

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09160

研究課題名(和文) 亜鉛フィンガータンパク質のマクロファージ分化・機能制御による動脈硬化における役割

研究課題名(英文) Role of a Zing Finger Protein in Atherosclerosis via Regulation of Macrophage Differentiation and Function

研究代表者

北本 史朗 (Kitamoto, Shiro)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00380436

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)：亜鉛フィンガータンパク質329 (Zing Finger Protein 329; ZFP329) は、前炎症性のM1型マクロファージの誘導、コレステロール輸送蛋白質発現抑制によるマクロファージの泡沫細胞化の促進、動脈硬化病変の改善・安定化作用を有するTGF- β (Transforming Growth Factor- β) の細胞内シグナル伝達の抑制を介して動脈硬化促進因子として働くことが、培養細胞実験より示唆された。現在、ZFP329遺伝子欠損マウスの作製を継続しており、今後、本マウスを用いてZFP329の更なる機能解析を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：Zing Finger Protein 329 (ZFP329) was suggested to play a role as a atherosclerosis-promoting factor by inducing proinflammatory M1 macrophage population, enhancing macrophage foam cell formation via suppression of cholesterol transporter protein expression, and inhibiting intracellular signal transduction of TGF- β (Transforming growth factor- β), which ameliorates and stabilizes atherosclerosis, from in vitro experiments. We are now continuing to generate ZFP329 deficient mice and are planning to perform further analysis of ZFP329 function utilizing these mice in future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：動脈硬化 マクロファージ シグナル伝達 生体分子

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、虚血性心疾患、脳卒中、脳血管性痴呆、慢性腎臓病など現代の主要な死因・慢性疾患・後遺症の原因となる重要な基礎的病態である。しかし、スタチンを代表とする薬物治療、カテーテル血管形成術、外科的血行再建術など、現在の動脈硬化性疾患に対する治療法の有効性は未だに十分とはいえず、動脈硬化の新たな治療・予防法の開発は依然として重要な課題である。

申請者は、カニクイザルの動脈硬化モデルのマイクロアレイ解析により chitinase 1 (CHIT1) 遺伝子発現と動脈硬化病変サイズの相関を認め、CHIT1の動脈硬化における役割を検討した。その結果、CHIT1はマクロファージ (Mφ) におけるコレステロール輸送タンパク質発現の増加によるコレステロール排出促進作用、M1型Mφへの分化抑制および各種炎症性サイトカイン発現抑制による抗炎症作用を介して、抗動脈硬化的に働くことを世界で初めて報告した (*Am J Pathol* 2013)。しかし、その作用を仲介する詳しい分子生物学的メカニズムは、これまで全く不明であった。

申請者は、CHIT1 の抗動脈作用を介する分子生物学的メカニズムを明らかにするため、培養 Mφ において抗 CHIT1 抗体を用いて共免疫沈降・質量分析 (MALDI-TOF MASS による PMF 解析) を行い、CHIT1 と相互作用するタンパク質 Zing Finger Protein 329 (ZFP329) を同定した。ZFP329 は、構造的に DNA 結合モチーフである Zinc finger を 12 個有しており、哺乳類の転写因子にごく一般的に認められる C2H2 型の亜鉛フィンガータンパク質ファミリー (例: SP1) に属することから、転写因子活性を有する可能性が極めて高い。また、酵母 Two-hybrid 法により TGF-β (Transforming Growth Factor-β) の細胞内シグナル伝達の重要な転写因子 smad3 との相互作用が確認されていることから、CHIT1 の抗動脈硬化作用において、ZFP329 を介した DNA 転写調節や TGF-β シグナル経路への作用が重要な役割を果たしている可能性を示唆する。しかし、ZFP329 の機能に関する研究報告はこれまでに全くなされていない。

2. 研究の目的

以上の背景より本研究では研究期間内において、ZFP329 の Mφ の分化・機能制御および動脈硬化の発生・進展における役割を明らかにするものとする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 実験

① <Mφ における ZFP329 の役割の検討>

培養 Mφ (RAW264.7 細胞、マウス腹腔内 Mφ、マウス骨髄由来 Mφ) において、ZFP329 発現プラスミド遺伝子導入により過剰発現実験、および ZFP329 に対する siRNA 導入により発現抑制実験を行った[導入法: エレクトロポレーション法およびリポフェクション法]。1. コントロール群、2. ZFP329 過剰発現(または発現抑制)群を作成し、以下について比較検討した。

- (a) Boyden chemotaxis chamber を用いた遊走因子 MCP-1 に対する遊走能の評価
- (b) コレステロール代謝能(コレステロール取込み能・排出能、泡沫化)の評価
- (c) M1/M2 型 Mφ マーカー・炎症性サイトカイン(iNOS, IL-1β, IL-6, IL-12, Fizz1, Arg1, IL-10, TNFα, MCP-1)・コレステロール代謝関連遺伝子(PPARγ, LXRα, ABCA1, ABCG1, SR-B1, SR-A, CD36) 発現の評価
- (d) ZFP329 により発現制御される遺伝子のプロモーター上の ZFP329 結合部位・転写活性の解析 (Chip アッセイおよびレポータージーンアッセイ)

