

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19651

研究課題名(和文) 動脈硬化早期における未知の内因性NOD1リガンドの検索

研究課題名(英文) Search for unknown endogenous NOD1 ligands acting in the early stage of atherosclerosis

研究代表者

神野 俊介 (KANNO, SHUNSUKE)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60725919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のペプチドグリカン断片を認識するNOD1という自然免疫受容体は早期から動脈硬化病変の進展に寄与する。無菌状態において、Apoeノックアウトマウスにおける動脈硬化病変の進展に対するNod1ノックアウトの効果を調べた。その結果、無菌状態においても、NOD1ノックアウトにより動脈硬化は有意に軽減していた。この結果からは、内因性NOD1リガンドが動脈硬化の進展に寄与することが示唆される。しかし、動脈硬化病変の組織のNOD1活性はNOD1レポーター細胞の感度以下であり、プラークにおけるNOD1リガンドはごく微量である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-1, which is an innate immune receptor recognizing bacterial peptidoglycan fragments, contributes to the development of atherosclerosis from early stage. Under germ-free condition, we analyzed the effect of Nod1 deficiency on the development of atherosclerosis in Apoe^{-/-} mice. Nod1 deficiency resulted in reduced development of atherosclerotic lesions in Apoe^{-/-} mice even without a microbiota. This result suggests the contribution of endogenous Nod1 ligands to the development of atherosclerosis. But we failed to determine the NOD1-stimulatory activity of mice atherosclerotic plaque by a bioassay using NOD1-expressing HEK293 cells, suggesting that the Nod1-stimulatory activity of Apoe^{-/-} mice plaque might be very low.

研究分野：感染免疫

キーワード：NOD1 動脈硬化 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は小児期より進行しており、小児期からの動脈硬化の予防戦略が重要である。動脈硬化の病態における、自然免疫系の受容体 Toll-like receptor の関与についての報告は今まで多数なされている (Ikeda K, et al. *Clin Immunol.* 2010)。しかし、同じ自然免疫受容体である NOD1 と動脈硬化については、直接、in vivo でその効果を示した報告はなかった。

我々は NOD1 の合成リガンド FK565 を用いた血管炎マウスモデルを完成させ (Nishio H, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011)、この FK565 を動脈硬化のモデルマウスである *ApoE*^{-/-} マウスに投与することで、NOD1 が動脈硬化病変の早期発症に寄与することを報告した。また、同時に、*Nod1* ノックアウトが動脈硬化を軽減することも証明し、これらは NOD1 が動脈硬化の進展に関わることを直接、in vivo で初めて証明した報告となった。(Kanno S, et al. *J Immunol.* 2015) NOD1 は細菌のペプチドグリカン断片を認識し、NOD1 のリガンドとなりうるペプチドグリカン断片はヒトの常在菌から産生・放出される。そのため、我々は、無菌状態において、*Nod1* ノックアウトによる動脈硬化の軽減効果が消失することを証明するため、*ApoE*^{-/-} マウスと *ApoE*^{-/-}・*Nod1*^{-/-} マウスを無菌状態で飼育して動脈硬化病変を比較した。その結果、驚くべきことに、無菌状態においても、NOD1 ノックアウトにより動脈硬化は軽減しており、これは動脈硬化モデルマウスにおける、内因性 NOD1 リガンドの存在を示唆する。

ApoE は、コレステロールや脂肪酸の運搬に関わるリポ蛋白で、ノックアウトしたマウスは、普通食で飼育しても VLDL やカイロミクロンが著しく上昇し、動脈硬化を発症する (Pendse AA, et al. *J. Lipid Res.* 2009)。また、*ApoE* は、アミロイド蛋白のクリアランスに関与しており、ノックアウトしたマウスはアミロイド蛋白が蓄積する (LaFerla FM, et al. *N Engl J Med.* 2012)。

このように、血清脂質やアミロイド蛋白を含む、*ApoE*^{-/-} マウスにおいて上昇する物質が NOD1 の内因性リガンドとして作用する可能性が考えられる。動脈硬化の病態において、自然免疫系受容体である Toll-like receptor は、様々な内在性のダメージ関連分子パターン (DAMP) を認識する (Schaefer L. *Curr Opin Pharmacol.* 2010)。また、自然免疫受容体 NLRP3 もコレステロール結晶を認識して動脈硬化の進展に寄与する (Duell P, et al. *Nature* 2010)。一方、NOD1 については、動脈硬化に限らず、今まで内因性リガンドの報告はない。

2. 研究の目的

動脈硬化の動物モデルにおいて、未知の内因性 NOD1 リガンドの探索を行い、その内因性リガンドと動脈硬化発症の関係を明らかに

する。

3. 研究の方法

(1) 無菌マウスにおける、*Nod1* ノックアウトによる動脈硬化病変の軽減効果の再現性の確認

ApoE^{-/-} マウスと *ApoE*^{-/-}・*Nod1*^{-/-} マウスを無菌状態で飼育して、大動脈起始部における動脈硬化病変を比較する。

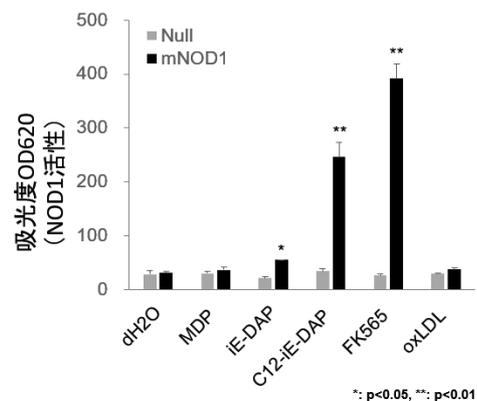
(2) *ApoE*^{-/-} マウスのプラークや血管組織におけるリガンドの検索

