

令和元年5月28日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05299

研究課題名(和文) 動脈壁と血管周囲脂肪組織に生じる無菌的慢性炎症の病態解明と新規制御法の開発

研究課題名(英文) A study to elucidate the mechanism by which sterile chronic inflammation occurs in arterial wall and perivascular adipose tissue

研究代表者

佐田 政隆 (SATA, Masataka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：80345214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病によって、動脈硬化や糖尿病の病態に重要な慢性炎症が惹起される機序を検討した。過食、脂質異常症や高血糖により、血管細胞や脂肪細胞に細胞死が誘導された。培養細胞や遺伝子改変マウスを用いた実験により、傷害を受けた細胞から放出された自己核酸断片がTLR9を介してマクロファージを活性化して、脂肪組織や動脈での慢性炎症につながる事が明らかとなった。細胞死を抑制したり、TLR9に対する抑制オリゴヌクレオチドが新しい生活習慣病の治療法として有望であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、肥満や高血圧、高脂血症といった生活習慣病によって、血管や脂肪組織でアポトーシスやピロトーシス、ネクロトーシスといった細胞死が生じ、慢性炎症が惹起される分子機序を明らかにすることができた。傷害された細胞から遊離される自己の遊離核酸断片がマクロファージの自然免疫受容体TLR9を刺激することで炎症が生じることが明らかになったことから、細胞死や遊離核酸断片、TLR9などを標的として、新しい糖尿病や動脈硬化の診断法や治療法の開発が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)： We investigated the mechanism by which life style-related diseases cause chronic inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and diabetes mellitus. Overeating, dyslipidemia, and hyperglycemia induced death of vascular cells and adipocytes. Experiments using cultured cells and genetically-modified mice revealed that cell-free DNA released from injured cells stimulated TLR9 on macrophages leading to chronic inflammation in adipose tissues and arteries. It was showed that inhibition of cell death and the inhibitory oligonucleotide against TLR9 would be promising as a new treatment strategy for life style-related diseases.

研究分野：循環器内科学、動脈硬化

キーワード：慢性炎症 動脈硬化 メタボリックシンドローム インスリン抵抗性 肥満 自然免疫 自己核酸 糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は動脈壁、メタボリックシンドロームは脂肪組織における慢性炎症を基盤にしたという概念が確立している。しかし、生活習慣病によって、動脈壁や脂肪組織に如何に慢性炎症が惹起されるのか不明な点が多い。一方、動脈硬化巣内の細胞がアポトーシスやピロトーシス、ネクローシスといった細胞死を起こしており、動脈硬化の進展に関与したことが示唆されている。また、肥満で大型化した脂肪細胞に細胞死が生じており、cell free DNA (cfDNA) といった遊離核酸断片を放出して、マクロファージを脂肪組織へリクルートして活性化していることを申請者は見出した。

2. 研究の目的

本研究では、動脈や脂肪組織において、生活習慣病によって誘導される細胞死と慢性炎症の関連ならびにその分子機序の解明、さらにはそれに基づく治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肥満に伴う脂肪組織の慢性炎症とインスリン抵抗性における cfDNA の役割の検討

野生型マウスと TLR9 欠損マウスに、生後 8 週から高脂肪高スクロース食を 12 週間投与した。経口ブドウ糖負荷ならびに腹腔内インスリン負荷を行い、インスリン抵抗性の推移を検討した。20 週齢において、皮下ならびに内臓脂肪組織、血液を採取した。免疫組織学的手法を用いて、脂肪細胞死、マクロファージ浸潤の程度を比較した。また、抗ペリリン染色や TUNEL 染色を行い、脂肪細胞ならびに浸潤した炎症細胞の傷害度とアポトーシスを評価した。さらには、二重鎖 DNA や一重鎖 DNA に対する抗体を用いた免疫電子顕微鏡を行い、脂肪細胞の死、マクロファージの浸潤、cfDNA の局在を観察した。さらに、炎症惹起物質としての cfDNA の血中濃度を測定した。また、cfDNA が慢性炎症を惹起した標的となる細胞を明らかにするために、野生型マウス (WT) と TLR9 欠損マウス (TLR9KO) 間で、①WT→WT, ②TLR9KO→WT, ③WT→TLR9KO, ④TLR9KO→TLR9KO の骨髄移植を行った。8 週齢から高脂肪高スクロース食を開始して、インスリン抵抗性、脂肪細胞での慢性炎症における、骨髄細胞の TLR9 の役割を明らかにした。

