

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09589

研究課題名(和文) 超分子を用いた新しい動脈硬化治療・予防法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for atherosclerosis

研究代表者

大石 由美子(Oishi, Yumiko)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：80435734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性心疾患は、動脈硬化プラークの破綻を契機に発症する。従って、プラークの安定化は心血管イベントのリスク軽減に最も重要である。マクロファージは、動脈硬化プラークを制御する。本研究では、マクロファージが炎症刺激を受けて活性化すると細胞内のコレステロールが増加することに注目した。新たに開発した、細胞内コレステロールを低下させる機能をもつ超分子ポリロタキサン(PRX)は、マクロファージの炎症応答を抑制した。さらに、PRXを投与することによって、モデルマウスにおける動脈硬化プラーク形成が有意に抑制された。細胞内コレステロールが動脈硬化に対する新たな予防・治療標的として有用である可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清コレステロール量が過剰になると、動脈硬化プラークの形成が促進されることは以前から知られていた。ところが、本検討の結果、血清レベルのみならず、マクロファージの細胞内コレステロールの増加が、マクロファージの活性化に必須であることが明らかとなった。細胞内コレステロール量の制御による、動脈硬化に対する新たな治療法の開発へと展開しうる、重要な意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Recent studies unraveled that cellular metabolism is tightly linked to activation of immune cells. While accumulation of extracellular/intracellular cholesterol has been shown to lead to macrophage activation and dysfunction, the underlying mechanisms remain incompletely understood. Here, we provide evidence that cellular cholesterol is required for macrophage activation. Accordingly, suppression of cholesterol accumulation by a novel supramolecular compound, polyrotaxane (PRX) inhibited Myd88-dependent macrophage inflammatory activation. Moreover, PRX treatment inhibited atherosclerotic plaque formation in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. The finding that dynamic changes in cellular cholesterol directly regulate Myd88-dependent inflammatory programs in macrophages suggests the potential for new therapeutic and diagnostic approaches for chronic inflammatory diseases, such as atherosclerosis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は、動脈硬化性プラークの破綻を原因として発症する。脂質異常症は動脈硬化性プラークの形成を促進する。ところが、いかに血中 LDL 値を厳格にコントロールしても心血管イベントの発症抑制効果は約 30%にとどまり、リスクの高い家族性高コレステロール血症患者での効果は限定的であることから、プラークを安定化させ、心血管イベントの発症を防ぐ予防・治療法の確立が急務である。

申請者は、これまで動脈硬化や生活習慣病の基盤病態である「慢性炎症」の分子機構について、特にマクロファージの機能に着目し研究を進めてきた。マクロファージの機能は多彩で、刺激に応答し炎症反応を引き起こすのみならず、炎症反応を積極的に収束する機能を併せ持つ。またマクロファージの細胞機能としての炎症応答は、細胞内脂質代謝と密接に連携している。炎症応答の後期に、マクロファージは抗炎症性脂肪酸の合成を高め、炎症収束形質へと変化するプログラムを備えることを報告した(Oishi et al. *Cell Metab* 2017)。

一方、マクロファージが炎症刺激を受けると細胞内コレステロールが増加する。また、細胞内コレステロールが過剰になるとコレステロール結晶が形成されやすくなり、マクロファージの活性化を促す原因となる。従って、マクロファージの細胞内コレステロール代謝を制御することによって、マクロファージの機能を安定化させることが可能ではないかと考えた。

そこで私たちは、コレステロールと包接錯体を形成するβシクロデキストリン(βCD)の特性を活かし、これを細胞内環境で分解されるポリマー鎖で連結することによって、細胞内脂質に直接アプローチし、高いコレステロール排出能をもつ超分子ポリロタキサン(PRX)を開発した。PRX はエンドサイトーシスによって効率よく細胞内へ取り込まれ、エンドソームでβCD を放出することにより、細胞内コレステロールの排泄を促進する(図 2)。βCD はリソソーム病の一種であるニーマンピック病に唯一の治療薬として臨床応用されているが、細胞膜を構成する脂質と作用し細胞毒性を呈するという大きな欠点があった。ところが PRX は細胞膜にほとんど作用しないことから細胞毒性が低い反面、細胞内コレステロールの排泄促進作用は約 100 倍高く、ニーマンピック病モデルマウスの生存率を有意に向上させた(Tamura et al. *Sci Rep* 2014)。動脈硬化プラークを構成するマクロファージに対しても PRX が有効であれば、細胞内コレステロールの排泄を促進しマクロファージ機能を安定化させることによってプラークの進展を抑制し、安定化させられる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、動脈硬化プラークを構成する泡沫化マクロファージにおける、PRX の効果と

