての動脈硬化について M $\phi$  における CYLD の loss-of-function による機能解析を中心に基礎的検討を行い治療標的分子としての可能性を検討する。更に、動脈硬化形成の端緒となる血管内皮への単球の接着についても加齢と CYLD について病態への関与について検討する。

## 3. 研究の方法

研究成果の項に記載。

#### 4. 研究成果

### EC 及び Mφでは炎症性サイトカインに反応して内在性 CYLD の発現が増加する。

動脈硬化巣においては IL-1β、IL-6、TNFαそして RANKL が高濃度に存在していると考えられている。そこでまず、これら炎症性分子の存在下において動脈硬化形成過程で重要な役割を担う、ヒト冠動脈血管平滑筋細胞 (HCASMC)、ヒト血管内皮細胞 (HAEC)、そして Mφ (THP-1 Mφ) での内在性 CYLD の発現変化について検討した。図 1 に示す様に、Mφ における CYLD の発現がこれらの血管構成細胞の中で最も高く、IL-1β 及び TNFα の刺激により HAEC 及び THP-1 Mφ での発現は有意に増加するが、HCASMC での発現の増加は認めなかった。IL-6 は THP-1 Mφ においてのみ CYLD の発現上昇を誘導した。RANKL ではこれらの細胞においては CYLD の発現は誘導されなかった。以上結果より CYLD は動脈硬化形成過程において、特に EC 及び Mφ で重要な役割を担っている可能性が考えられ、その病態について更なる解析を行うこととした。

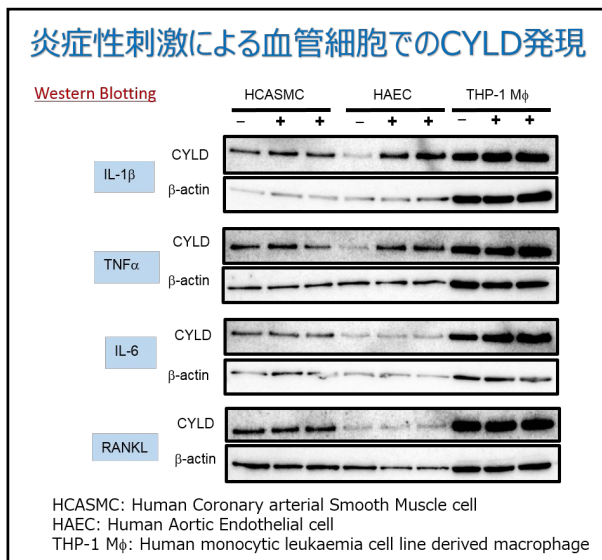


図 1

### EC における siRNA による CYLD のノックダウンは炎症性分子の発現及び単球の接着を促進する。

加齢性動脈硬化形成の初期に起こる現象は軽度の慢性炎症により活性化された EC への単球の接着である。動脈硬化形成の端緒となる本

現象における CYLD の関与を検討するため、siRNA で CYLD をノックダウンした HAEC への単球の接着について、低濃度の炎症性刺激を行い評価した。CYLD のノックダウンにより HAEC では 100pg/mL の TNFα の刺激にて scramble に比し有意な IL-6、VCAM-1、ICAM-1 の発現上昇を認めた。(図 2) これは軽度の炎症環境においても EC での CYLD の loss-of-function は炎症の悪化を惹起することを示唆する。

