

令和元年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16011

研究課題名(和文) 動脈硬化病変不安定化の分子機構における単球ミトコンドリア制御分子の役割解明

研究課題名(英文) Monocyte/macrophage Drp1 in the pathobiology of atherosclerotic vascular diseases

研究代表者

古賀 純一郎(KOGA, Junichiro)

九州大学・循環器病未来医療研究センター・学術研究員

研究者番号：10746142

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)：単球・マクロファージに発現するミトコンドリア分裂誘導タンパクDrp1(dynamamin-related protein 1)が血管病において果たす役割を明らかにするため、単球・マクロファージ選択的Drp1欠損マウスを用い検討を行った。本マウスの大腿動脈にワイヤーによる血管傷害を行った結果、対照群に比べ4週後の内膜肥厚が抑制された。病理組織学的には血管傷害部位での炎症ならびに細胞増殖の抑制を認めた。また、マクロファージDrp1の機能抑制により炎症性サイトカインや活性酸素種の産生が抑制された。以上によりDrp1はマクロファージ活性化を通じ血管傷害後内膜肥厚を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアが細胞内において絶えず形態を変化させていること(ミトコンドリアダイナミクス)は以前より知られていたが、その生理学的ならびに病態における役割・意義については不明な点が多い。本研究は血管傷害後の炎症ならびに引き続き生じる動脈硬化性変化においてミトコンドリアダイナミクスがマクロファージ機能を制御する可能性を初めて示したものである。ミトコンドリア形態を制御する分子はDrp1以外にも複数同定されており、ミトコンドリアダイナミクスを標的とする動脈硬化性疾患に対する新規治療法の開発に向け今後も基礎研究、開発研究が加速することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have examined the role of dynamamin-related protein 1(Drp1), a protein promoting mitochondrial fission, in the mechanism of intimal thickening after vascular injury, especially focusing on Drp1 in monocytes/macrophages. To this purpose, we have created monocyte/macrophage-selective Drp1-deficient mice and performed femoral arterial wire injury. In these mice, intimal thickening and negative remodeling were attenuated. Deletion of monocyte/macrophage Drp1 also attenuated inflammation after vascular injury. In cultured macrophages, pharmacological inhibition or knockdown of Drp1 decreased inflammatory cytokines and reactive oxygen species. These results indicate that monocyte/macrophage Drp1 accelerates intimal thickening after vascular injury by promoting monocyte/macrophage-mediated inflammation.

研究分野：血管生物学

キーワード：動脈硬化 炎症 マクロファージ ミトコンドリアダイナミクス 活性酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化に起因する心筋梗塞や脳梗塞は生活の質と生命予後を脅かす疾患であり、その発症進展機構の解明に基づく医学的対策が期待されている。しかし近年の大規模臨床試験においてはスタチンを含む積極的脂質低下療法を行っても心血管イベントの抑制率は 30%程度であり十分とは言い難い。活性化単球は動脈硬化の急性血栓性合併症(心筋梗塞、脳梗塞など)の発症基盤となるプラーク不安定化を促進するため、活性化単球・不安定化プラークの存在を早期に診断し治療介入することは予後改善につながる治療となり得ることが期待される。

申請者らはミトコンドリア分裂を誘導する Drp1(Dynamin-related protein 1)の機能阻害により心筋虚血再灌流傷害が軽減されることを見出したが(Ishikita A, Koga J et al. J Am Heart Assoc. 2016)、動脈硬化の病態、特に単球・マクロファージ機能に Drp1 が及ぼす影響については不明であった。故に我々は Drp1 に着目し本研究を計画した。しかし、全身的 Drp1 欠損は胎生致死であり生体レベルでの Drp1 機能解析はこれまで困難であった。この課題を克服するため、申請者らは単球選択的 Drp1 欠損マウスを樹立し、単球活性化～動脈硬化病変不安定化の分子機構における Drp1 の役割を細胞~生体レベルで明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的はミトコンドリア分裂を誘導する Drp1(dynamin-related protein 1)、中でも血管病の病態において中心的役割を果たす単球・マクロファージに発現する Drp1 に着目し、Drp1 の機能阻害により単球・マクロファージ活性化ならびに血管病の進展が抑制されるか否かを明らかにすることである。具体的な目的は以下の通りである。