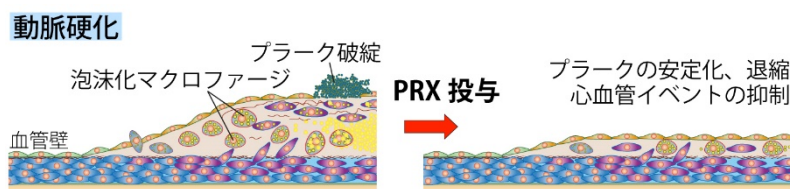


図 1 本研究の目的

その分子機構を明らかにする。また、プラークの抑制効果を *in vivo* モデルを用いて検証する。本検討を通じ、細胞内脂質代謝を標的とした、新たな動脈硬化症に対する治療概念を提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

①初代培養マクロファージを用いた検討

C57BL/6 マウスから骨髓細胞を採取し、M-CSF 添加培地で 1 週間培養してマクロファ-

ジに分化させた。この bone marrow derived macrophage (BMDM) を実験に用いた。LPS を用いて TLR4 を活性化したときの細胞内コレステロール量を、フィリピン染色を用いて定量解析した。また、活性化時における遺伝子発現の変化を、定量的 PCR 法を用いて評価した。BMDM に PRX を処理した後に、LPS を用いて炎症を惹起した場合の細胞内コレステロール量の変化と遺伝子発現の変化を同様に評価した。

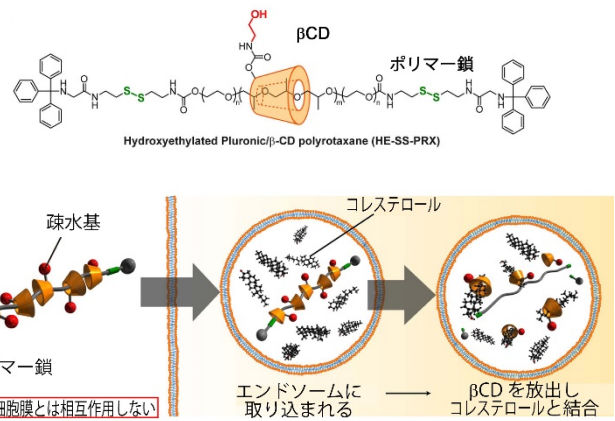


図2 ポリロタキサン(PRX)の構造と動態

#### ②動脈硬化モデル *LDLR*<sup>-/-</sup>マウスを用いた検討

高コレステロール食を負荷すると、大動脈にアテローム性動脈硬化病変を形成する *Ldlr*<sup>-/-</sup>マウスを用いた。6週齢から11週間にわたり、PRX (1g/kg・BW) を隔日投与 (皮下注射) した。対照群には、生理食塩水を投与した。17週齢で大動脈を採取し、動脈硬化プラークの形成を Oil-Red O 染色を用いて評価した。

### 4. 研究成果

(1) PRX は炎症刺激による細胞内コレステロールの増加を抑制し、マクロファージの活性化を抑制する

初代培養マクロファージに Toll-like receptor (TLR)4 アゴニスト LPS による活性化刺激を加えると、細胞内コレステロールが有意に増加した。しかし、PRX をあらかじめ投与した上で LPS 刺激を加えると、細胞内コレステロールの上昇が有意に抑制された。

