

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19034

研究課題名(和文)細胞外マトリクス環境変化誘導性のマクロファージ泡沫化を標的とする新規動脈硬化療法

研究課題名(英文)Macrophage Foam Cell Formation Induced by the Peptide Derived from Tenascin-C

研究代表者

伊豫田 拓也 (IYODA, Takuya)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・講師

研究者番号：80465715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：テネイシンC(TNC)は炎症局所に高発現を示すが、その炎症調節における作用は未知である。TNCはその分子内部にb1-インテグリン活性化領域 TN111A2を隠し持ち、炎症環境において本領域を表出させる。今回我々は TN111A2領域が、マクロファージに動脈硬化促進性の形質を付与する可能性を示した。また TN111A2領域の生理活性：b1-インテグリン活性化を抑制する薬剤Xの投与が、動脈硬化モデル動物における病態形成を抑制するとの観察も得た。以上より TNCの作用として TN111A2を介したマクロファージの機能調節があり、少なくとも動脈硬化病態形成に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Tenascin-C (TNC) is known to be upregulated in inflammation including atherosclerosis. Previously, we found a bioactive region termed TN111A2 from TNC, and the exposure of this region might be mediated through digestion of TNC by inflammatory proteases. Since macrophages are accumulated in inflammatory site, we hypothesized that the pro-atherosclerotic activity of macrophages might be modulated by TN111A2. In this study, we showed the possibility that TN111A2 would contribute to the progression of atherosclerosis through acceleration of foam cell formation. It would be promoted by enhanced phagocytosis, and suppressed cholesterol efflux through down-regulation of ABCA1/G1. We also observed that the reagent, which could cancel TN111A2-mediated b1-integrin activation, could inhibit atherosclerotic plaque formation in LDLR-KO mice. Taken together, TN111A2 might be a key player in atherosclerosis progression and become a good candidate for a new target of anti-atherosclerosis treatment.

研究分野：分子病態学

キーワード：テネイシンC 細胞外マトリクス マクロファージ 動脈硬化 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1)種々生活習慣病の根底には慢性炎症病態が存在するとの理解が、近年一般的となっている。炎症の惹起から収束に至るまでの応答にはマクロファージを中心とした調節機構が存在しており、ゆえに炎症の慢性化を伴う生活習慣病の進展において本細胞に異常がもたらされる仕組みに、注目が集まっている。

(2)生活習慣病の1つであり、かつ異常なマクロファージの蓄積がとりわけ病態形成に中心的な役割を負う疾患に、アテローム性動脈硬化がある。米国統計では本病態を原因とする死亡者数がかんに因るものを超えており、また世界的な食環境の欧米化に伴い、本疾患の罹患率は上昇を続けている。この現状から本疾患は、今後世界的に主たる死因となることが推測される。しかし現在動脈硬化患者になされる処置は、スタチン等を用いた血中脂質量のコントロールしか術がない。スタチンには横紋筋融解症などの副作用が付随することから、作用点の異なる治療アプローチの創出が期待される。

(3)動脈硬化やがんを含む種々炎症関連領域に特異的かつ一過的に高発現する細胞外マトリックス分子に、テネイシンCがある。研究代表者所属教室はこれまでに、テネイシンC分子構造内にはβ1-インテグリンを強力かつ持続的に活性化させる領域TNIIIA2を見出した。さらに本TNIIIA2領域が通常テネイシンC分子構造内に隠れており、炎症性プロテアーゼによる限定分解に依存することを報告している。テネイシンC高発現を伴い、かつ炎症性プロテアーゼの働く「炎症性疾患領域」には、必ずマクロファージの集積が認められることから、研究代表者はテネイシンC/TNIIIA2とマクロファージの間における相互作用の存在を推測し、その動脈硬化進展への寄与、及びそのメカニズムが新規治療標的となる可能性を推察した。

2. 研究の目的

(1)マクロファージの異常化が主たる病因であり、かつテネイシンCの高発現を伴う炎症性疾患：動脈硬化を標的とし、マクロファージの病態促進的な機能発現に対する、テネイシンC及びその内部生理活性領域TNIIIA2を介した調節機構の存在の是非を明らかにする。