- (1) 単球・マクロファージ選択的 Drp1 欠損マウスに血管傷害を行い、血管傷害後に生じる動脈硬化性変化(内膜肥厚)における単球・マクロファージ Drp1 の役割を明らかにする。
- (2) Drp1 機能阻害が炎症性サイトカイン発現、活性酸素種産生を含む細胞機能に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

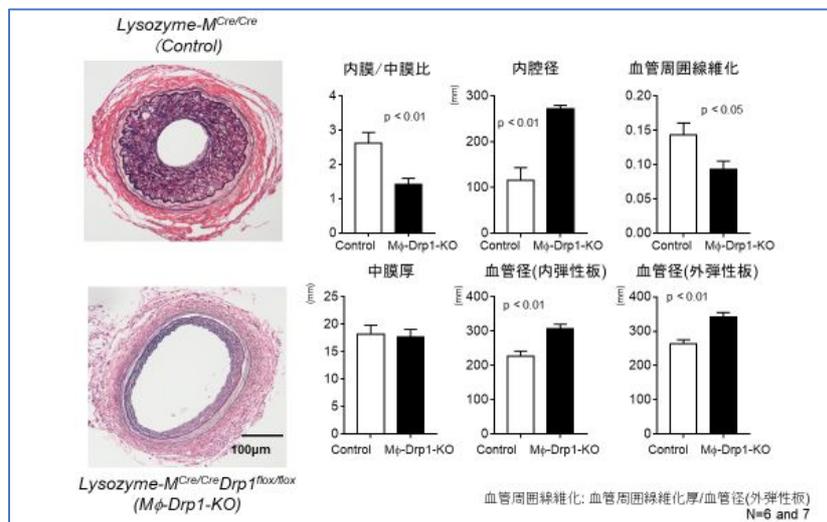
(1) 大腿動脈血管傷害モデルの作成: 12-20 週齢のオス C57Bl/6J マウスの大腿動脈側枝より径 0.38mm のワイヤーを挿入し大腿動脈血管内皮の剥離、拡張を行った。7 日後、28 日後に傷害血管を摘出し内膜肥厚の程度を Elastica van Gieson 染色後に定量した。また、炎症細胞集積、増殖細胞、アポトーシス細胞につき Mac-3、Ki-67 の免疫染色、TUNEL 法による病理組織学的評価を行った。

(2) マクロファージにおける Drp1 機能の解明: Drp1 siRNA ならびに Drp1 プラスミドを用いマウスより単離した腹腔内マクロファージにおける Drp1 の発現抑制・過剰発現を行った。これら細胞において LPS/IFN- γ 刺激による炎症性マクロファージへの分化に際し生じるサイトカイン産生、活性酸素種産生、解糖系への代謝シフト、ミトコンドリア膜電位の喪失に Drp1 が及ぼす作用を検討した。

(3) 単球・マクロファージ - 平滑筋細胞相互作用の解明: 平滑筋細胞は血管傷害後肥厚内膜の主要な構成細胞であり単球 Drp1 欠損により内膜肥厚が抑制されれば単球・マクロファージ - 平滑筋相互作用により平滑筋細胞の機能変化が生じたことが示唆される。故に、マクロファージ - 平滑筋共培養の系においてこれら細胞の相互作用における Drp1 の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 単球・マクロファージ Drp1 は血管傷害後の内膜肥厚を促進する: 単球・マクロファージ Drp1 欠損マウスに対し大腿動脈のワイヤー傷害を行った結果、28 日後の内膜肥厚が対照群に比べ有意に抑制された(図参照)。また、ワイヤーによる血管拡張後の陰性リモデリング、血管周囲線維化も抑制された。傷害 7 日後に採取した大腿動脈の免疫組織学的検討では Mac-3 陽性マクロファージの集積抑制、Ki-67 陽性増殖細胞の減少を認めた。