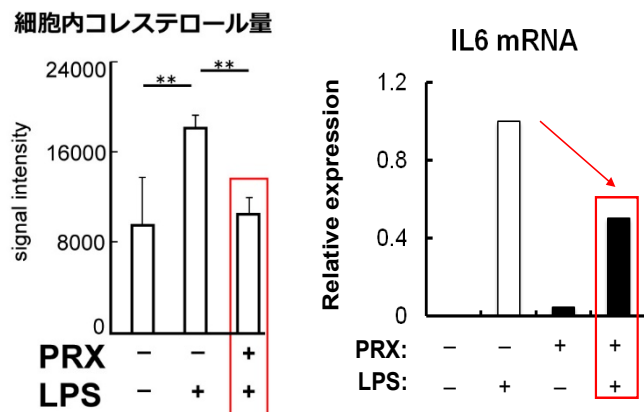


図3 PRX は細胞内コレステロール量を低下し、IL-6 発現を抑制

同様に、LPS 刺激を与えてマクロファージを活性化すると、炎症性サイトカイン IL-6 の発現が上昇する。ところが、PRX を投与した細胞では、LPS による IL-6 の発現誘導が有意に抑制された。これらの結果から、PRX は、炎症活性化による細胞内コレステロールの上昇を抑制することによって、マクロファージの活性化と炎症性サイトカインの発現誘導を抑制すると考えられた。

#### (2) PRX は *LDLR* 欠損マウスにおける動脈硬化プラークの形成を抑制した

*Ldlr*<sup>-/-</sup>マウスを高コレステロール食を用いて飼育し、コントロール群、PRX 投与群の2群に分けた。6週令から17週令まで、PRX 投与群には PRX (1g/kg・BW) を、コントロール群には生理食塩水を一日おきに皮下投与した。PRX は、血中脂質プロファイルに影響を与えなかった。11週間の PRX 投与後に

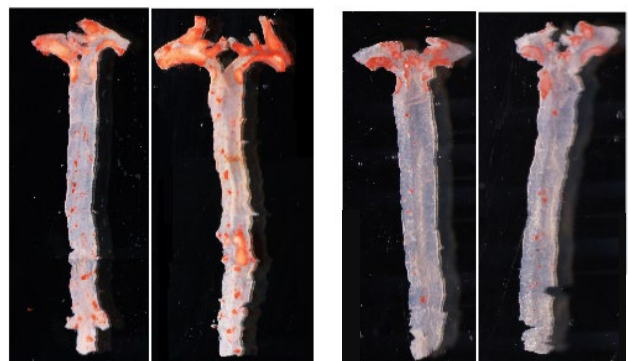


図4 PRX は大動脈におけるプラーク形成を抑制 (左:コントロール、右:PRX 投与群)

大動脈を採取しプラーク形成を評価したところ、PRX 投与群では対照群に比べてプラーク面積が有意に減少した。また、プラークへのマクロファージの集積も有意に抑制された。この結果から、PRX を投与しマクロファージの細胞内コレステロールを低下させることによって、*Ldlr*<sup>-/-</sup>マウスの動脈硬化プラーク形成を有意に抑制できることが明らかとなった。

