

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09863

研究課題名(和文) 動脈硬化巣局所のマクロファージ増殖におけるSkp2の役割の解明と治療への応用

研究課題名(英文) The role of Skp2 in macrophage proliferation in atherosclerotic lesion

研究代表者

石井 規夫 (ISHII, NORIO)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：10599111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化モデルマウスの動脈硬化巣の増殖マクロファージではユビキチンリガーゼSkp2発現が増加していることが観察された。またマクロファージにおいて増殖刺激によりSkp2発現の増加を認める一方で、AMPK刺激による増殖抑制状態のマクロファージではユビキチン化低下に伴うp27kip発現量の増加を認めた。p27kipはマクロファージでは元々の発現が弱く増殖刺激での変化は観察されなかったがAMPK活性誘導による増殖抑制によりその発現が増加した。AMPK刺激はSkp2によるp27kipユビキチン化低下に伴うp27kip発現量の増加を認め、最終的に細胞周期G1 arrestを誘導している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化における巣増殖マクロファージではユビキチンリガーゼSkp2発現が増加しており、AMPK刺激による増殖抑制は、Skp2によるp27kipユビキチン化低下に伴うp27kip発現増加を認め、最終的に細胞周期G1 arrestを誘導する可能性が示された。今回の研究を通じて動脈硬化症の発症・進展においてマクロファージのAMPK、Skp2およびp27kipが重要な役割を担っていることを明らかにした。マクロファージ増殖阻害を介して動脈硬化症の発症・進展を抑制するという新たな治療法の確立においてAMPK、Skp2およびp27kipが有力な分子標的となり得ることが証明された。

研究成果の概要(英文)：The presence of proliferating macrophages in the atherosclerotic lesion of atherosclerosis model mice was confirmed, and these macrophages had a high proportion of Skp2 expression. On the other hand, proliferation-suppressed macrophages showed increased ubiquitination of p27kip, whereas p27kip was less endogenously expressed in macrophages and was not altered by proliferation stimulation, but its expression was increased by induction of AMPK activity. Macrophages overexpress Skp2 in response to proliferation stimulation; stimulation by AMPK suppresses ubiquitination-mediated p27kip expression, while simultaneously increasing p27kip expression and ultimately causing G1 arrest of the cell cycle. AMPK and Skp2 may be novel therapeutic target molecules for atherosclerosis in that they suppress atherosclerosis via M proliferation inhibition.

研究分野：内科系臨床医学 脂質代謝異常 動脈硬化症

キーワード：動脈硬化症 マクロファージ 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

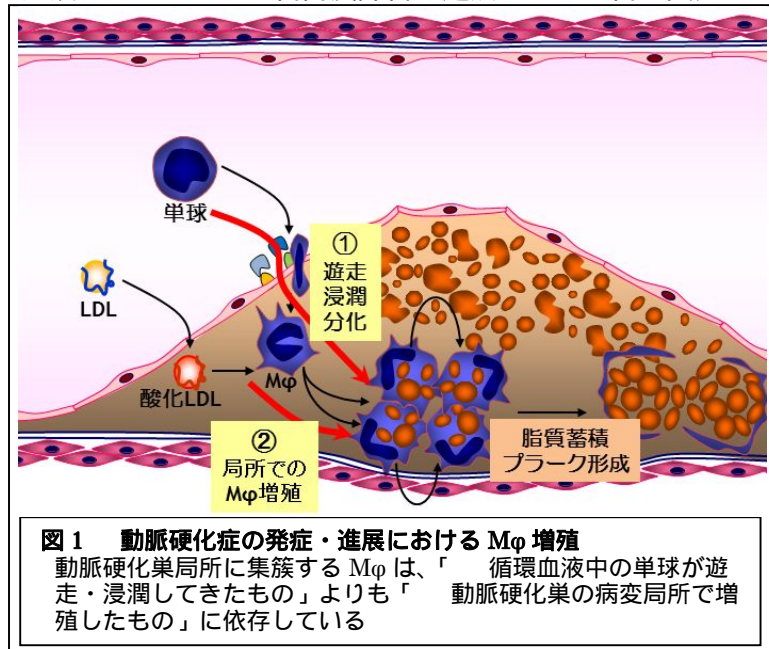
1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞・脳梗塞を代表とする動脈硬化性疾患は致死的でありかつ患者の QOL に多大な影響を与える。現在わが国を含む先進諸国では食生活の充実や利便性の高い生活スタイルへの変化により、脂質異常症や糖尿病、高血圧といった生活習慣病が急増し、それに伴い動脈硬化性疾患患者数も急増しており、その発症・進展予防は重要な臨床的課題である。