(2) 動脈硬化における cfDNA の役割の検討

動脈硬化惹起性刺激による、血管細胞死と cfDNA への影響を検討した。野生型ならびに ApoE 欠損マウスにおいて、14 ならびに 28 週齢における、血管細胞死ならびに血中の cfDNA 濃度を測定した。また、動脈硬化を著明に促進することが知られているアンジオテンシン II を持続注入して、細胞死と血中 cfDNA 濃度への影響を検討した。

動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスと TLR9 欠損マウスを交配したことで TLR9/ApoE 2 重欠損マウスを作成した。西洋型食餌を 8 週齢から 28 週齢まで与え、大動脈の en face sudanIV 染色ならびに大動脈基部の Oil Red O 染色、sirius red 染色を行い、病変の進行や不安定化を ApoE 欠損マウスと比較検討した。

cfDNA が動脈硬化における慢性炎症を惹起した標的となる細胞を明らかにするために、野生型マウス (WT) と TLR9/ApoE 2 重欠損マウス間で骨髄移植を行い、動脈硬化の進展と不安定化への影響を検討した。

(3) cfDNA によるマクロファージ活性化の作用機序の解明

刺激を受けたり細胞死に至った脂肪細胞から放出された cfDNA がマクロファージを活性化する機序を検討した。3T3L1 脂肪細胞を低酸素、過酸化水素、TNF α 、Angiotensin II などを用いて細胞死を誘導して、培養上清を採取した。また、培養上清を野生型もしくは TLR9 欠損マウス由来マクロファージに添加して、活性化状態を NF κ B やサイトカインの発現で検討した。また、TLR9 に対する inhibitory オリゴヌクレオチドを投与して、cfDNA/TLR9 系の役割を検討した。同様に、培養血管内皮細胞や平滑筋細胞を刺激して培養上清の炎症惹起性を検討した。

(4) 慢性炎症の病態に基づいた、生活習慣病に対する新規制御法の開発

細胞死により遊離される物質とその受容体が、脂肪組織と動脈硬化における慢性炎症の病態が明らかになったら、その受容体もしくはリガンドをブロックしたことにより、慢性炎症を標的とした新規の生活習慣病対策を考案した。

具体的には、TLR9 をブロックしたことが可能かどうかを検証した。予備実験においては、inhibitory オリゴヌクレオチド iODN2088 (5' -tcc tga gct tga agt-3') が CpG-ODN によるマクロファージならびにマウス細胞株 RAW264.7 の活性化を有効にブロックしたことを確認している。そこで、iODN2088 を db/db 肥満マウスの腹腔内へ投与 (150 μ g を週三回) して、脂肪組織での炎症細胞浸潤やインスリン抵抗性が改善されるかどうかをコントロールオリゴヌクレオチドと比較検討した。また、ApoE 欠損マウスに iODN2088 ならびにコントロールオリゴヌクレオ

チドを腹腔内へ投与（150 μ g を週三回）して、動脈硬化の進展と不安定化を抑制したかどうかを検討した。

(5) 統計処理

全ての数値は、平均±標準誤差として表示した。2群間の比較は、unpaired Student's t test で行った。多群間の比較は、one-way analysis of variance (ANOVA)を行ったのち、Tukey test で検定した。二つの変数の関係は、一次回帰分析で行った。P< 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) 肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症の機序に関する研究

① 肥満に伴う脂肪細胞の変性と cfDNA の増加

マウスに高脂肪食(High Fat Diet, HFD)を投与すると、肥大化脂肪細胞が細胞死を起こしていた。また、肥満によってcfDNAとしてのsingle strand (ss) DNA, double strand (ds) DNAの濃度が上昇した(図1上段)。ヒトにおいても内臓脂肪の蓄積に伴って血中のssDNA濃度が上昇した(図1下段)。

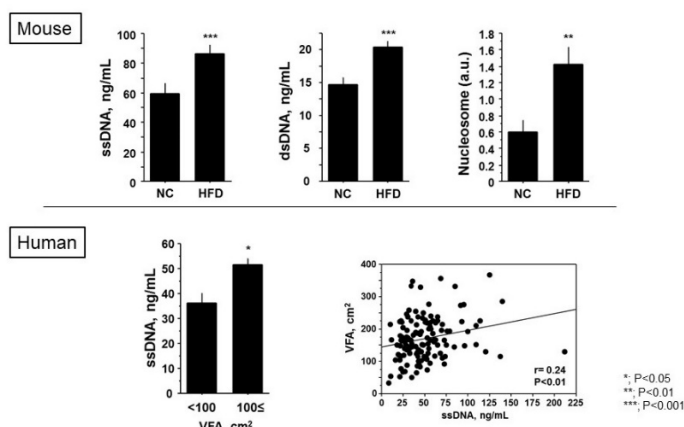


図1. 肥満にともない、cfDNA濃度が上昇する

(上段) マウスに高脂肪食負荷(HFD)を投与すると、血中のssDNA, dsDNA, nucleosomeの濃度が上昇した。(下段) ヒトにおいても内臓脂肪面積(VFA)と血中cfDNA濃度は相関し、インスリン抵抗性と関連した。2群間の比較は、unpaired Student's t testで行った。二つの変数の関係は、一次回帰分析で行った。

