

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年～2011年

課題番号：21790700

研究課題名（和文） 動脈硬化性アテロームの進展および破綻における MafB の役割の解明

研究課題名（英文） A role of MafB in development and rupture of atherosclerotic plaques

研究代表者

渡邊 哲（WATANABE TETSU）

山形大学・医学部・講師

研究者番号：40359568

研究成果の概要（和文）：マクロファージ特異的DN-MafBマウスとApoE欠損マウスを交配させ、MafBが動脈硬化に与える影響を検討した。高脂肪食を与え著明な動脈硬化を生じさせるところ、ApoE欠損マウスとDN-MafB/ApoE欠損マウスでは大動脈動脈硬化巣の形成に有意差を認めず。しかしDN-MafB/ApoE欠損マウスでは、necrotic coreが大きく、線維被膜が薄く、不安定プラークを呈していた。マクロファージのアポトーシスと活性酸素産生の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：There was no difference in development of atherosclerotic plaques between ApoE<sup>-/-</sup> and DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup> mice. However, more necrotic cores and fewer fibrous tissues were shown in atherosclerotic plaques in DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup> mice than in ApoE<sup>-/-</sup> mice. DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup> mice had more apoptotic macrophages and production of reactive oxygen species in the atherosclerotic plaques than ApoE<sup>-/-</sup> mice. DN-MafB may be associated with vulnerability of atherosclerotic plaques.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化, マクロファージ, プラーク破綻

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は年々増加し、平成16年の心疾患・脳血管疾患死亡統計によれば、心疾患と脳血管疾患の合計死亡者は29万人で悪性新生物に近い死亡数となる。動脈硬化の予防は重要な課題であり、その発症・進展の機

序を解明し治療法を確立することは急務である。病理学的には動脈硬化初期の脂肪線条および動脈硬化アテローム病変においてマクロファージの集簇が認められる。VCAM1 (vascular cell adhesion molecule-1) や MCP1 (monocyte chemotacting protein-1)

は単球の内膜への接着、遊走およびマクロファージの保持に参与し、動脈硬化を促進することが報告されている。マクロファージは、スカベンジャー受容体を介し酸化 LDL を取り込み泡沫化し、動脈硬化プラークの増大をもたらす(右図)。また種々のサイトカインや増殖因子などを発現・分泌し、動脈硬化の形成過程において中心的な役割を果たす。また matrix metalloproteinase (MMP)などを分泌し、プラークの線維性被膜を菲薄化することや、血管平滑筋細胞のアポトーシスを惹起することで、プラーク破綻に参与すると言われている。そこで我々は、マクロファージの分化と活性化に重要な役割を果たす転写因子 MafB に注目し、動脈硬化との関係について検討を行うこととした。MafB は Maf 蛋白ファミリーに属し、AP 1 型 basic-leucine zipper 転写因子の 1 つである(右図)。MafB は他の骨髄転写因子と異なり、単球とマクロファージに選択的に発現しており (Cell 1996;85:49-60)、単球の分化に重要な役割を果たす (Blood 2005;105:2707-2716, EMBO J 2000;19:1987-1997)。当教室では喫煙暴露による閉塞性肺疾患患者およびマウスモデルで、MafB がマクロファージのアポトーシスに参与していることを報告した (Am J Respir Mol Cell Biol 2007)。またマクロファージ細胞株にプラスミドベクターを用いて遺伝子導入し、MafB 強制発現細胞株と恒常的発現抑制細胞株を作成した。興味深いことに MafB 強制発現細胞株では LOX1 (oxidized LDL receptor1)およびスカベンジャー受容体 CD36 のメッセンジャーRNA の増加が見られた。逆に恒常的発現抑制細胞株 shRNA を用いて MafB をノックダウンするとこれらの発現を抑制することがわかった。これより MafB は LOX1 の発現、アポトーシスの制御を通して、動脈硬化の進展およびアテローム破綻に参与しているという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

当研究の目的は、動脈硬化の発症、進展におけるマクロファージ転写因子 MafB の機能を明らかにすることである。上記および microarray の結果に加え、マウスのカフ動脈硬化モデルにおいても MafB の発現を認めた。動脈硬化の発症における MafB の働きを *in vitro* および *in vivo* で検討する。