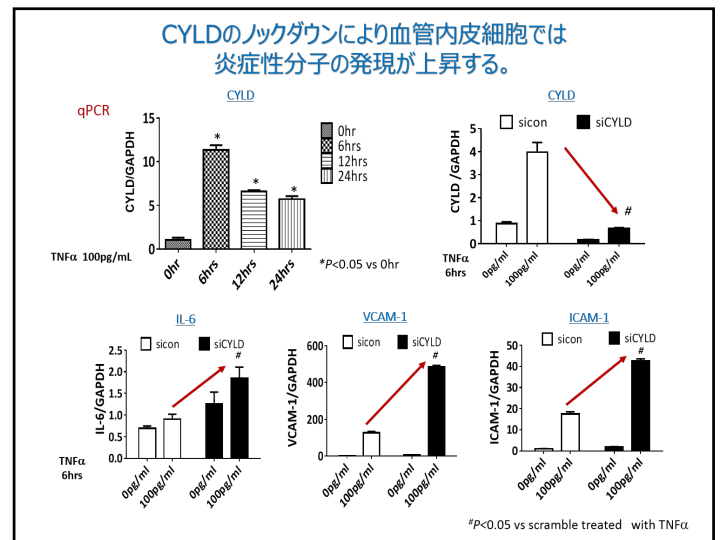


図 2

本結果に基づき、THP-1 monocyte の HAEC への接着への CYLD の関与を検討した。図 3 に示すように、CYLD をノックダウンした HAEC ではコントロールに比して、低濃度の TNFα 刺激下で、単球の接着の増加を認めた。これは上記の接着分子の発現についての結果に一致するものである。

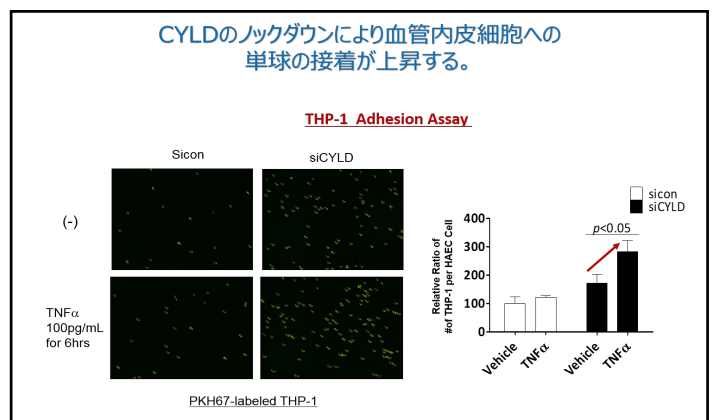


図 3

これらの結果より EC における CYLD の

loss-of-function は老化に伴う軽度の慢性炎症状態である生体環境において炎症を惹起し、単球の接着を促進する可能性が示唆された。

### Mφにおいて siRNA による CYLD のノックダウンは酸化 LDL 添加による泡沫化を促進する。

動脈硬化形成過程の初期において、血管内皮に接着した単球は血管内膜に浸潤し、様々な炎症性分子に反応して Mφに分化し、大量の酸化 LDL を貪食して泡沫細胞へと変化する。Mφの泡沫化における CYLD の関与を検討するために CYLD を siRNA によりノックダウンした Mφの cell line である RAW264.7 に酸化 LDL を投与し、48 時間後に Oil Red O によりその取り込みを評価した。その結果、図4に示すように、CYLD の loss-of-function により RAW264.7 細胞では泡沫化が促進することが確認できた。