1) 動脈硬化症発症・進展における M ϕ 増殖

現在のところ、動脈硬化症発症・進展メカニズムは血管内皮障害を起点とした血管の炎症

反応として理解されている。血管内皮障害に反応し活性化した血中の単球は、血管内皮下に遊走・浸潤しマクロファージ(M ϕ)へ分化するとともに様々な生理活性物質を分泌する。動脈硬化症の発症・進展には、この炎症反応に加え血管内皮下における M ϕ 増殖の関与が重要視されている。低比重リポ蛋白(LDL)は血管内皮下では酸化修飾を受け酸化 LDL (Ox-LDL)へと変性して存在する。Ox-LDL はマクロファージ(M ϕ)を泡沫化するだけでなく M ϕ 増殖を誘導する。最近、粥状動脈硬化巣局所に集簇する M ϕ は循環血液中の単球が遊走してきたものよりも病変の局所で増殖したものに依存していることがマウス生体内で確認され、M ϕ の病変局所での増殖が動脈硬化症の主要なイベントであり、心血管疾患の治療ターゲットとなりうるとの報告がなされている(図 1)。これまでに申請者は Ox-LDL による M ϕ 増殖の分子機序(特に Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)と Protein kinase C および ERK1/2 の関与)について報告し(*J Biol Chem.* 275:5810, 2000., *Atherosclerosis.* 191:22-32, 2007.)、M ϕ 増殖のメカニズムを明らかにしてきた。



増殖したものに依存していることがマウス生体内で確認され、M ϕ の病変局所での増殖が動脈硬化症の主要なイベントであり、心血管疾患の治療ターゲットとなりうるとの報告がなされている(図 1)。これまでに申請者は Ox-LDL による M ϕ 増殖の分子機序(特に Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)と Protein kinase C および ERK1/2 の関与)について報告し(*J Biol Chem.* 275:5810, 2000., *Atherosclerosis.* 191:22-32, 2007.)、M ϕ 増殖のメカニズムを明らかにしてきた。

2) 細胞周期制御における Skp2-p27^{kip} 経路の役割

申請者は、上記報告の中で AMPK がサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI : cyclin dependent kinase inhibitor) である p27^{kip} を介して M ϕ の細胞周期の調整に重要な役割を担っていることを明らかにしているが、この報告の中では p27^{kip} の調節機構の解明には至っていない。多くの細胞で p27^{kip} のタンパク発現は、細胞周期関連タンパクを標的とするユビキチンリガーゼである S-phase kinase protein 2(Skp2)で調節されていることが知られている。Skp2 は SCF(Skp1-Cullin-F-box protein)型ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットである F-box タンパク質であり、核内で p27^{kip} を基質として認識しユビキチン(Ub)化し分解することで細胞周期を進行させる際に重要な役割を担っている。最近ではこの Skp2-p27^{kip} 経路の上流に AMPK の存在を示唆する報告も散見される(*Cell cycle* 11:1374-82.2012. *Nature* 534:553-7.2016.)。

2. 研究の目的

以上の学術的背景から M ϕ 増殖は動脈硬化症の病態に深く関与しているといえる。申請者は、生体内でも AMPK 活性化により動脈硬化巣における M ϕ 増殖が抑制され、動脈硬化症の進展も抑制されることを明らかにし、M ϕ 増殖が動脈硬化症の治療ターゲットとなりうることを報告している(第 75 回米国糖尿病学会 2015 年、他)。この報告の中で M ϕ 特異的 p27^{kip} 発現マウスと動脈硬化症モデルであるアポ E 欠損マウスとの交配により動脈硬化症の進展が抑制されることを示し、動脈硬化症の進展において M ϕ の p27^{kip} が重要な役割を担っていることを明らかにしている。本研究では、M ϕ 増殖における細胞周期制御機構の全容を明らかにし、特に Skp2-p27^{kip} 経路の病態生理学的な役割を解明することで、M ϕ 増殖阻害という動脈硬化症の新たな治療法の確立において AMPK および Skp2 が有力な分子標的となり得ると証明することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