② <ZFP329 の TGF-β 細胞内シグナル伝達への関与に関する検討>

TGF-β は、Mφ の遊走・泡沫細胞化抑制、T リンパ球活性化抑制、コラーゲン新生増加、TIMP (Matrix metalloproteinase 阻害因子) 誘導などを介して動脈硬化病変を抑制・安定化することが知られている。また、ZFP329 と smad3 との相互作用が確認されていることから、マウス線維芽細胞 (NIH 3T3 細胞) に ZFP329 発現プラスミド遺伝子導入を行い、1. TGF-β1 刺激群、2. ZFP329 過剰発現 + TGF-β1 刺激群を作成し、TGF-β1 刺激による細胞内シグナル伝達 (smad2、smad3、smad4 等のリン酸化) を評価した。

(2) *in vivo* 実験

① <ZFP329 遺伝子欠損マウスの作製>

米国 UC Davis KOMP Repository より ZFP329 遺伝子欠損マウス (Zfp329^{tm1a(KOMP)Wtsi}、図 1. Allele Map) 作製用 ES 細胞 (C57BL/6N 由来 JM8A3.N1 ES 細胞) を購入し、ホストマウス (B6D2F1x C57BL/6N) の胚盤胞にマイクロインジェクションを行い仮親マウスの子宮に移植した。

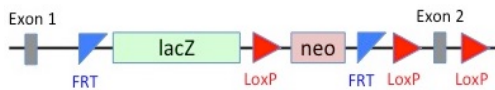


図 1. Zfp329^{tm1a(KOMP)Wtsi} Allele Map

次に得られたキメラマウス(F0)を用いて、図 2 の計画に基づいて交配を行った。得られた仔について、図 3 の primer を使用して LacZ 遺伝子の PCR および 5'Long Range PCR による Genotyping を実施した。

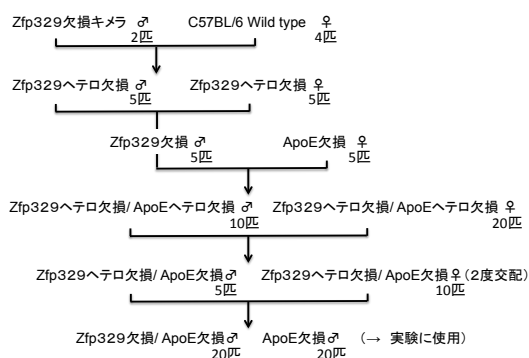


図 2. 交配計画

Primer pair 1 (LacZ)
LacZ FW: TGT GCC GAA ATG GTC CAT CA
LacZ RV: GTA TCG CCA AAA TCA CCG CC

Primer pair 2 (Long Range PCR)
3' Universal (CSD-RAF5-F): CACACCTGCCCTGAACCTGAAAC
GR3: CATTACAGTCATCGGTGGCTGAGTAGTTGC

Primer pair 3 (Long Range PCR)
5' Universal (LR-5En2frt-R): GGTGGTGTGGGAAAGGTTCTGAAG
GF3: GAAGCAACTGAACCTCTAGGACGCGTGCG

図 3. Genotyping 用 PCR primer

4. 研究成果

(1) *in vitro* 実験

① <Mφ における ZFP329 の役割の検討>

培養 Mφ への ZFP329 発現プラスミド導入実験では、遺伝子導入効率と生存率のバランスが最も良かった電圧ポレーション法とマウス腹腔内 Mφ の組み合わせで実施した。ZFP329 遺伝子発現はコントロールと比較して ZFP329 過剰発現群で 1.58 倍であった (図 4)。ZFP329 siRNA 導入実験では、いずれの導入法と培養 Mφ の組み合わせにおいても ZFP329 遺伝子発現の有意な抑制が得られず、以降の解析を実施できなかった。

(a) Boyden chemotaxis chamber を用いた遊走因子 MCP-1 に対する遊走能の評価: 対照群と ZFP329 過剰発現群間の比較において有意差を認めなかった。

(b) コレステロール代謝能の評価: ZFP329 過剰発現は、Mφ のコレステロール取込み能・排出能、泡沫化に対して有意な影響を与えなかった。

(c) M1/M2 型 Mφ マーカー・炎症性サイトカイン・コレステロール代謝関連遺伝子発現の評価: ZFP329 遺伝子導入により M1 型 Mφ マーカー iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) 発現の有意な増加、およびコレステロール輸送蛋白 ABCA1 (ATP-Binding Cassette Protein A1) 発現の有意な抑制を認めた。炎症性サイトカインおよび M2 型 Mφ マーカー発現については有意差を認めなかった (図 4)。