#### CYLD のノックダウンによりマクロファージにおける酸化 LDL の取り込みが上昇する。

Oil Red O Staining (RAW 264.7 cell) at 48 hrs after oxLDL addition

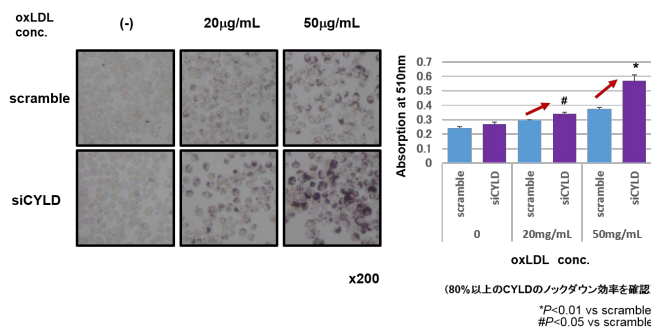


図4

上記の結果に基づき、Mφの脂質代謝に関わる分子の発現を検討した。その結果、図5に示すように、CYLD をノックダウンした RAW 264.7 細胞では酸化 LDL 刺激下で、スカベンジャーレセプター SR-A、LOX-1、CD36、脂質シャペロン分子 FABP4、脂質合成分子 ACAT-1 が増加し、脂質排出に関わる SR-BI が減少していた。一方で脂質排出に関わる分子の一つである ABCA-1 は増加していた。また、図6に示す様に CYLD の loss-of-function により酸化 LDL を添加した RAW 264.7 細胞では炎症性分子 MCP-1、IL-1βの発現増加も認められた。

#### CYLD ノックダウンによるマクロファージでの脂質代謝関連分子の発現プロファイル

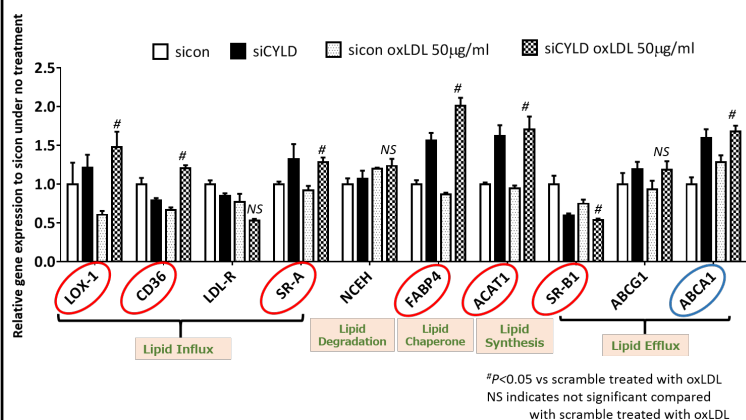


図5

#### CYLD ノックダウンによるマクロファージでの炎症性分子の発現プロファイル

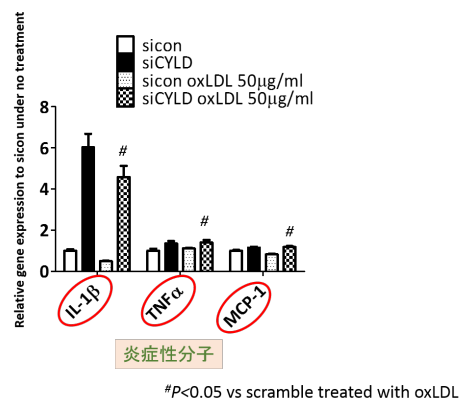


図6

Mφにおける CYLD の loss-of-function によるこれらの脂質代謝及び炎症性分子の動きは包括的に泡沫化の方向に誘導しているものと考えられた。

EC 及び Mφにおける内在性 CYLD の発現は老化により減少する。

前述の老化に伴う Mφにおける CYLD の発現低下の報告に基づき、EC 及び Mφにおける老化に伴う内在性 CYLD の発現について検討した。図7に示す様に EC については継代を繰り返して replicative senescence を誘導した HAEC では有意な CYLD の mRNA 発現の低下を認め、更に Mφにおいては老化マウスより採取した骨髓由来 Mφでは若年マウスに比し、有意に CYLD の蛋白発現が低下していた。

老化に伴い血管内皮細胞及びマクロファージにおいて  
CYLDの発現が低下する。

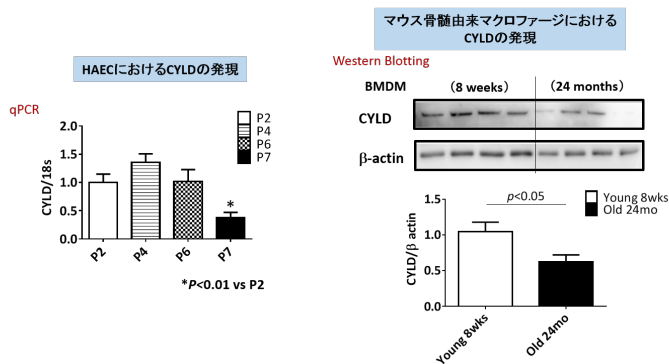


図7

本結果はこれまで示した EC 及び Mφ における loss-of-function による CYLD の機能解析の結果を考慮すると EC や Mφ では CYLD の発現が低下する可能性が示唆され、慢性炎症を基盤とする老化に伴う動脈硬化形成初期における病態促進の誘因となっている可能性が示唆された。(図8) CYLD は加齢性動脈硬化の発症を予防する標的分子になり得る。