(2)上記機能発現調節機構の存在が明らかとなった暁には、その分子メカニズムの解明、及び当機構を標的とした動脈硬化病態改善の可否について評価し、新規動脈硬化病態改善アプローチとしての提案を目指す。

3. 研究の方法

(1)【細胞レベルでの検討】マウスマクロファージ様細胞株 Raw 264.7 を主対象として用い、これをテネイシンC内TNIIIA2領域を含むアミノ酸配列からなるpTNIIIA2ペプチドで刺激することでマクロファージに生ずる形質・機能変化を評価する。

(2)【動物レベルでの検討】動脈硬化モデル動物として、高脂肪食負荷LDLR-KOマウスを用いる。本病態モデルマウスに対して本課題標的分子:pTNIIIA2の生理活性を阻害する薬剤を投与することで、TNIIIA2の動脈硬化病態進展に対するTNIIIA2領域の貢献を確認するとともに、用いる阻害薬による動脈硬化病態改善の可能性について評価する。

4. 研究成果

(1)テネイシンCは動脈硬化病態局所に高発現することが知られている。今回行った*in vitro*細胞実験より、テネイシンC分子構造内に存在するTNIIIA2領域が、主として動脈硬化病態を構成する細胞であるマクロファージに作用することで、マクロファージに病態形成促進的な形質を付与する可能性を見出した。(詳細を以下①~④に記す)

pTNIIIA2刺激を受けたマクロファージを悪玉コレステロール(low density lipoprotein; LDL)存在下にて培養すると、細胞内への脂質蓄積が有意に亢進した。この結果は、動脈硬化巢の主たる構成細胞である泡沫細胞(=脂質異常蓄積マクロファージ)の生成が、TNIIIA2領域の作用により促進される可能性を示唆している。

末梢に過剰に供給された悪玉コレステロールは、「貪食作用」を介してマクロファージに取り込まれる。pTNIIIA2刺激を受けたマクロファージは貪食活性を有意に亢進させたことから、(1)-で観察された脂質の異常蓄積は、許容量を超えた脂質の細胞内取り込みによりもたらされたと推測される。

マクロファージに取り込まれた悪玉コレステロールは細胞内で代謝・分解され、その後善玉コレステロール(high density lipoprotein; HDL)への再構築を経て循環血中に戻る。この時マクロファージ細胞外へのコレステロール排出に責を負う輸送体・「ABCA1/ABCG1」の発現が、pTNIIIA2刺激を受けたマクロファージにおいて有意に抑制された。この結果は(1)-に記した脂質異常蓄積が、(1)-現象だけでなく、取り込んだ脂質の排出能低下によっても支えられることを示している。

pTNIIIA2刺激を受けたマクロファ-

ジでは p38 の持続的なリン酸化 (=p38 細胞内シグナル伝達経路の活性化) が観察された。そこで p38 阻害剤の添加により本細胞内シグナルを切断したところ、上記(1)-①～③現象はほぼ消失した。

TNIIIA2 領域は強力かつ持続的な $\beta 1$ -インテグリン活性化能を示す生理活性領域として見出されたものである。そこで Mn^{2+} 及び 9EG7 mAb の添加によりマクロファージの $\beta 1$ -インテグリンを活性化させたところ、pTNIIIA2 刺激時と同様の (a) 脂質蓄積, (b) 貪食亢進, (c) ABCA1/ABCG1 発現減少 (図 1) が生じた。

以上①～⑤の観察より、

- (A) テネイシン C 内 TNIIIA2 領域によるマクロファージ機能調節機構の存在。
- (B) TNIIIA2 領域が誘導するマクロファージの泡沫細胞化は、脂質取り込み能の亢進と脂質排出量の減弱の両者によって支えられる。
- (C) 少なくとも動脈硬化病態形成においては、TNIIIA2 によるマクロファージ機能調節が病態促進的に働いている可能性がある。
- (D) 上記調節機構は、TNIIIA2 領域の生理活性である $\beta 1$ -インテグリン活性化とそれに伴う p38 シグナル経路の活性化を介している。