② TLR9欠損マウスにおける脂肪組織における炎症の減弱とインスリン抵抗性の減弱

野生型マウスとTLR9欠損マウスに高脂肪食(HFD)を投与したところ、TLR9欠損マウスでは、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤とインスリン抵抗性が軽減していた(図2)。また、骨髓移植の実験によって、骨髓由来細胞に発現しているTLR9が、肥満に伴う、脂肪組織での炎症とインスリン抵抗性の発現に重要であることが明らかになった。

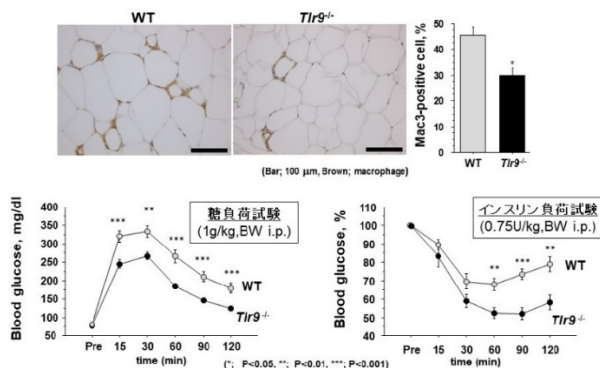


図2. 肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症とインスリン抵抗性に関して、野生型とTLR9欠損マウスの比較

(上段) TLR9欠損マウスにおいては、野生型マウスに比較して、肥満に伴うマクロファージの浸潤が軽減していた。2群間の比較は、unpaired Student's t testで行った。

(下段) TLR9欠損マウスにおいては、肥満に伴うインスリン抵抗性が軽減していた。2群間の比較は、unpaired Student's t testで行った。

(2) 脂肪細胞由来の cfDNA がマクロファージを活性化する機序の検討

3T3-1 脂肪細胞培養液の上清を、野生型ならびに TLR-9 欠損マウス由来のマクロファージに添加すると、炎症性サイトカインの産生が増加した。脂肪細胞を TNF α で刺激するとその程度は増加した。また、TLR9 欠損マウス由来のマクロファージでは軽減していた (図 3)。

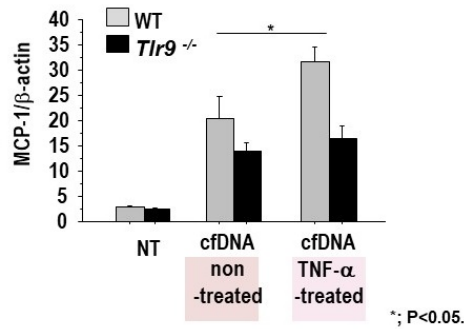


図 3. 3T3L1 脂肪細胞培養上清によるマクロファージの活性化

3T3L1脂肪細胞培養上清中のDNAを濃縮して、野生型ならびにTLR9欠損マウス由来のマクロファージに添加したところ、MCP-1の産生が亢進した。脂肪細胞をTNF- α で傷害しておくとその程度が増強した。脂肪細胞培養上清によるマクロファージ活性化作用は、TLR9欠損マウス由来のマクロファージでは減弱していた。多群間の比較は、one-way analysis of variance (ANOVA)を行ったのち、Tukey test で検定した。

(3) 動脈硬化における慢性炎症の機序に関する研究

生活習慣病によってどのようにして慢性炎症が惹起されるのかを検討した。肥満に伴って脂肪組織から自己由来の遊離核酸断片 (cell free DNA, cfDNA)が放出され、本来、病原体由来のDNA断片を認識するToll様受容体-9 (TLR9)をcfDNAが活性化し、脂肪組織での慢性炎症ならびにインスリン抵抗性が引き起こされた。