【M 細胞周期における Skp2-p27^{kip} 経路の役割の解析 (in vitro)】

M において Skp2 により p27^{kip} のタンパク発現が調整されていることを証明するために以下の検討を行う。

< 実験(1) 各種増殖誘導刺激による Skp2 発現および Skp2 活性の定量 >

細胞はマウス腹腔 M を用いる。これまでに確立した増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)による Skp2 発現および p27^{kip} の発現とユビキチン化、M 増殖能との関連を解析する(~)。

細胞増殖の評価を、[³H]チミジン取り込み法、細胞数算定法を用いて行う。

細胞周期の評価を、Propidium iodide を用いた Flow cytometry 法で行う。

Skp2 の発現をタンパクレベル(western blot 法)・mRNA レベル(RT-PCR 法)で定量化する。

p27^{kip} の発現をタンパクレベル(western blot 法)・mRNA レベル(RT-PCR 法)で定量化する。

p27^{kip} 抗体で免疫沈降を行い、ユビキチン抗体でユビキチン化を定量化することで Skp2 活性を評価する。

< 実験(2) AMPK 活性制御による Skp2 発現および Skp2 活性の定量 >

AMPK 活性制御には、AMPK 活性化剤 AICAR およびアデノウイルスベクターを用いて恒常活性型 constitutively active mutant(T172D) -AMPK (CA-AMPK)、優位抑制型 dominant negative mutant(T172A) -AMPK (DN-AMPK) を過剰発現することによって行う。

AMPK 活性制御した M に増殖誘導刺激を行い、実験(1)の ~ と同様の解析を行う。

【動脈硬化モデルマウスを用いた動脈硬化病変局所における Skp2-p27^{kip} 経路および細胞周期の評価 (in vivo)】

動脈硬化モデルマウス(Apo E KO マウス)に high fat diet を行い動脈硬化症モデルマウスとする。血管病変局所での p27^{kip} および Skp2 の発現評価をするために、以下の検討を行う。

動脈硬化症モデルマウスの大動脈弁輪部の組織薄切切片及び大動脈全体を enface した組織サンプルを Oil-red O 染色し粥状動脈硬化病変のサイズを定量化する。

大動脈弁輪部の連続切片を用いて M の表面抗原マーカー(CD11b)と細胞周期進行のマーカー(PCNA)、p27^{kip} 抗体および Skp2 抗体で多重免疫染色を行い増殖細胞の p27^{kip} および Skp2 の発現について評価する。

4. 研究成果

【増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)による Skp2 発現および Skp2 活性の定量】

M において Skp2 による p27^{kip} のタンパク発現の調整機構を解析するためにマウス腹腔 M を用いて増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)による Skp2 および p27^{kip} のタンパクレベル(western blot 法)・mRNA レベル(RT-PCR 法)での発現と M 増殖能との関連を解析した。

・細胞増殖の評価を、[³H]チミジン取り込み法、細胞数算定法を用いて行い、増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)により有意に細胞増殖が誘導された。

・細胞周期の評価を、Propidium iodide を用いた Flow cytometry 法で行い、増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)により優位に細胞周期 G2/M 期の細胞が増加していた。

・増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)による細胞増殖下では Skp2 および p27^{kip} の発現をタンパクレベル(western blot 法)・mRNA レベル(RT-PCR 法)で定量化し、Skp2 および p27^{kip} の発現が増加していた。