(2) Drp1 は炎症性マクロファージへの分化誘導を促進する：単球・マクロファージ機能制御における Drp1 の役割を明らかにするため Drp1 欠損マウスから単離した腹腔内マクロファージを用い検討を行った。また、Drp1 siRNA や Drp1 阻害薬 Mdivi-1 による検討も併せて行った。その結果、マクロファージ Drp1 欠損あるいは siRNA や阻害剤による Drp1 機能抑制により炎症性マクロファージ関連分子(CCL2、IL-6)の発現が mRNA ならびにタンパクレベルで抑制された。タンパクアレイによる解析ではマクロファージ Drp1 機能抑制により CCL1、CCL2 などの炎症性マクロファージ関連タンパクの発現抑制を認める一方、IL-7 や CCL17 などリンパ球機能制御に関わる分子の発現増加を認めた。

(3) 炎症性マクロファージにおいてはミトコンドリア分裂を認める：以上よりマクロファージ Drp1 が炎症性マクロファージへの分化誘導において促進的に作用することが示唆された。このことは炎症性マクロファージにおいてミトコンドリア分裂が誘導されることを示唆すると考えられるため、ミトコンドリアを染色後、蛍光顕微鏡下に観察した。その結果、LPS+IFN- γ により誘導される炎症性マクロファージではミトコンドリア分裂を認める一方、IL-4 により誘導される抗炎症性/修復性マクロファージではミトコンドリア融合を認めた。

(4) Drp1 は炎症性マクロファージにおける活性酸素種産生を促進する：活性酸素種(ROS; reactive oxygen species)は細胞呼吸に伴い産生される。ミトコンドリア由来 ROS はマクロファージ活性化を促進することが知られており、Drp1 阻害薬によりミトコンドリア由来 ROS が減少するか検証を行った。その結果、Drp1 阻害薬 Mdivi-1 により炎症性マクロファージへの分化誘導時に生じる ROS 産生が抑制された。その一方、Mdivi-1 はミトコンドリアでの酸素消費自体には影響を与えなかった。

(5) マクロファージ-血管平滑筋細胞相互作用により誘導される平滑筋細胞増殖・遊走はマクロファージ Drp1 欠損により抑制される：血管傷害部位においてマクロファージは様々なサイトカイン、成長因子を放出し周辺の血管平滑筋細胞増殖・遊走を促進することが知られている。Drp1 欠損マクロファージにおいて、血管平滑筋細胞に対するこれら作用が抑制されているか否か、共培養ならびにマクロファージ上清を用いた遊走試験を行い検証した。マクロファージ-血管平滑筋細胞の共培養後、平滑筋細胞数を計数したところ、対照群に比べ Drp1 欠損マクロファージとの共培養では平滑筋細胞数の増加が抑制された。また、マクロファージ培養上清を用いた平滑筋遊走試験では Drp1 欠損マクロファージ由来の培養上清では平滑筋細胞の遊走が抑制された。以上の結果はマクロファージ Drp1 欠損により血管平滑筋細胞との可溶性因子を介する相互作用が修飾され平滑筋細胞の増殖・遊走が抑制されたものと考えられた。

以上の結果は血管病の病態においてミトコンドリア形態変化(ミトコンドリアダイナミクス)がマクロファージ機能を制御している可能性を初めて示したものであり、国内外の関連分野における研究に大きなインパクトを与えるものである。ミトコンドリア形態を制御する分子は Drp1 以外にも複数同定されており、ミトコンドリアダイナミクスを標的とする新規治療法の開発に向け基礎研究、開発研究が加速することが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Fujiwara M, Matoba T, [Koga J](#), Okahara A, Funamoto D, Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. Nanoparticle incorporating Toll-like receptor 4 inhibitor attenuates myocardial ischaemiareperfusion injury by inhibiting monocyte-mediated inflammation in mice. *Cardiovasc Res*(査読有). 2019; 115(7): 1244-1255 doi: 10.1093/cvr/cvz066.

Tokutome M, Matoba T, Nakano Y, Okahara A, Fujiwara M, [Koga J](#), Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma targeting nanomedicine promotes cardiac healing after acute myocardial infarction by skewing monocyte/macrophage polarization in preclinical animal models. *Cardiovasc Res*(査読有). 2019; 115(2): 419-431. doi: 10.1093/cvr/cvy200.