## 3. 研究の方法

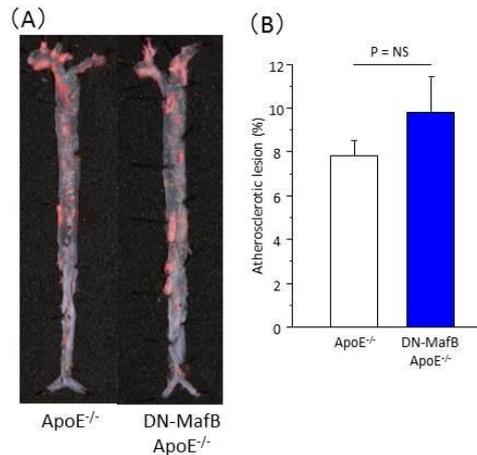
MafB 強制発現細胞株と恒常的発現抑制細胞株を用いた *in vitro* 研究に加えて、MafB の機能を抑制させる遺伝子改変マウスを作成し、機能解析を行う。過去の報告では MafB 遺伝子欠損マウスは生後早期に死亡してしまう。そこで我々はマクロファージ特異的に MafB の機能を抑制させる Dominant Negative

(DN: 遺伝子工学的に蛋白質の活性部位を除いた変異蛋白質) 遺伝子改変マウスを作成した (Jin DI et al. Mol Cell Biol 1995, Kelly LM et al. EMBO J 2000, Horvai A et al. PNAS 1995)。この DN-MafB 遺伝子改変マウスを用いて、MafB の動脈硬化進展における役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

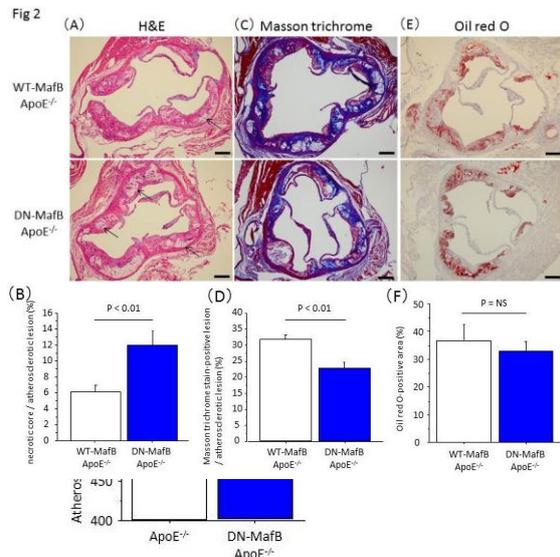
WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>マウスと DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>の両群間で、高脂肪食 9 週間与えた後の体重、心重量体重比に有意差を認めなかった。また、血清総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪に、両群間で有意差を認めなかった。

Fig 1



高脂肪食を 9 週間与えた両群間で、動脈硬化形成に違いがあるかを検討した。大動脈縦断像の Sudan-IV 染色、及び大動脈基部横断像のヘマトキシリン・エオジン染色にて動脈硬化面積を定量評価したところ、WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>と DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>の両群間で有意差は見られなかった (Fig. 1)。