【増殖刺激および AMPK 活性制御による Skp2 発現および Skp2 活性の定量】

マウス腹腔 M を用いて、細胞増殖の評価を、[³H]チミジン取り込み法、細胞数算定法を用いて行った。増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)により有意に細胞増殖が誘導された。細胞周期の評価を、Propidium iodide を用いた Flow cytometry 法で行った。増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)により優位に細胞周期 G2/M 期の細胞が増加していた。AMPK 活性化剤 AICAR およびアデノウイルスベクターを用いて恒常活性型 constitutively active mutant(T172D) -AMPK (CA-AMPK)、優位抑制型 dominant negative mutant(T172A) -AMPK (DN-AMPK) を過剰発現することで AMPK 活性制御を行い、増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)による Skp2 発現および p27^{kip} のタンパクレベル(western blot 法)・mRNA レベル(RT-PCR 法)で定量化し評価を行った。増殖刺激で増加した Skp2 の発現は AMPK 活性誘導により部分的に抑制された。p27^{kip} の発現量は M においては元々の非常に少なく増殖刺激での変化は観察されなかったが AMPK 活性誘導によりその発現が増加した。

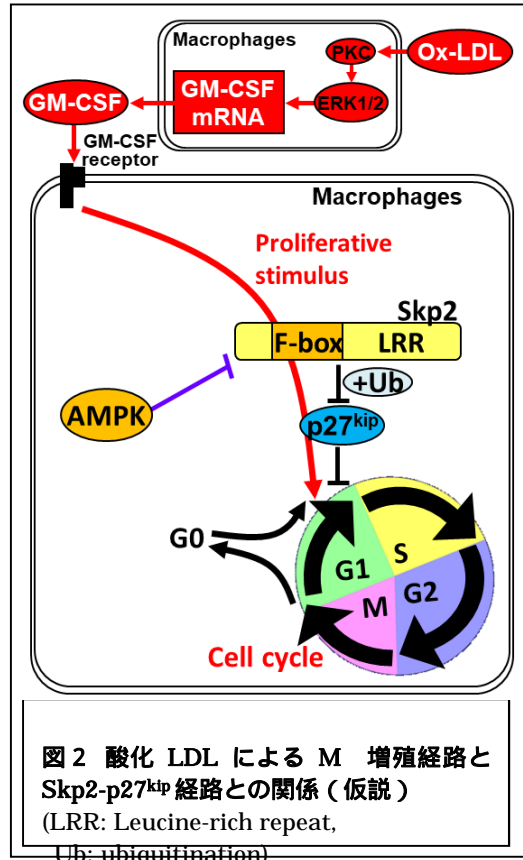
【動脈硬化病変局所における Skp2-p27^{kip} 経路および細胞周期の評価】

動脈硬化モデルマウス(Apo E KO マウス)に high fat diet を行い動脈硬化症モデルマウスとして血管病変局所での p27^{kip} および Skp2 の発現評価をするために、大動脈弁輪部の連続切片を用いて M の表面抗原マーカー (CD11b) と細胞周期進行のマーカー(PCNA)・p27^{kip} 抗体・Skp2 抗体で多重免疫染色を行ったところ動脈硬化弁輪部で増殖 M に一致した Skp2 の発現を認めた。

AMPK 活性化剤 AICAR およびアデノウイルスベクターを用いて恒常活性型 constitutively active mutant(T172D) -AMPK (CA-AMPK)、優位抑制型 dominant negative mutant(T172A) -AMPK (DN-AMPK) を過剰発現することで AMPK 活性制御を行い、増殖抑制状態のマウス腹腔 M を用いて、細胞増殖の評価を、[3H]チミジン取り込み法、細胞数算定法を用いて行った。増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)により有意に細胞増殖が誘導された。細胞周期の評価を、Propidium iodide を用いた Flow cytometry 法で行った。増殖誘導刺激(Ox-LDL、GM-CSF)により優位に細胞周期 G2/M 期の細胞が増加していた。増殖刺激で増加した Skp2 の発現は AMPK 活性誘導により部分的に抑制された。p27^{kip} は元々の発現が弱く増殖刺激での変化は観察されなかったが AMPK 活性誘導によりその発現が増加した。また Skp2 による p27^{kip} のユビキチン化と M 増殖能との関連を解明するため p27^{kip} 抗体で免疫沈降を行い、ユビキチン抗体でユビキチン化を定量化した。AICAR 刺激により増殖抑制状態の M では p27^{kip} のユビキチン化が増加した。