老化に伴う動脈硬化形成過程の初期

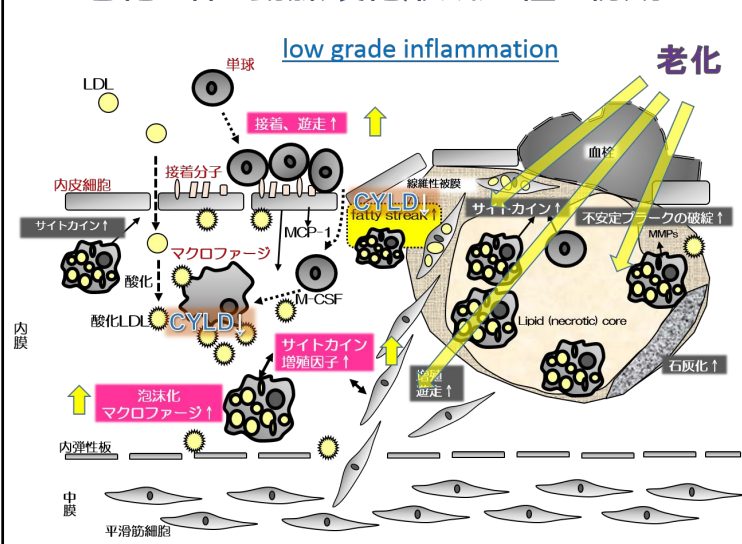


図8

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0件)

[学会発表](計6件)

今泉 友希

加齢に伴う動脈硬化形成過程におけるマクロファージでの脱ユビキチン化酵素 CYLD (cylindromatosis) の病態生理的役割の検討  
第57回日本老年医学会学術集会、総会  
2015年6月14日 横浜

今泉 友希

加齢に伴う動脈硬化形成過程におけるマクロファージでの脱ユビキチン化酵素 CYLD (cylindromatosis) の病態生理的役割の検討  
第38回日本高血圧学会総会  
2015年10月9日 松山

今泉 友希

加齢に伴う動脈硬化形成過程におけるマクロファージでの脱ユビキチン化酵素 CYLD (cylindromatosis) の病態生理的役割の検討  
第51回日本高血圧関連疾患モデル学会学術集会  
2015年10月30日 大阪

今泉 友希

加齢に伴う動脈硬化形成過程における脱ユビキチン化酵素 CYLD (cylindromatosis) のマクロファージ泡沫化への影響  
CVMW 心血管代謝週間 2015  
2015年12月11日 神戸

Imaizumi Y

Pivotal roles of a deubiquitinating enzyme CYLD(cylindromatosis) in development of ageing-related atherosclerosis in the vasculature.

The 26<sup>th</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension

2016.9.28 Seoul

鷹見 洋一

加齢性動脈硬化における脱ユビキチン化酵素

素 CYLD(cylindromatosis)の関与

第22回心血管内分泌代謝学会学術総会

2018年4月29日 宮崎

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/ww/jstf\\_takami.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/ww/jstf_takami.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鷹見 洋一 (TAKAMI, Yoichi)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90621756

##### (3) 研究分担者

楽木 宏実 (RAKUGI, Hiromi)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20325369

##### (3) 研究分担者

中神 啓徳 (NAKAGAMI, Hironori)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20325369

##### (4) 研究協力者

山本 浩一 (YAMAMOTO, Koichi)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：00528424