

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03679

研究課題名(和文)細胞内コレステロール代謝を基軸とした炎症慢性化機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of chronic inflammation on the axis of cellular cholesterol metabolism

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは個体の恒常性を維持するとともに、動脈硬化症の基礎となる慢性炎症の病態を制御する。これまで私は、マクロファージの細胞機能としての免疫応答が、細胞代謝と密接に連携していることを見出した。そこで本研究ではマクロファージの細胞内コレステロール代謝を標的とした、抗動脈硬化治療・予防法を確立したいと考え検討した。マクロファージに炎症刺激を与えて活性化すると、細胞内のリソソームに遊離コレステロールが蓄積した。ポリロタキサンという試薬を用いて蓄積したコレステロールの排出を促進すると、細胞レベルでの炎症応答が抑制できるのみならず、個体レベルで動脈硬化プラークの形成が抑制できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討から、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調節できること、マクロファージの細胞内コレステロールの蓄積を抑制すると動脈硬化プラークの形成を抑制できることが明らかとなった。また、健常人および動脈硬化症例を対象とした検討から、単球中コレステロールは、頸動脈内膜厚に示される動脈硬化の進展度と正の相関を示し、多変量解析の結果、血中LDLとは独立した予後規定因子であった。これらのことから、ヒトにおいても単球/マクロファージの機能は細胞内コレステロール量と連携して制御され、単球コレステロール量は動脈硬化の重症度の指標となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Macrophages maintain systemic homeostasis and regulate the pathogenesis of chronic inflammation, which is the basis of atherosclerosis. Previously, I have found that the immune response as a cellular function of macrophages is closely linked to cellular metabolism. Therefore, in this study, I examined the intracellular cholesterol metabolism of macrophages with the aim of establishing an anti-atherosclerosis treatment and prevention method. When macrophages were stimulated with TLR4 agonist LPS, free cholesterol was accumulated in lysosomes. When the cholesterol efflux was enhanced using a novel compound called polyrotaxan (PRX), not only macrophage's inflammatory response was suppressed, but also the formation of atherosclerotic plaques was inhibited in Ldlr^{-/-} mice. These results suggested that intracellular cholesterol metabolism in macrophages can modulate macrophage function and inhibit the formation of atherosclerotic plaques.

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

LDL 異常高値をはじめとした脂質異常症は、動脈硬化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%にとどまる。この残余リスクをもたらす機序を明らかにし、新たな心血管イベントの予防・治療法を確立することは重要な課題である。

申請者はこれまでに、動脈硬化や生活習慣病の基盤病態としての「慢性炎症」の分子機構について、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、積極的に炎症を収束し組織の恒常性を維持する機能を併せ持つ。また、炎症応答の過程で、マクロファージの機能は動的に変化することを見いだし、この機能変移を制御する、細胞代謝や細胞時計と連携したエピゲノム制御機構を明らかにしてきた (Oishi et al. *Cell Metab* 2017, Oishi et al. *Sci Rep* 2017.)。

2. 研究の目的

マクロファージは個体の恒常性を維持するとともに、多様な細胞との相互作用を介して慢性炎症を制御する。私はこれまでに培養マクロファージを用いた解析から「細胞内コレステロールレベルはマクロファージ活性化とともに変動する」ことを見出した。そこで、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機能を調節できるのではないかと、さらには同機序に介入することによって動脈硬化の形成を制御できるのではないかと着想した。そこで本研究では、細胞内コレステロール代謝を、マクロファージの炎症活性化を調節する新たな制御システムと位置づけ、細胞内コレステロール代謝を標的とした、抗動脈硬化治療・予防法の確立に向けた知識基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、傷害応答による細胞内コレステロール代謝の変化がマクロファージの細胞機能を制御する分子機序を細胞レベルおよびマウス個体レベルで明らかにする検討を行った。また、新規超分子 PRX による、細胞内コレステロール代謝への介入の効果を検証した。

4. 研究成果

(1) 培養マクロファージ細胞 (RAW 264.7 細胞) に TLR4 活性化刺激を与えて炎症応答を引き起こすと、細胞内のフリーコレステロールが増加することを GC-MS およびフィリピン染色で確認した。細胞内小器官に特異的なマーカーとフィリピン染色との共染色を用いた解析の結果、マクロファージにおいては、炎症刺激後に細胞内のエンドソームおよびリソソーム選択的にコレステ

ロールが蓄積していることが明らかとなった。

TLR4 活性化刺激によるフリーコレステロール上昇のメカニズムを明らかにするために、インヒビターを用いた実験を行った。その結果、LDL particle としてのコレステロールの取り込み、コレステロール合成の増加、リポファジーの亢進の3つの機序が関与することが分かった。

TLR4 活性化シグナルは、細胞膜下のアダプター分子 Myd88 を介して細胞内に伝達される。マウス Myd88 のアミノ酸配列を検索したところ、コレステロールを結合する CRAC 配列が存在した。分子生物学的な検討の結果、炎症刺激によって細胞内に蓄積したコレステロールは、Myd88 に結合してそのオリゴマーを促し、シグナルを増強していると考えられた。

次に、細胞内コレステロールを標的とした細胞機能への介入法として、新規超分子ポリロタキサン (PRX) を用いた。PRX は、コレステロールを結合するβシクロデキストリン (βCD) を生体内溶解性ポリマーで結合した超分子である。PRX はエンドサイトーシスによりエンドソームおよびリソソームに取りこまれ、酸性環境下においてポリマーが崩壊し、コレステロールをキレートしてその排出を促進する。

実際、培養マクロファージに PRX を投与すると、エンドソームおよびリソソームにとりこまれ、TLR4 刺激後のコレステロールの蓄積を抑制した。さらに、PRX の投与によりマクロファージの炎症活性化も抑制された。このことから、マクロファージの炎症活性化において、細胞内コレステロールの増加を抑制すると炎症が制御できることが明らかとなった。

(2) マクロファージの細胞内コレステロールの増加を抑制すると動脈硬化プラークの形成が抑制できるか、動物モデルを用いて検証した。動脈硬化モデルとして *Ldlr* 欠損マウスを用いた。*Ldlr* 欠損マウスに高コレステロール食を11週間摂取させると大動脈にプラークが形成される。ところが、高コレステロールの摂取と同時に PRX (2mg/kg・体重) を隔日で皮下投与すると、プラークの形成とプラーク部位へのマクロファージの集積、マクロファージの炎症活性化が有意に抑制された。

(3) マウスの細胞および個体から得られたこれらの結果が、ヒトにも当てはまるかどうかを検証した。健常人および動脈硬化症例 (計55名) における頸動脈の内膜厚と、循環血液中の単球に含まれるコレステロール量を測定した。その結果、単球中コレステロールは、頸動脈内膜厚に示される動脈硬化の進展度と正の相関を示し、多変量解析の結果、血中 LDL とは独立した予後規定因子であることを見いだした。この結果は、単球に含まれるコレステロールが動脈硬化の進展を制御する要因であり、血清 LDL とは独立した新しいリスク指標となることを示すとともに、単球・マクロファージ内の細胞代謝の異常が動脈硬化プラーク形成を推し進めると考えられた。これらの結果から、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調節できること、動脈硬化プラークの形成が抑制できることが明らかとなった。また、これらの機序はヒトの病態にも応用でき、単球中コレステロールレベルは動脈硬化の重症度の指標となりうることを示唆された (参考文献: Hayakawa, Oishi et al. *JCI Insight* 7:22, e138539. 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayakawa S, Tamura A, Nikiforov N, Koike H, Kudo F, Cheng Y, Miyazaki T, Kubekina M, Kirichenko T, Orekhov A, Yui N, Manabe I, Oishi Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Hayakawa S, Tamura A, Nikiforov N, Koike H, Kudo F, Cheng Y, Miyazaki T, Kubekina M, Kirichenko T, Orekhov A, Yui N, Manabe I, Oishi Y. Activated cholesterol metabolism is integral for innate macrophage responses by amplifying Myd88 signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e138539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.138539	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 該当する
1. 著者名 Cheng Y, Manabe I, Hayakawa S, Endo Y, and Oishi Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Cheng Y, Manabe I, Hayakawa S, Endo Y, and Oishi Y. Caspase-4 contributes to Site-1 protease cleavage and SREBP1 activation in the inflammatory response of macrophages.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers of Immunology	6. 最初と最後の頁 1009973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1009973	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 Nawaz A, Bilal M, Fujisaka S, Kado T, Aslam M, Ahmed S, Okabe K, Igarashi Y, Watanabe Y, Kuwano T, Tsuneyama K, Nishimura A, Nishida Y, Yamamoto S, Sasahara M, Imura J, Mori H, Matzuk M, Kudo F, Manabe I, Uezumi A, Nakagawa T, Oishi Y and Tobe K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Depletion of CD206+ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 34191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34191-y	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 該当する
1. 著者名 Nakagawa A, Hayakawa S, Cheng Y, Honda A, Yuzawa R, Ogawa R and Oishi Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cyclic stretch regulates immune responses via tank-binding kinase 1 expression in macrophages.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 13526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13526	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 Yoshimoto Y, Oishi Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 Development and Regeneration/Healing as Potential Therapeutic Targets.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2023.108357	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 Koike H, Manabe I and Oishi Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Mechanisms of Cooperative Cell-Cell Interactions in Skeletal Muscle Regeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00234-6	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, Ohishi T, Oishi Y, Isemura M, Miyoshi N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Contribution of Non-Coding RNAs to Anticancer Effects of Dietary Polyphenols	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 2352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11122352	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 Yuzawa R, Koike H, Manabe I, and Oishi Y	4. 巻 12
2. 論文標題 VDR regulates simulated microgravity-induced atrophy in C2C12 myotubes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1377
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu L, Koike H, Ono T, Hayashi S, Kudo F, Kaneda A, Kagechika H, Manabe I, Nakashima T, Oishi, Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Identification of a KLF5-dependent program and drug development for skeletal muscle atrophy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 e2102895118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2102895118	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 Iwasaki T, Miyajima-Nakano Y, Fukazawa R, Lin MT, Matsushita S, Hagiuda E, Taguchi A, Dikanov S, Oishi Y, Gennis R.	4. 巻 169
2. 論文標題 Escherichia coli amino acid auxotrophic expression host strains for investigating protein structure-function relationships.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 387-394
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 Kuwabara Y, Ono S, Katayama A, Kurihara S, Oishi Y, Takeshita T	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasma and follicular fluid osteopontin levels during ovarian cycle and their correlation with follicular fluid vascular endothelial growth factor levels.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79453-1	査読の有無 無
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 Higuchi T, Yamaguchi F, Asakura T, Yoshida D, Oishi Y, Morita A	4. 巻 87
2. 論文標題 Ultrasound Modulates Fluorescence Strength and ABCG2 mRNA Response to Aminolevulinic Acid in Glioma Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch	6. 最初と最後の頁 310-317
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 無
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 Liu L, Koike H, Ono T, Hayashi S, Kudo F, Kaneda A, Kagechika H, Manabe I, Nakashima T, Oishi, Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Identification of a KLF5-dependent program and drug development for skeletal muscle atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 e2102895118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2102895118	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 Iwasaki T, Miyajima-Nakano Y, Fukazawa R, Lin MT, Matsushita S, Hagiuda E, Taguchi A, Dikanov S, Oishi Y, Gennis R.	4. 巻 169
2. 論文標題 Escherichia coli amino acid auxotrophic expression host strains for investigating protein structure-function relationships	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 387-394
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 該当する

1. 著者名 Kuwabara Y, Ono S, Katayama A, Kurihara S, Oishi Y, Takeshita T	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasma and follicular fluid osteopontin levels during ovarian cycle and their correlation with follicular fluid vascular endothelial growth factor levels.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79453-1	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 -

1. 著者名 Higuchi T, Yamaguchi F, Asakura T, Yoshida D, Oishi Y, Morita A	4. 巻 87
2. 論文標題 Ultrasound Modulates Fluorescence Strength and ABCG2 mRNA Response to Aminolevulinic Acid in Glioma Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch	6. 最初と最後の頁 310-317
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 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 17件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 筋再生・修復を主導する間質細胞間ネットワーク解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会大会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 細胞内コレステロールによるマクロファージ機能の制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 Immunometabolism as a novel therapeutic target of atherosclerosis
3. 学会等名 第29回 国際高血圧学会 シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石由美子、小池博之
2. 発表標題 転写因子KLF5による筋萎縮の制御と新規治療への展開
3. 学会等名 第8回筋学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 シングルセルトランスクリプトームから読み解く筋再生・修復メカニズム
3. 学会等名 第51回日本心脈管作動物質学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 加齢による筋損傷後再生不全のメカニズム
3. 学会等名 第64回日本老年医学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 Cellular cholesterol metabolism as a novel therapeutic target of atherosclerosis
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 Macrophage diversity that regulates skeletal muscle regeneration
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会総会・学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 筋損傷後の再生・修復を主導する骨格筋マクロファージの多様性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学学会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 マクロファージの「脂質」による再生・組織修復の制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 脂肪酸の量的・質的制御と動脈硬化予防について
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Oishi, Y
2. 発表標題 Immunometabolism as a novel therapeutic target of atherosclerosis
3. 学会等名 International society of atherosclerosis meeting 2021, symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 なぜ臨床医が基礎研究をするのか 「女性研究者の立場から」
3. 学会等名 第69回日本心臓病学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 Cellular cholesterol metabolism as a novel therapeutic target of atherosclerosis
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 Macrophage diversity that regulates skeletal muscle regeneration
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会総会・学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 筋損傷後の再生・修復を主導する骨格筋マクロファージの多様性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学学会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 マクロファージの「脂質」による再生・組織修復の制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 脂肪酸の量的・質的制御と動脈硬化予防について
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石由美子
2. 発表標題 Immunometabolism as a novel therapeutic target of atherosclerosis
3. 学会等名 International Society of Atherosclerosis meeting 2021, symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ロシア連邦	Institute of Experimental Cardiology			