以上より、動脈硬化モデルマウスの動脈硬化巣で観察される増殖 M では Skp2 の発現が増加していることが観察された。また M において増殖刺激により Skp2 の発現増加を認める一方で、AMPK 刺激による増殖抑制状態のマクロファージではユビキチン化低下に伴う p27^{kip} 発現量の増加を認めた。p27^{kip} はマクロファージでは元々の発現が弱く増殖刺激での変化は観察されなかったが AMPK 活性誘導による増殖抑制によりその発現が増加した。AMPK 刺激は Skp2 による p27^{kip} ユビキチン化低下に伴う p27^{kip} 発現増加を認め、最終的に細胞周期 G1 arrest を誘導している可能性が示された(図2)。

マクロファージ増殖阻害を介して動脈硬化症の発症・進展を抑制するという新たな治療法の確立において AMPK、Skp2 および p27^{kip} が有力な分子標的となり得ることが証明された。尚、これらの研究成果内容の一部は以下の発表論文と学会で報告された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada S, Senokuchi T, Matsumura T, Morita Y, Ishii N, Fukuda K, Murakami-Nishida S, Nishida S, Kawasaki S, Motoshima H, Furukawa N, Komohara Y, Fujiwara Y, Koga T, Yamagata K, Takeya M, Araki E.	4. 巻 38(5)
2. 論文標題 Inhibition of Local Macrophage Growth Ameliorates Focal Inflammation and Suppresses Atherosclerosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arterioscler Thromb Vasc Biol.	6. 最初と最後の頁 994-1006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.117.310320.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada S, Senokuchi T, Matsumura T, Morita Y, Ishii N, Fukuda K, Murakami S, Nishida S, Kawasaki S, Motoshima H, Furukawa N, Komohara Y, Fujiwara Y, Koga T, Yamagata K, Takeya M, Araki E	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibition of local macrophage growth ameliorates focal inflammation and suppresses atherosclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arterioscler Thromb Vasc Biol.	6. 最初と最後の頁 994-1006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.117.310320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Matsumura T, Murakami-Nishida S, Senokuchi T, Ishii N, Nishida S, Kondo T, Motoshima H, Araki E.
2. 発表標題 Empagliflozin suppresses atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E deficient mice by inhibiting macrophage activation.
3. 学会等名 54th EASD Annual Meeting, Berlin, Germany, Oral. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田彩子, 松村 剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 西田周平, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一
2. 発表標題 マクロファージ局在のSGLT2を標的とした新規糖尿病大血管症抑制機序の解明.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会総会 東京, 口演
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murakami S, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Fukuda K, Yamada S, Morita Y, Nishida S, Sato M, Motoshima H, Kondo T, Araki E
2. 発表標題 Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, suppresses the progression of atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice
3. 学会等名 The 8th AASD Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上彩子, 松村 剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 西田周平, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一
2. 発表標題 エンバクリフロジンによる糖尿病大血管症進展抑制効果の検討.
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上彩子, 松村 剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 西田周平, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一
2. 発表標題 エンバグリフロジンによる新たな抗動脈硬化作用機序解明 - マクロファージに対する直接作用 -
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上彩子, 松村 剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 西田周平, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一
2. 発表標題 エンバクリフロジンによる糖尿病大血管症進展抑制効果の検討
3. 学会等名 第67回日本体質医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松村剛, 村上彩子, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙理恵, 守田雄太郎, 西田周平, 久木留大介, 本島寛之, 近藤龍也, 沼田朋大, 荒木栄一
2. 発表標題 SGLT-2阻害薬によるマクロファージ活性抑制を介した糖尿病大血管症進展抑制効果の解析
3. 学会等名 第32回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsumura T, Murakami S, Senokuchi T, Ishii N, Fukuda K, Nishida S, Araki E
2. 発表標題 Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, suppresses the progression of atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice
3. 学会等名 第81回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	瀬ノ口 隆文 (senokuchi takahumi) (00530320)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	
研究 分担者	近藤 龍也 (kondou tatsuya) (70398204)	熊本大学・病院・講師 (17401)	