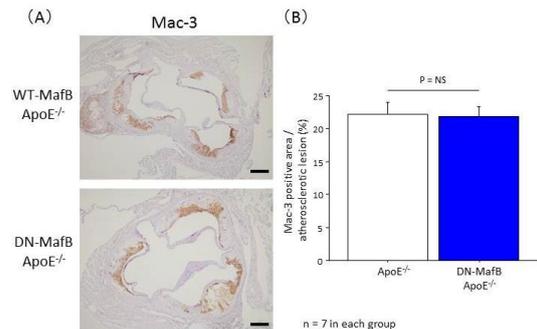
Fig 2



プラークの質的評価として、ヘマトキシリン・エオジン染色で acellular に抜ける領域

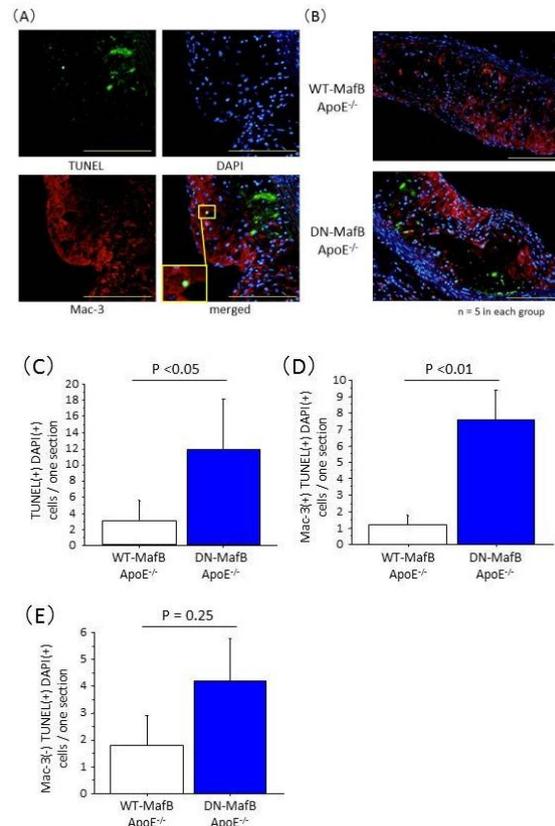
を necrotic core として測定した。DN-MafB / ApoE<sup>-/-</sup>では WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>に比し有意に necrotic core 面積が大きかった。また、マッソン・トリクローム染色で DN-MafB / ApoE<sup>-/-</sup>において有意な collagen 染色域の低下を認めた。しかし oil-red O 染色によりプラーク内脂質沈着は、両群間で有意差は認めなかった。プラークの量的な差は認めなかったが、質的な違いとして、DN-MafB / ApoE<sup>-/-</sup>は WT-MafB / ApoE<sup>-/-</sup>に比し、不安定なプラークを呈する可能性が示唆された (Fig. 2)。

Fig 3



マクロファージ特異的抗原 Mac-3 を免疫染色し、プラーク内のマクロファージの集簇を検討した (Fig. 3A)。しかし動脈硬化性プラーク中におけるマクロファージの存在は、両群間で有意差はないと考えられた (Fig. 3B)。

Fig 4

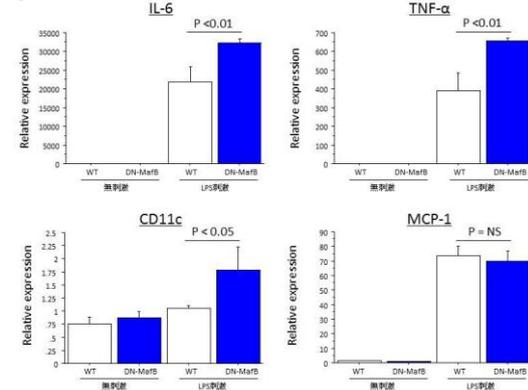


次に TUNEL 法を用い、プラーク内のアポトーシス細胞を評価した。DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>にお

いて WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>より有意にプラーク内のアポトーシス細胞が多かった (Fig. 4B, 4C)。

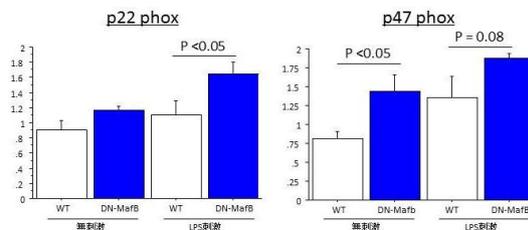
さらに TUNEL 陽性マクロファージは DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>で有意に多く、DN-MafB / ApoE<sup>-/-</sup>のプラーク内ではマクロファージのアポトーシスが増加していることが示唆された (Fig. 4A, 4D)。非マクロファージ TUNEL 陽性細胞も、DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>で増加傾向を認めたが、有意差は見られなかった (Fig. 4E)。

Fig 5



LPS 刺激は、マクロファージを炎症性マクロファージ M1 へ極性化させる (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29;1419-1423)。チオグリコレート刺激による滲出性腹腔マクロファージに対し、LPS 刺激を行い、各種 M1 マーカーの mRNA 発現を検討した (Fig. 5)。IL-6 と TNF-α は、LPS 刺激により両群とも著明な反応を認め、DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>において WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>より有意に増加した。また CD11c は DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>においてのみ有意な増加を認めた。一方、MCP-1 は両群で有意差を認めなかった。