また、アポリポ蛋白E欠損 (ApoE KO) マウスにAngiotensin II (Ang II)を投与することで、血漿中の1本鎖DNAなどのcfDNAが増加した。大動脈において、cfDNAの受容体となりうるTLR9の発現がAng II投与により有意に増加し、主たる発現細胞はマクロファージであった。TLR9/ApoE 2重欠損 (dKO) マウスを確立し、Ang II投与下で誘導される動脈硬化病変を解析した。両群間で体重、血圧、血漿脂質値に差を認めなかったが、TLR9/ApoE dKOマウスの動脈硬化病変およびプラーク内脂質量は、ApoE KOマウスに比べて有意に少なかった。また、TLR9/ApoE dKOマウスの腹部大動脈において、MCP-1などの炎症性物質の発現やマクロファージの浸潤が減少していた。さらに、骨髄移植実験により、血管壁より骨髄のTLR9が重要であることが明らかとなった。また、TLR9のアゴニストやAng IIなどで傷害を与えた血管内皮細胞を用いてマクロファージを刺激することで、NF- κ Bシグナルの活性化が認められ、TNF- α やMCP-1などの炎症関連分子の発現が有意に増加した。

以上より、血管傷害により遊離したcfDNAが、マクロファージTLR9を活性化し血管の炎症を惹起し、動脈硬化の進展を促進することが示唆された。

(4) TLR9/cfDNA をターゲットとした生活習慣病の治療法の開発

① 肥満に伴う脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性に対する戦略

マウスに、TLR9の阻害作用のあるオリゴヌクレオチドを腹腔内に週3回注射すると、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤とインスリン抵抗性が改善した (図 4)。

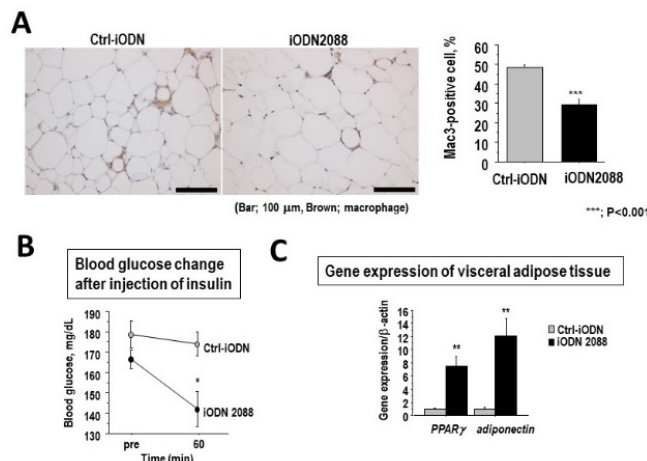


図4. TLR9 阻害オリゴヌクレオチドによる炎症抑制効果

マウスの腹腔内にTLR9阻害オリゴヌクレオチドiODN2088を投与したところ、肥満に伴う脂肪細胞の炎症が抑制された (A)。また、iODN2088の投与は、インスリン抵抗性を改善して (B)、脂肪組織でのインスリン感受性改善遺伝子の発現を増強した (C)。2 群間の比較は、unpaired Student's t test で行った。

② 肥満に伴う脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性に対する戦略

ApoE 欠損マウスに、TLR9 の阻害作用のあるオリゴヌクレオチドを腹腔内に週3回注射すると、動脈硬化性病変の進行が抑制された。また、動脈硬化プラーク内へのマクロファージの浸潤が減弱し、脂肪蓄積が抑制された。また、炎症性サイトカインやMMP9の発現が抑制された。

考察

本研究においては、肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症とそれに伴うインスリン抵抗性に、肥大した脂肪細胞から放出される自己DNAが、マクロファージの自然免疫受容体TLR9を刺激すること示された。また、TLR9阻害することが、肥満に伴うインスリン抵抗性の改善に重要であることが明らかになった。同様に、動脈硬化においても、アンジオテンシンIIなどの動脈硬化惹起物質が、血管細胞のアポトーシスなどの細胞死を誘導して自己DNAを増加させた。

TLR9は本来、外来性病原体のDNAを認識する自然免疫に重要な受容体である。最近の報告では、TLRファミリーのTLR4が遊離脂肪酸を認識して、脂肪組織での慢性炎症の悪循環に関与することが示されている [2]。今回、我々の研究によって、生活習慣病によって、脂肪細胞や血管細胞の細胞死を引き起こし、そこから放出されるDNAが自然免疫受容体TLR9を活性化し、慢性炎症を惹起することが明らかとなった。我々の研究によって、生活習慣病によって生じるインスリン抵抗性、動脈硬化を防ぐうえで、自己DNA/TLR9系がキーとなる経路であることが明らかとなった。今後、自己DNA/TLR9系を標的として、新たな生活習慣病の合併症治療法の開発が行われることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 91 件)