<引用文献>

1. Oishi Y, Spann, NJ, Link VM, Muse ED, Strid T, Edillor C, Kolar MJ, Matsuzaka T, Hayakawa S, Tao J, Kaikkonen M, Carlin A, Lam MT, Manabe I, Shimano H, Saghatelian A and Glass CK. SREBP1 contributes to resolution of pro-inflammatory TLR4 signaling by reprogramming fatty acid metabolism. *Cell Metab*, 25:412-427, 2017.
2. Tamura A, Yui N. Lysosomal-specific cholesterol reduction by biocleavable polyrotaxanes for ameliorating Niemann-Pick type C disease. *Sci Rep* 4: 4356, 2014.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Orekhov AN, Oishi Y, Nikiforov NG, Zhelankin AV, Dubrovsky L, Sobenin IA, Kel A, Stelmashenko D, Makeev VJ, Foxx K, Jin X, Kruth HS, Bukrinsky M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Modified Ldl Particles Activate Inflammatory Pathways In Monocyte-Derived Macrophages: Transcriptome Analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Pharm Des	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1381612824666180911120039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 2. Orekhov A, Pushkarsky, T, Oishi Y, Nikiforov N, Zhelankin A, Duborovsky L, Makeev V, Foxx K, Jin X, Kruth H, Sobenin I, Sukhorukov V, Burkinsky M.	4. 巻 105
2. 論文標題 HDL activates expression of genes stimulating cholesterol efflux in human monocyte-derived macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Mol Pathol.	6. 最初と最後の頁 202-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oishi Y. and Manabe I	4. 巻 30
2. 論文標題 Macrophages in inflammation, repair and regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 511-528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1093/intimm/dxy054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oishi Y. and Manabe I	4. 巻 10
2. 論文標題 Kruppel like factors in metabolic homeostasis and cardiometabolic diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in cardiovascular medicine.	6. 最初と最後の頁 3389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10:3389/fcvm.2018.00069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oishi Y, Hayashi S, Isagawa T, Oshima M, Iwama A, Shimba S, Okamura H and Manabe I.	4. 巻 7
2. 論文標題 Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07100-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa S, Oishi Y, Tanabe H, Isemura M, Suzuki Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 Tea, Coffee and Health Benefits. Bioactive Molecules in Food	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reference Series in phytochemistry	6. 最初と最後の頁 1-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-319-54528-8_14-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yumiko Oishi
2. 発表標題 Coordinated regulation of inflammatory response and lipid metabolism
3. 学会等名 2018 annual spring scientific conference of the Korean society of cardiology, symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Oishi
2. 発表標題 Coordinated regulation of inflammatory response and lipid metabolism as a novel therapeutic target for metabolic diseases in the geriatrics
3. 学会等名 Asian Pacific Society of Cardiology Congress 2018. Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 Coordinated Regulation of Inflammatory Response and Lipid Metabolism in Macrophages
3. 学会等名 第83回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 脂質がつなく「免疫-代謝」連携と組織修復
3. 学会等名 日本薬学会第139回年会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 組織恒常性における「免疫-代謝」連関
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会 ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Oishi
2. 発表標題 KLF5 in muscle development and regeneration
3. 学会等名 The 6th International Conference on biology and pathobiology of KLF/Sp transcription factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 マクロファージの機能異常と病態形成
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会 シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Oishi
2. 発表標題 Immunometabolism in macrophage as a novel therapeutic target of metabolic syndrome
3. 学会等名 第2回 日本循環器学会基礎研究フォーラム シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 免疫-代謝の連携から加齢関連疾患の病態を考える
3. 学会等名 第33回 老化促進モデルマウス(SAM)学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 生活習慣病による「免疫・代謝」連関
3. 学会等名 第39回 日本炎症・再生医学会 シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 食餌性脂質による慢性炎症の制御
3. 学会等名 第18回 日本抗加齢医学会総会 若手プログラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 マクロファージによる 代謝・炎症・再生連関
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会学術集会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 脂質代謝がつなく「免疫-代謝」連携のメカニズムと生活習慣病治療への応用
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 脂肪酸代謝のリプログラミングは炎症の収束に必須である
3. 学会等名 第95回日本生理学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 Coordinated regulation of inflammatory response, lipid metabolism and circadian rhythm as a novel therapeutic target of metabolic syndrome.
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 マクロファージにおける細胞代謝-機能連携のメカニズム
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 加齢関連疾患に対する新たな治療標的としての「免疫-代謝」連関のメカニズム
3. 学会等名 CVMW2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 自然免疫応答の収束に重要な「細胞代謝-機能連携」の分子機構
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 免疫応答を制御する核酸および核酸の加工法	発明者 大石由美子、早川清雄	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-049827	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 筋サテライト細胞の培養方法	発明者 大石 由美子、林晋一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-121787	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

日本医科大学生化学・分子生物学（代謝・栄養学）分野ホームページ <a href="https://www.nms.ac.jp/college/schoolroom/kisoigaku/taisya-eiyougaku.html">https://www.nms.ac.jp/college/schoolroom/kisoigaku/taisya-eiyougaku.html</a> 日本医科大学生化学・分子生物学（代謝・栄養学）分野ホームページ <a href="https://www.nms.ac.jp/college/schoolroom/kisoigaku/taisya-eiyougaku.html">https://www.nms.ac.jp/college/schoolroom/kisoigaku/taisya-eiyougaku.html</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----