Ichimura K, Matoba T, [Koga J](#), Nakano K, Funamoto D, Tsutsui H, Egashira K. Nanoparticle-Mediated Targeting of Pitavastatin to Small Pulmonary Arteries and Leukocytes by Intravenous Administration Attenuates the Progression of Monocrotaline-Induced Established Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Int Heart J*(査読有). 2018; 59(6):1432-1444. doi: 10.1536/ihj.17-683.

Nakano K, Matoba T, [Koga J](#), Kashihara Y, Fukae M, Ieiri I, Shiramoto M, Irie S, Kishimoto J, Todaka K, Egashira K. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of NK-104-NP. *Int Heart J*(査読有). 2018; 59(5):1015-1025. doi: 10.1536/ihj.17-555.

Honda K, Matoba T, Antoku Y, [Koga J](#), Ichi I, Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. Lipid-Lowering Therapy With Ezetimibe Decreases Spontaneous Atherothrombotic

Occlusions in a Rabbit Model of Plaque Erosion: A Role of Serum Oxysterols. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*(査読有). 2018;38(4):757-771. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310244.

Mao Y, Koga J, Tokutome M, Matoba T, Ikeda G, Nakano K, Egashira K. Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin to Monocytes/Macrophages Inhibits Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction by Inhibiting Monocyte-Mediated Inflammation. *Int Heart J*(査読有). 2017; 58(4):615-623. doi: 10.1536/ihj.16-457.

[学会発表](計 8 件)

国際学会

Umez R, Koga J, Tsutsui H, Egashira K. Deletion of cyclophilin d inhibits atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein-e deficient mice. ESC Congress 2018. 2018.8.27. Munich, Germany.

Okahara A, Matoba T, Koga J, Fujiwara M, Funamoto D, Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. Nanoparticle-mediated simultaneous targeting of mitochondria and inflammatory monocytes protects the brain from ischemia-reperfusion injury in mice. ESC Congress 2018. 2018.8.26. Munich, Germany.

Okahara A, Matoba T, Koga J, Fujiwara M, Funamoto D, Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. Nanoparticle-Mediated Simultaneous Targeting of Mitochondria and Inflammatory Monocytes Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. AHA Scientific Session 2017. 2017.11.11-15. Anaheim, U.S.A.

Honda K, Matoba T, Koga J, Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. High cholesterol diet and angiotensin II induce spontaneous atherothrombotic occlusion of balloon-injured rabbit femoral arteries; effects of lipid-lowering therapies. ESC Congress 2017. 8.26. Barcelona, Spain.

Umez R, Koga J, Wang L, Nomura M, Tsutsui H, Egashira K. Macrophage dynamin-related protein1 promotes neointima formation after mechanical injury in mouse femoral arteries. ESC Congress 2017. 8.26. Barcelona, Spain.

国内学会

古賀 純一郎,梅津 隆太,的場 哲哉,江頭 健輔. ミトコンドリアと炎症・動脈硬化. 第50回日本動脈硬化学会総会、Cutting-Edge Symposium9「マクロファージ研究の最前線」2018年7月13日. 大阪.

古賀 純一郎,梅津 隆太,的場 哲哉,筒井 裕之,江頭 健輔. Macrophage dynamin-related protein 1, a mitochondrial fission protein, accelerates inflammation and neointimal thickening after vascular injury. 第82回日本循環器学会学術集会. シンポジウム15,「血管障害と炎症・免疫」2018年3月25日.

古賀 純一郎,梅津 隆太,的場 哲哉,王 麗香,野村 政壽,江頭 健輔. マクロファージに発現するミトコンドリア形態制御分子 Drp1 はマウス大腿動脈において血管傷害後の内膜肥厚を促進する. 第49回日本動脈硬化学会総会、第25回若手研究者奨励賞選考会. 2017年7月6日. 広島.

[図書](計 3 件)

古賀純一郎. ミトコンドリアダイナミクスと心血管病. 循環器専門医. 2018;27:32-25.

Katsuki S, Matoba T, Koga J, Nakano K, Egashira K. Anti-inflammatory Nanomedicine for Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:87. doi: 10.3389/fcvm.2017.00087.

Matoba T, Koga J, Nakano K, Egashira K, Tsutsui H. Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2017;70(3):206-211. doi: 10.1016/j.jjcc.2017.03.005.

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。