1. [Fukuda D](#), Nishimoto S, Aini K, Tanaka A, Nishiguchi T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Masuda K, Naruto T, Tanaka K, Higashikuni Y, [Hirata Y](#), Yagi S, Kusunose K, Yamada H, [Soeki T](#), Imoto I, Akasaka T, Shimabukuro M, [Sata M](#): Toll-Like Receptor 9 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Atherosclerosis, *J Am Heart Assoc* (査読有) 8, 2019: e010860. doi: 10.1161/JAHA.118.010860.
2. Hara T, Phuong PT, [Fukuda D](#), Yamaguchi K, Murata C, Nishimoto S, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, [Soeki T](#), Wakatsuki T, Imoto I, Shimabukuro M, [Sata M](#): Protease-Activated Receptor-2 Plays a Critical Role in Vascular Inflammation and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*, (査読有) 138, 2018: 1706-1719. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033544.
3. Ganbaatar B, [Fukuda D](#), Salim HM, Nishimoto S, Tanaka K, Higashikuni Y, [Hirata Y](#), Yagi S, [Soeki T](#), [Sata M](#): Ticagrelor, a P2Y12 antagonist, attenuates vascular dysfunction and inhibits atherogenesis in apolipoprotein-E-deficient mice. *Atherosclerosis* (査読有) 275, 2018:124-132. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.053.
4. Tanaka K, [Sata M](#): Roles of Perivascular Adipose Tissue in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Front Physiol* (査読有) 9, 2018: 3. doi: 10.3389/fphys.2018.00003.
5. Nishimoto S, Aini K, [Fukuda D](#), Higashikuni Y, Tanaka K, [Hirata Y](#), Yagi S, Kusunose K, Yamada H, [Soeki T](#), Shimabukuro M, [Sata M](#): Activation of Toll-Like Receptor 9 Impairs Blood Flow Recovery After Hind-Limb Ischemia. *Front Cardiovasc Med*. (査読有) 5, 2018: 144. doi: 10.3389/fcvm.2018.00144.
6. Hara T, [Fukuda D](#), Tanaka K, Higashikuni Y, [Hirata Y](#), Yagi S, [Soeki T](#), Shimabukuro M, [Sata M](#): Inhibition of activated factor X by rivaroxaban attenuates neointima formation after wire-mediated vascular injury. *Euro J Pharmacol*. (査読有) 820, 2018: 820:222-228 doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.037.
7. Kusunose K, Yamada H, Nishio S, Ishii A, Hirata Y, Seno H, Saijo Y, Ise T, Yamaguchi K, Yagi S, [Soeki T](#), Wakatsuki T, [Sata M](#): RV Myocardial Strain During Pre-Load Augmentation Is Associated With Exercise Capacity in Patients With Chronic HF. *JACC Cardiovasc Imaging*. 10(10 Pt B) (査読有) ,

2017: 1240-1249. doi: 10.1016/j.jcmg.2017.03.022.

8. Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama J, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakae H, Shimabukuro M, Sata M: Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv*. (査読有) 2, 2016: e1501332. doi: 10.1126/sciadv.1501332.
9. Takashima A, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Taketani Y, Shimabukuro M, Sata M: Combination of n-3 polyunsaturated fatty acids reduces atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting macrophage activation. *Atherosclerosis*. (査読有) 254, 2016: 142-150 doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.002.
10. Niki T, Wakatsuki T, Yamaguchi K, Taketani Y, Oeduka H, Kusunose K, Ise T, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Sata M: Effects of the addition of eicosapentaenoic acid to strong statin therapy on inflammatory cytokines and coronary plaque components assessed by integrated backscatter intravascular ultrasound. *Circ J*. (査読有) 80, 2016: 450-460. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0813.

[学会発表] (計 285 件)

1. Sata M. Role of epicardial fat in cardiovascular disease. ESC2018, Munich, August 25-28, 2018
2. Sata M. "Role of innate immunity in chronic inflammation in arterial wall and adipose tissue." 19th International Vascular Biology Meeting, Boston, America, October 30-November 3, 2016

[図書] (計 1 件)

1. Sata M, Tanaka K, Fukuda D. Wire-mediated endovascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. In Sata M ed. *Mouse Models of Vascular Diseases*. Springer Japan, Tokyo, 2016. pp. 3-20.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：福田 大受
ローマ字氏名：(FUKUFA, Daiju)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院医歯薬学研究部 (医学系)
職名：特任講師
研究者番号 (8 桁)：40637568

研究分担者氏名：添木 武
ローマ字氏名：(SOEKI, Takeshi)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院医歯薬学研究部 (医学系)
職名：准教授
研究者番号 (8 桁)：60393211

研究分担者氏名：平田 陽一郎
ローマ字氏名：(HIRATA, Yoichiro)
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：40447397

※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、研究者個人に帰属されます。