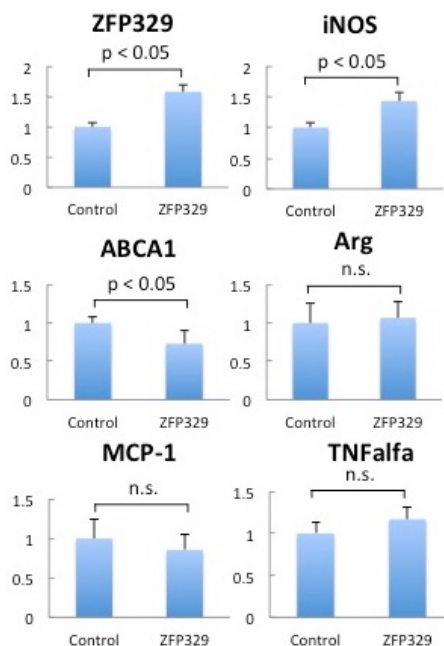


図 4. 定量的 PCR

(d) ZFP329 により発現制御される遺伝子のプロモーター上の ZFP329 結合部位・転写活性の解析: 米国プリンストン大学ホームページを利用して iNOS 遺伝子および ABCA1 遺伝子上の ZFP329 結合部位を予測し Chip アッセイを試みたが、結合部位を特定するまでに至らなかった。

② <ZFP329 の TGF-β 細胞内シグナル伝達への関与に関する検討>

マウス線維芽細胞への ZFP329 過剰発現により、TGF-β 刺激による smad3 のリン酸化の抑制を認めた (図 5)。

以上の *in vitro* 実験の結果より、ZFP329 は M1 型 Mφ の誘導、Mφ の泡沫細胞化の促進、TGF-β シグナル伝達の抑制により動脈硬化促進因子として働くことが示唆された。

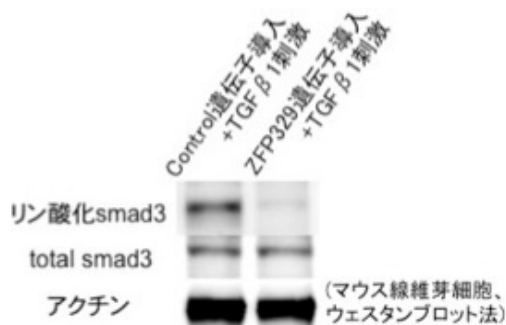


図5. ウェスタンブロット法

(2) *in vivo* 実験

① <ZFP329 遺伝子欠損マウスの作製>

ZFP329 遺伝子欠損マウス作製用 ES 細胞のマイクロインジェクションを行った胚盤胞を仮親マウスの子宮へ移植した結果、雄2匹のキメラマウス (F0、90%および50%キメラ) が得られた (図6)。

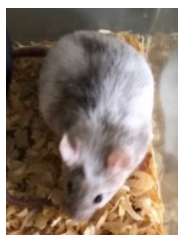


図6. ZFP329 キメラマウス (50%キメラ)

次に本キメラマウスを雌4匹の野生型 C57BL/6N マウスと交配した。その結果、これまでに 26 匹の仔が生まれ Germline transmission の確認を行ったが、F1 マウスは含まれていなかった (図7)。

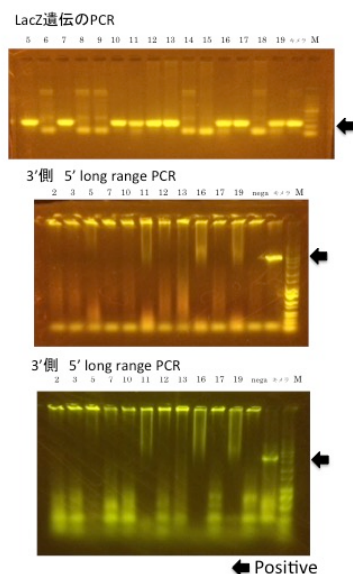


図7. Genotyping の1例

現在、交配を継続中であり、今後、ZFP329 遺伝子欠損マウスが得られ次第、本マウスを用いて *in vitro* 実験および *in vivo* 実験を実施し、ZFP329 の更なる機能解析を試みる予定である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ikeda J, Ichiki T, Takahara Y, Kojima H, Sankoda C, Kitamoto S, Tokunou T, Sunagawa K., PPAR γ Agonists Attenuate Palmitate-Induced ER Stress through Up-Regulation of SCD-1 in Macrophages., *PLoS One*., 査読有、10(6) 巻、2015 年、e0128546
- ② Meiler S, Baumer Y, McCurdy S, Lee BH, Kitamoto S, Boisvert WA., Cluster of differentiation 43 deficiency in leukocytes leads to reduced atherosclerosis--brief report., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*., 査読有、35 (2) 巻、2015 年、309-11
- ③ Watanabe A, Ichiki T, Kojima H, Takahara Y, Hurt-Camejo E, Michaëlsson E, Sankoda C, Ikeda J, Inoue E, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K., Suppression of abdominal aortic aneurysm formation by AR-R17779, an agonist for the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor., *Atherosclerosis*., 査読有、244 巻、2015 年、113-20

[学会発表] (計 0 件) なし

[図書] (計 0 件) なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件) なし

○取得状況 (計 0 件) なし

[その他] なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

北本 史朗 (KITAMOTO, Shiro)
九州大学・大学院医学研究院・共同研究員
研究者番号：00380436

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし