

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08433

研究課題名（和文）時計遺伝子E4BP4が動脈硬化性疾患に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of E4BP4 on the development of atherosclerosis

研究代表者

磯田 菊生（Isoda, Kikuo）

順天堂大学・大学院医学研究科・先任准教授

研究者番号：00532475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：（1）時計遺伝子E4BP4の欠損は炎症性サイトカインを減少させ、傷害後の新生内膜形成を抑制することが示された。さらに、NK細胞の発達はE4BP4欠損によって障害されることも示唆された。（2）AngII誘発腎障害に対するIL-1Raおよび抗IL-1抗体（01BSUR）の効果を検討したところ、IL-1の抑制はマウスにおいて、AngII誘発高血圧および腎障害を減少させることを実証することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は今回2つのことなる実験系で結果を出すことができた。

（1）時計遺伝子のE4BP4の阻害が血管の炎症を抑制する有用な戦略である可能性を示した。（2）IL-1の抑制がAngII誘発高血圧および腎障害を減少させたことより、IL-1の抑制が高血圧患者における腎障害進行を防ぐ新たな治療法となることを実証した。

以上が成果が新規治療法につながれば、心血管発症予防や透析患者減少をもたらし、医療費削減につながるため社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：(1) Deficiency of E4BP4 reduced the inflammatory cytokines and suppressed neointimal formation after injury. The present study is the first to demonstrate that E4BP4 plays an important role in the increase of neointimal formation after injury in vivo, thus suggesting that E4BP4 inhibition may represent a useful strategy to inhibit vascular inflammation. (2) Inhibition of interleukin-1 decreased Angiotensin II-induced hypertension and renal damage in mice, suggesting suppression of IL-1 may provide an additional strategy to protect against renal damage in hypertensive patients.

研究分野：分子血管学

キーワード：E4BP4 炎症 IL-1 腎障害 高血圧 新生内膜

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患(心筋梗塞・脳血管障害)などの炎症性疾患の発症・病態形成には、炎症の慢性化が深く関与している。本来、炎症は、生体防御反応として疾患を改善の方向に導くためのメカニズムであるが、その沈静化が効率良く働かない場合、炎症は慢性化し、各種難治性疾患へと移行する。そのため、炎症疾患の予後は、炎症性サイトカインやその沈静化を行う抗炎症性サイトカイン遺伝子の発現制御が重要である。E4BP4 は松果体細胞において 24 時間の周期で発現の変動する転写因子であり、生体リズムを制御する概日時計の進行を負に制御することが知られていた。最近の研究で E4BP4 は炎症性疾患や自己免疫疾患といった病態において炎症反応を沈静化させる役割をもつことが新たに示された。本研究の目的は、E4BP4 の動脈硬化形成における役割を種々の実験モデルを用いて明らかにすることにより、E4BP4 制御が動脈硬化や心筋梗塞の新たな予防法になり得ることを実証することである。従来の治療法とは全く異なった観点からの動脈硬化進行抑制法を開発することは、心筋梗塞を含めた心血管疾患発症の減少をもたらし、医療経済的にも大きな意義があると考ええる。

2. 研究の目的

動脈硬化性疾患の発症・病態形成には、高血圧や糖尿病、脂質異常症といった危険因子の他、炎症の慢性化が関与している。本来、炎症は生体防御反応として疾患を改善の方向に導くためのメカニズムであるが、その沈静化が働かない場合、炎症は慢性化し、各種難治性疾患へと移行する。そのため、炎症疾患の予後は、炎症性サイトカインやその沈静化を行う抗炎症性サイトカインの発現制御が重要となる。E4BP4 は 24 時間の周期で発現の変動する転写因子であり、生体リズムを制御する概日時計の進行を負に制御することが知られていた。最近の研究で E4BP4 は炎症性疾患や自己免疫疾患といった病態において炎症反応を沈静化させる役割をもつことが新たに示された。本研究の目的は、E4BP4 の動脈硬化形成における役割を種々の実験モデルを用いて明らかにすることにより、E4BP4 制御が動脈硬化の新たな予防法になり得ることを実証することである。

3. 研究の方法

今回我々は、下記の 2 つの実験系の結果を得ることができた。

(1) 時計遺伝子 E4BP4 の欠損は炎症性サイトカインを減少させ、傷害後の新生内膜形成を抑制することが示された。さらに、NK 細胞の発達は E4BP4 欠損によって障害されることも示唆された。(2) Ang II 誘発腎障害に対する IL-1Ra および抗 IL-1 抗体 (01BSUR) の効果を検討したところ、IL-1 の抑制はマウスにおいて、Ang II 誘発高血圧および腎障害を減少させることを実証した。

それぞれのテーマごとに、方法を記載する。

(1) E4BP4 は、概日リズムに関連する転写因子であり、炎症を制御することが報告されている。そこで E4BP4 が、血管損傷後の新生内膜形成にどのように関与しているかを検討した。E4BP4 欠損マウス (E4BP4^{-/-}) および野生型マウス (WT) を用いて、大腿動脈カフ傷害より 2 週間後の新生内膜形成を観察し、内膜と中膜の面積を測定した。各マウスの内膜および内膜病変を定量化するために等間隔に 10 個の断面を用い、NIH Image 1.55 (National Institutes of Health, public domain software) を用いて内膜および内膜の面積を測定した。MAC-3 陽性細胞は外膜でカウントした。IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、NK 細胞 (NKp46) および pSTAT1 陽性面積を各血管層 (内膜、中膜および外膜) で計算し、血管総面積に対するパーセンテージで表した。

(2) アンジオテンシン II (Ang II) 誘発腎障害に対する IL-1Ra の作用を調べるために、野生型 (WT) マウスと IL-1Ra 欠損 (IL-1Ra^{-/-}) マウスに、皮下浸透圧ポンプを用いて Ang II (1000ng/kg/分) を 14 日間注入した。

マウス個体の血圧を直接測定するために、植え込み型マウス血圧トランスミッターを使用した。ベースラインの平均動脈圧 (MAP) を記録した後、皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプ (Alzet) を介して Ang II (毎分 1000ng/kg) を注入することにより高血圧を誘導した。IL-1Ra^{-/-} マウスと WT マウスを無作為に 4 群に分けた: WT + 生理食塩水、IL-1Ra^{-/-} + 生理食塩水、WT + Ang II、IL-1Ra^{-/-} + Ang II。Ang II 注入 14 日後に組織学的変化といくつかの mRNA 発現をチェックした。

Ang II 誘発高血圧および腎障害における IL-1 の作用を検討するために、IL-1Ra^{-/-} および WT マウスの両方に Ang II 注入後 1 週間に 2 回、7.5mg/kg のマウス IL-1 モノクローナル抗体 (01BSUR) またはコントロール IgG2a を腹腔内注射した。01BSUR は Novartis Pharmaceutical から贈与いただいた。

エンドセリン-1 (ET-1) の、Ang II 誘発性高血圧および腎障害に対する効果を評価するために、ボセンタン (アクテリオン社製) を IL-1Ra^{-/-} マウスに有効 100mg/kg/day で 14 日間投与した。血圧が Ang II 誘発腎障害に及ぼす影響を評価するため、ヒドララジンを 250mg/L/day の用量で投与した。

Ang II または生理食塩水を 14 日間投与後、代謝ケージを用いて 24 時間尿を採取し、血液も採取した。Ang II 投与 14 日後の mRNA 発現を測定するため、各群から 4~8 匹のマウスを使用した。サンプルより全 RNA を単離し、cDNA 作成後に定量的 PCR を施行した。

血圧測定後、マウスを安楽死させ、生理食塩水に続いて 4% パラホルムアルデヒドで灌流した。腎臓を 10% ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋して切片化した。すべてのサンプルは、糸球体傷害を判定するために PAS で染色し、尿細管間質線維化を評価するために Elastica Masson で染色した。スコアは各糸球体の PAS 陽性の面積で評価した (0、正常; 1、0-25%; 2、25-50%; 3、50-75%; 4、75-100%)。最終的な平均スコアを糸球体損傷スコアとして算出した。尿細管間質領域の線維化を定量化するために、腎髄質の 5 つの領域を無作為に選択し、線維性変化を示した各領域の割合を測定した。免疫染色は Discovery XT stainer を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 収縮期血圧は群間で同程度であった。また、ベースラインの体重に群間で有意差はなかった。E4BP4^{-/-}-マウスでも WT マウスでも、対側のコントロール大腿動脈には新生内膜形成は観察されず、血管壁にも構造的な差は見られなかったことから、E4BP4^{-/-}-マウスでは 8~12 週齢まで血管の成長は正常であることが示唆された。

傷害を受けた動脈における E4BP4 の役割を評価するために、E4BP4^{-/-}-マウスと WT マウスの両方でカフ傷害後の血管の変化を調べた。E4BP4^{-/-}-マウスの平均内膜面積および内膜/中膜比は、WT マウスと比較して 86% ($p < 0.0001$)、97% ($p < 0.0001$) 減少した。しかし、内側面積 ($p = NS$) では、群間に有意差は認められなかった。

炎症細胞の動員を確認するため、マクロファージ (MAC-3) の免疫組織化学染色を行った。マクロファージはカフ損傷後に外膜に動員される主要な炎症細胞であったが、好中球と T 細胞はまれであった。しかし、マクロファージの数 ($p = NS$) には 2 群間で有意差は認められなかった。傷害後の NK 細胞の集積に対する E4BP4 欠損の影響を評価するために、NK 細胞 (NKp46) の免疫組織化学を行った。E4BP4^{-/-}-マウスの外膜における NKp46 陽性領域の割合は、受傷後 14 日目に WT マウスと比較して有意に低かった ($p < 0.05$)。

傷害後の E4BP4 の役割を評価するために、免疫組織化学を用いて炎症性サイトカイン IL-6、TNF- α および IFN- γ の発現をさらに検討した。内膜では、IL-6 ($p < 0.05$)、TNF- α ($p < 0.05$) および IFN- γ ($p < 0.05$) は、WT マウスより有意に少なかった。

これまでの報告では、IL-6 や IFN- γ は STAT1 依存的に炎症性シグナルを増幅することが示されているため次に、STAT1 の発現を検討した。活性型 STAT1 (pSTAT1) を発現している部位の定量化を行ったところ、内膜、中膜ともに、E4BP4^{-/-}-マウスの pSTAT1 発現陽性面積率は、WT マウスに比べてはるかに少なかった (内膜: 内膜: WT マウス: $0.53 \pm 0.19\%$ [$n = 5$] vs. E4BP4^{-/-}-マウス: $0.01 \pm 0.01\%$ [$n = 5$], $P = 0.0268$, 中膜: WT マウス: $0.42 \pm 0.06\%$ [$n = 5$] vs. E4BP4^{-/-}-マウス: $0.02 \pm 0.00\%$ [$n = 5$], $p < 0.001$)。以上の結果は、E4BP4 が血管傷害後の血管炎症を誘導する可能性を示していると考えられた。

(2) Ang II 注入 14 日目 (1000ng/kg/分) IL-6 の血清濃度は IL-1Ra^{-/-}-マウス 605 ± 125 ($n = 14$) に対し WT マウス 10 ± 2 pg/mL ($n = 12$) であった ($p < 0.001$)。ET-1 は血管収縮と腎線維化の主要なメディエーターであり、Ang II は ET-1 産生を誘導することが報告されている。腎臓の preproET-1 mRNA 発現は、WT マウスと比較して IL-1Ra^{-/-}-マウスで有意に高かった (2.6 倍、 $p < 0.001$)。ET-1 の血清レベルも、Ang II 注入 14 日後に IL-1Ra^{-/-}-マウスで WT マウスより高かった。

Ang II を注入したマウスの MAP もモニターした。ベースライン時、MAP は両群で同程度であった (IL-1Ra^{-/-}-マウス: 132 ± 2.1 ($n = 8$) vs. WT マウス: 129 ± 4.2 mmHg ($n = 8$))。IL-1Ra^{-/-}-マウス、WT マウスともに MAP は 2 日目までに有意に上昇した。MAP は IL-1Ra^{-/-}-マウスでは 8 日目までに、WT マウスでは 10 日目までにピークに達し、両群とも 14 日間の Ang II 注入終了まで持続的

に高値を示した。また、IL-1Ra 欠損マウスでは、Ang II 誘発高血圧が有意に高かった。組織学的解析では、糸球体傷害と尿細管間質線維化は、Ang II を注入した IL-1Ra^{-/-}マウスは Ang II を注入した WT マウスと比較すると有意に悪化していた。

腎機能を調べるために、24 時間クレアチンクリアランス、ならびに尿中および腎組織中の KIM-1 と NGAL のレベルを分析した。Ang II 投与 14 日目に、IL-1Ra^{-/-}マウスでは、尿中アルブミンレベル、血清 BUN およびクレアチニンレベルが WT マウスに比べて有意に上昇した。さらに、クレアチンクリアランスは IL-1Ra^{-/-}マウスで有意に減少した。尿中および腎組織の KIM-1 および NGAL の濃度は、Ang II を投与した IL-1Ra^{-/-}マウスでは、Ang II を投与した WT マウスに比べて有意に上昇した。定量的 PCR により、腎臓における TGF- β の mRNA レベル(2.4 倍、 $p < 0.001$) は、Ang II 注入 14 日後において WT マウスと比較して IL-1Ra^{-/-}マウスで有意に増加した。これらの所見は、IL-1Ra 欠損が Ang II 注入後の腎障害を促進することを示唆している。

Ang II を投与した IL-1Ra^{-/-}マウスにおける IL-1 β 、TNF- α 、IL-17A の mRNA 発現量は 4 群中最も高かった。線維化マーカーに関しては、腎臓の I 型コラーゲンの mRNA レベルは、Ang II 注入 14 日後に WT マウスと比較して IL-1Ra^{-/-}マウスで有意に増加していた。

腎髄質は ET-1 の主な産生源であり、Ang II を注入した IL-1Ra^{-/-}マウスと WT マウスの両方の髄質に豊富な ET-1 が検出された。興味深いことに、IL-1Ra^{-/-}マウスの糸球体および皮質の尿細管では、WT マウスと比較して ET-1 発現が上昇しており、ET-1 の上昇が Ang II を注入した IL-1Ra^{-/-}マウスの糸球体および尿細管間質の線維化に寄与している可能性が示された。

免疫染色により、Ang II を注入した IL-1Ra^{-/-}マウスは、Ang II を注入した WT マウスと比較して、腎臓におけるマクロファージの浸潤が有意に増加していることも示されたことから、IL-1Ra 欠損は Ang II 注入後の腎臓の炎症を悪化させることが示唆された。

次に、O1BSUR をマウスに投与したところ、IL-1Ra^{-/-}マウスの血漿中 IL-6 濃度は、IgG2a と比較して有意に減少した ($p < 0.01$)。さらに、O1BSUR 処置は、IgG2a 処置と比較して、IL-1Ra^{-/-}マウスにおける 14 日後の Ang II 誘導高血圧を軽減した。組織学的検討により、糸球体傷害と尿細管間質線維化が、O1BSUR 処置 IL-1Ra^{-/-}マウスにおいて、IgG2a 処置 IL-1Ra^{-/-}マウスと比較して有意に減少したことが示された。これらの所見は、O1BSUR が Ang II 誘発の炎症と腎障害を抑制することを示唆している。

エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンは、IL-1Ra^{-/-}マウスにおける 14 日目の Ang II 誘導腎障害を有意に減少させた。糸球体傷害および尿細管間質線維化は、ボセンタン処置 IL-1Ra^{-/-}マウスにおいて有意に減少した。一方、降圧剤であるヒドラジンの投与は、Ang II を投与した IL-1Ra^{-/-}マウスにおいて、高血圧の改善が得られたにもかかわらず、腎障害を抑制しなかった。

結論として、我々は、IL-1 の阻害が、Ang II 誘発性高血圧を減少させ、腎障害を抑制することをマウスモデルで証明した。このことは、IL-1 阻害が、高血圧患者における慢性腎機能障害から保護するための新たな戦略となる可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Fukuda Kentaro, Funamizu Takehiro, Tamura Hiroshi, Isoda Kikuo	4. 巻 6
2. 論文標題 Horriifying shift of a giant thrombus during coronary intervention	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Heart Journal - Case Reports	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ehjcr/ytac177	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 Yasuda Hidetoshi, Isoda Kikuo, Okazaki Shinya, Minamino Tohru	4. 巻 4
2. 論文標題 Capture of Part of a Vessel Wall by a Coronary Orbital Atherectomy System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CJC Open	6. 最初と最後の頁 994 ~ 995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cjco.2022.09.004	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 Akita Koji, Isoda Kikuo, Ohtomo Fumie, Isobe Sarasa, Niida Tomiharu, Sato-Okabayashi Yayoi, Sano Motoaki, Shimada Kazunori, Iwakura Yoichiro, Minamino Tohru	4. 巻 135
2. 論文標題 Blocking of interleukin-1 suppresses angiotensin II-induced renal injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Science	6. 最初と最後の頁 2035 ~ 2048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/CS20201406	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 Sato-Okabayashi Yayoi, Isoda Kikuo, Heissig Beate, Kadoguchi Tomoyasu, Akita Koji, Kitamura Kenichi, Shimada Kazunori, Hattori Koichi, Daida Hiroyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Low-dose oral cyclophosphamide therapy reduces atherosclerosis progression by decreasing inflammatory cells in a murine model of atherosclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IJC Heart & Vasculature	6. 最初と最後の頁 100529 ~ 100529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijcha.2020.100529	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 Hiki Masaru, Ajima Tomohi, Takeuchi Mitsuhiro, Isoda Kikuo	4. 巻 29
2. 論文標題 Left ventricular apical aneurysm caused by takotsubo cardiomyopathy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 144 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2023.11.012	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 Niida Tomiharu, Takeuchi Mitsuhiro, Kataoka Kosuke, Isoda Kikuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Gastric emphysema with massive hepatic portal venous gas	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 e259865 ~ e259865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2024-259865	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 Niida Tomiharu, Isoda Kikuo, Tada Miho, Kitahara Satoshi, Fujino Yusuke	4. 巻 76
2. 論文標題 Successful healing of aneurysmal false lumen using a second-generation drug-eluting stent in spontaneous coronary artery dissection: a case report	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Egyptian Heart Journal	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s43044-024-00447-9	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 Kunimoto Mitsuhiro, Tabuchi Haruna, Isoda Kikuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Pacemaker Implantation with Absent Right Superior Vena Cava	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Case Reports	6. 最初と最後の頁 1300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.29011/2574-7754.101300	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 1.Niida T, Isoda K, Kitamura K, Okabayashi Y, Kadoguchi T, Ohtomo F, Shimada K.
2. 発表標題 Blocking of interleukin-1 suppresses both angiotensin II-induced renal inflammation and hypertension
3. 学会等名 ESC Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohtomo F, Isoda K, Niida T, Kitamura K, Okabayashi Y, Kadoguchi T, Shimada K, Minamino T
2. 発表標題 Inhibition of interleukin-1 suppresses both angiotensin II-induced hypertension and renal injury
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Niida Tomiharu, Isoda Kikuo, Ohtomo Fumie, Akita Koji, Kitamura Kenichi, Kadoguchi Tomoyasu, Minamino Tohru
2. 発表標題 The Effect of Endothelin-1 on Angiotensin II-Induced Renal Injury
3. 学会等名 American Heart Association 's annual Scientific Sessions 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Niida Tomiharu, Isoda Kikuo, Otomo Fumie, Akita Koji, Kitamura Kenichi, Kadoguchi Tomoyasu, Minamino Tohru.
2. 発表標題 Inhibition of Endothelin-1 Suppresses Both Angiotensin II-induced Renal Inflammation and Hypertension
3. 学会等名 第87 回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------