の 4 点が示唆された。

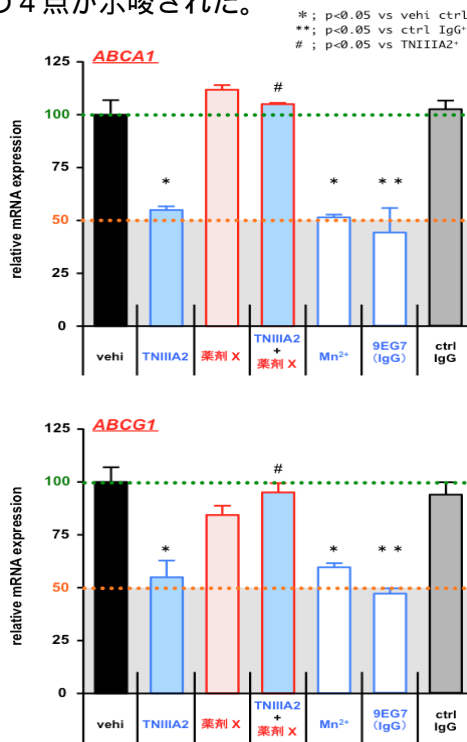


図 1. $\beta 1$ -インテグリンの活性化調節と ABCA1/G1 発現

前出の通り、TNIIIA2 には病態特異的マクロファージの生成を調節する機能が示されたことから、続けて TNIIIA2 及び

その生理活性が、動脈硬化の病態調節における標的となり得るか、評価した。

(2) 代表者が所属する教室では過去に、TNIIIA2 とは真逆に「 $\beta 1$ -インテグリンの強力な不活性化」を実現する薬剤 X【特許準備中】を見出していた。本剤は生体分子内の一部領域からなるものであり、TNIIIA2 に対する抗体や化学的阻害薬剤と比較して副作用発現の可能性が低く、かつ安価であるという利点を有する。今回はこの薬剤 X を用い、以下①～の観察を得た。

薬剤 X 存在化にてマクロファージを pTNIIIA2 刺激することで、pTNIIIA2 が誘導する (a) 脂質蓄積, (b) 貪食亢進, (c) ABCA1/ABCG1 発現減少 (図 1) の全ての現象が消失した。

高脂肪食を负荷した LDLR-KO マウスにおいて、TNIIIA2 の生理活性である「 $\beta 1$ -インテグリン活性化」を妨げる薬剤 X の投与は、胸部-腹部大動脈に生ずる動脈硬化病態部位の面積を著しく減少させた (図 2)。

以上の観察より、薬剤 X には(1)に記したマクロファージ向動脈硬化性形質の発現抑制作用があり、動物レベルで動脈硬化病態の形成を妨げることも確かめられた。

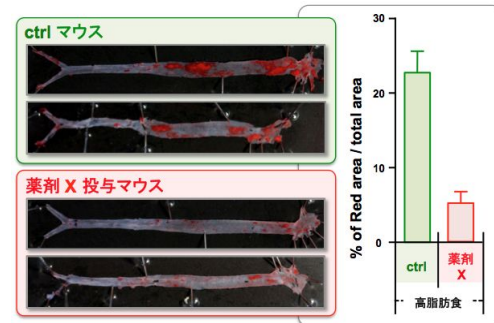


図 2. 動脈硬化モデル動物への薬剤 X 投与と病態形成

古くから テネイシン C はその発現パターンより、炎症調節の鍵因子として注目されていた。しかし本分子が分子構造内にいくつもの生理活性領域を持つことなどからその機能の詳細にわたる解明は混迷を極め、未だ本分子を標的とした治療法の提案はなされていない。今回の成果として テネイシン C は、少なくとも動脈硬化において、TNIIIA2 領域を介してマクロファージに病態促進的形質の発現を誘導し、病態形成を正に調節することが示唆された。また動物モデルにおける観察は、TNIIIA2 領域による $\beta 1$ -インテグリン活性化が、動脈硬化病態改善に価値高い標的となる可能性を示唆している。現時点では明らかにすべき事項がまだ残ってはいるものの、今回用いた薬剤 X、