組織からの脂溶性/水溶性分画の抽出
SPF で飼育された *ApoE*^{-/-} マウスのプラークを含む血管組織からクロロフォルムとメタノール、水を用いて、脂溶性分画と水溶性分画を抽出する。脂溶性分画はさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーや Agilent 1200 HPLC 装置を用いて、各層に分離してレポーター細胞で NOD1 活性を測定し、NOD1 活性の高い fraction を質量分析法で解析する。

レポーター細胞による解析

HEK-Blue™ mNOD1 cell および null cell を用いて、組織より抽出した各成分の NOD1 活性を調べる。

レポーター細胞によるNOD1活性の測定



LC-MS による解析

当教室にある Agilent 1200 HPLC と Esquire 6000 を用いた液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) によりマススペクトルを解析することで物質を同定する。これにより高い NOD1 活性を持つ物質が特定できれば、濃縮し構造解析を行う。

(3) リガンドが非細菌由来である確認

無菌状態で飼育した *ApoE*^{-/-} マウスにおける組織を用いて、実験(2)を行う。

(4) 既報の物質からの検索

TLR2、TLR4、NLRP3 などの自然免疫系受容体で既に報告のある内因性リガンドのうち、購入可能な物質の NOD1 活性を確認する。

(5) NOD1 内因性リガンド物質の特異性の確認 (in vitro)

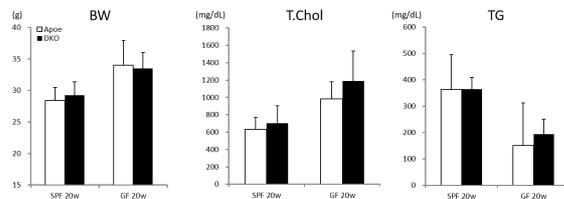
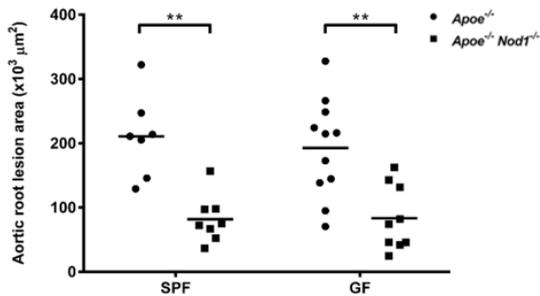
NOD1 の siRNA を導入した単球や血管内皮細胞において、NOD1 の内因性リガンドとして同定された物質による炎症の惹起が起らないことを確認し、リガンド物質の NOD1 特異性を確認する。

(6) NOD1 内因性リガンド物質の特異性の確認 (in vivo)

C57BL6 WT マウスおよび *Nod1*^{-/-}マウスを用いて、NOD1 の内因性リガンドとして同定された物質の投与による血管炎の惹起が *Nod1*^{-/-}マウスでは起らないことを確認し、リガンド物質の NOD1 特異性を確認する。

4. 研究成果

未知の内因性 NOD1 リガンドが存在し動脈硬化の進展に関与するという仮説を証明するため、無菌環境 (Germ-free, GF) という外因性 NOD1 リガンドのない状態において、*Apoe*^{-/-}マウスと *Apoe*^{-/-}・*Nod1*^{-/-}(DKO)マウスの動脈硬化病変の比較実験を行った。その結果、無菌環境においても体重、血清脂質の有意な差なしに *Nod1* ノックアウトにより動脈硬化病変 (プラーク) の有意な軽減効果が見られることを確認できた。

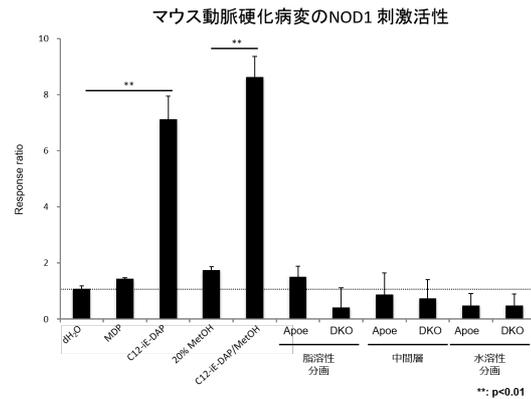


この結果は、細菌のペプチドグリカンに由来するとされる従来の外因性 NOD1 リガンド以外の、内因性 NOD1 リガンドが存在すること、そしてその内因性リガンドが動脈硬化の進展に関与することを示唆する。

この内因性リガンドの検索のため、NOD1 レポーター細胞を用いて、通常飼育下の *Apoe*^{-/-}マウスから組織を摘出し、組織をホモジナイズして酢酸エチルで脂溶性、中間層、水溶性成分を分離した後、濃縮を行い、NOD1 レポーター細胞で活性を測定した。

いずれの抽出層の反応も、Null 細胞におけ

る反応と有意な差はなく、脱塩の過程を経ると感度が低下することがわかった。組織中のリガンド量が HEK-Blue mNOD1 cell の感度以下である可能性を考慮し、組織量を増やし同様の分離・濃縮を行ったが、やはりいずれの抽出層の反応も、Null 細胞における反応との比に有意な変化はなく(下図)、リガンド量、および抽出法の効率の問題と考えられた。



以上の結果からは、ごく微量の内因性リガンドの慢性的な刺激が動脈硬化の進展に関与する可能性が示唆される。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

九州大学医学部小児科

<https://pediatr.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神野 俊介 (KANNO SHUNSUKE)

九州大学大学院・医学研究院・助教

研究者番号：60725919

(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