もしくは薬剤 X の作用点である「インテグリン活性の調節」には、動脈硬化治療に対する有効かつ有望なアプローチとしての可能性を期待できる。

一方テネイシン C は種々炎症性疾患に高発現を示すことから、動脈硬化と同じく慢性炎症を基盤にもつ各種生活習慣病においても、TNIIIA2 によるマクロファージ機能調節を介した病態調節機構が存在する可能性を期待している。

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 2 件)

1. Iyoda T, Fukai F, Promotion of macrophage foam cell formation by the peptide derived from tenascin-C, Peptide Science 2015, 査読有, 2016 年, pp203-206.
2. Iyoda T, Kazama M, Takeda K, Fukai F, Role of the tenascin-C-derived peptide TNIIIA2 in the formation of atherosclerotic Foam Cell, Peptide Science 2014, 査読有, 2015 年, pp51-64.

[学会発表](計 10 件)

1. 伊豫田拓也, 微小接着環境の変化に伴うマクロファージの機能調節と動脈硬化病態の形成, 第 2 回 再生医療と DDS の融合研究部門発足記念シンポジウム, 2016 年 12 月 26 日, 東京都・新宿区・東京理科大学森戸記念館.
2. 伊豫田拓也, 細胞外マトリックス環境と生活習慣病, 第 3 回 日本医科大学・東京理科大学合同シンポジウム, 2016 年 12 月 17 日, 東京都・文京区・日本医科大学同窓会橋桜会館.
3. 伊豫田拓也, テネイシン C 分子内領域によるマクロファージ機能調節, 第 4 回 MatriCell Forum, 2016 年 9 月 4 日, 東京都・新宿区・東京理科大学 Porta 神楽坂.
4. Iyoda T, Role of the TNIIIA2 site in tenascin-C in the progression of atherosclerosis, The 4th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2016, 2016 年 2 月 28 日, 千葉県・野田市・東京理科大学(野田)セミナーハウス.
5. 伊豫田拓也, 1 インテグリン活性バランスの変化に基づくマクロファージ病態関連形質の調節, 第 1 回 再生医療と DDS の融合研究部門発足記念シンポジウム, 2016 年 1 月 13 日, 東京都・新宿区・東京理科大学(葛飾)図書館大ホール.
6. Iyoda T, Promotion of macrophage

foam cell formation by the peptide derived from tenascin-C, 第 52 回 ペプチド討論会, 2015 年 11 月 16 日, 神奈川県・平塚市・平塚市中央公民館.

7. 伊豫田拓也, 細胞外マトリックス由来ペプチドによるマクロファージ機能と動脈硬化病態の調節, 第 133 回 日本薬理学会 関東支部会, 2015 年 10 月 10 日, 千葉県・柏市・三井ガーデンホテル カンファレンスセンター.
8. 伊豫田拓也, テネイシン C 分子内領域によるマクロファージ機能調節, 第 3 回 MatriCell Forum, 2015 年 9 月 13 日, 三重県・津市・三重大学医学部 総合医学教育棟.
9. 伊豫田拓也, テネイシン C 分子内領域によるマクロファージ泡沫化の亢進, 第 59 回 日本薬学会 関東支部会, 2015 年 9 月 12 日, 千葉県・船橋市・日本大学薬学部.
10. 伊豫田拓也, テネイシン C 由来ペプチド TNIIIA2 によるマクロファージ泡沫細胞化の亢進, 第 47 回 日本結合組織学会学術大会, 2015 年 5 月 16 日, 東京都・品川区・コクヨホール.

[図書](計 1 件)

1. Iyoda T, Matsunaga T, Fukai F, Integrin-dependent cell regulation and its clinical application. Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science, 2016, pp313-324.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
伊豫田 拓也 (IYODA, Takuya)
東京理科大学・薬学部・生命創薬科学科・講師
研究者番号: 8 0 4 6 5 7 1 5
- (2) 研究分担者
なし()
- (3) 連携研究者
なし()
- (4) 研究協力者
深井 文雄 (FUKAI, Fumio)
東京理科大学・薬学部・生命創薬科学科・教授
研究者番号: 9 0 1 2 4 4 8 7

中川 嘉 (NAKAGAWA, Yoshimi)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機
構・准教授
研究者番号：80361351