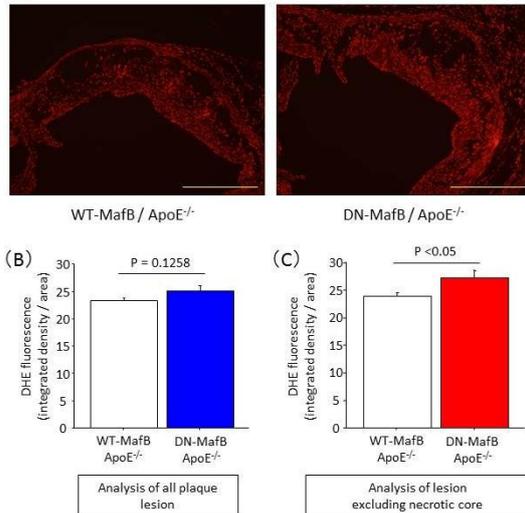
活性酸素の産生に重要な役割を果たす NADPH オキシダーゼの活性化に関与する p22 phox、p47 phox についても同様に検討を行った。p22 phox は、LPS 刺激された DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>において WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>より有意に増加した。p47 phox は無刺激状態で DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>において WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>より有意に増加していた。LPS 刺激では、統計学的に有意ではないものの、DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>において WT-MafB / ApoE<sup>-/-</sup>より増加傾向を認めた。



これより DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>のマクロファージは、WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>に比し活性酸素を産生しやすい可能性が示唆された。次に、DHE 染

色を用いてプラーク内での活性酸素種を評価した (Fig. 6A)。プラーク全体を解析すると、両群間で有意差は見られなかったが (Fig. 6B)、necrotic core を除外して解析したところ、DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>で WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>に比し有意に強い蛍光を認めた (Fig. 6C)。

Fig 6  
(A)



DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>マウスでは、動脈硬化の進展には WT-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>と有意差を認めなかったが、necrotic core を多く認めた。DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>ではプラークのcollagen染色域が少なく、アポトーシスを生じたマクロファージが多かった。また活性酸素種の発生も有意に多かった。DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>由来の腹腔マクロファージは、炎症性マクロファージM1の性質を有していた。DN-MafB/ApoE<sup>-/-</sup>では不安定プラークの性状を有していると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 31 件)

- ① Tamura H, Watanabe T, Nishiyama S, Sasaki S, Wanezaki M, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Kubota I. Prognostic value of low left atrial appendage wall velocity in patients with ischemic stroke and atrial fibrillation. *J Am Soc Echocardiogr.* 2012; 25: 576-583. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2012.01.012>
- ② Funayama A, Watanabe T, Tamabuchi T, Otaki Y, Netsu S, Hasegawa H, Honda S, Ishino M, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyamoto T, Nitobe J, Kubota I. Elevated cystatin C levels predict the incidence of vasospastic angina.

*Circ J.* 2011; 75: 2439-2444. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-11-0008>

- ③ Tamura H, Watanabe T, Nishiyama S, Sasaki S, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Hirono O, Kubota I. Increased left atrial volume index predicts a poor prognosis in patients with heart failure. *J Card Fail.* 2011; 17: 210-216. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.10.006>
- ④ Suzuki S, Shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event. *Eur J Clin Invest.* 2011; 41: 759-766. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02465.x>
- ⑤ Nishiyama S, Watanabe T, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Shibata Y, Konta T, Kawata S, Kato T, Fukao A, Kubota I. Trends in coronary risk factors among patients with acute myocardial infarction over the last decade: the Yamagata AMI registry. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17: 989-998. 査読有 <http://dx.doi.org/10.5551/jat.4671>

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① Ishino M, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Netsu S, Funayama A, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: Pentraxin 3 is essential for neointima formation after vascular injury. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, Fukuoka International Congress Center; March 16-18 2012
- ② Funayama A, Shishido T, Ishino M, Ohtaki Y, Netsu S, Hasegawa H, Honda S, Kadowaki S, Narumi T, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Cardiac-specific overexpression of high mobility group box 1 (HMGB1) prevents cardiac dysfunction induced by pressure overload. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, Fukuoka International Congress Center; March 16-18 2012
- ③ Netsu S, Shishido T, Ishino M, Funayama

- A, Kadowaki S, Narumi T, Ohtaki Y, Hasegawa H, Honda S, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Overexpression of midkine aggravates cardiac dysfunction and adverse myocardial remodeling induced by pressure overload. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, Fukuoka International Congress Center; March 16-18 2012
- ④ Ishino M, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Netsu S, Funayama A, Arimoto T, Nishiyama S, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: Deficiency of the long pentraxin PTX3 deteriorates neointimal hyperplasia after vascular injury. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America; November 12-16 2011
- ⑤ Netsu S, Shishido T, Ishino M, Kadowaki S, Narumi T, Otaki Y, Funayama A, Honda S, Hasegawa H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Midkine exacerbates cardiac hypertrophy and remodeling in response to pressure overload. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America; November 12-16 2011
- ⑥ Funayama A, Shishido T, Netsu S, Ishino M, Otaki Y, Honda S, Hasegawa H, Kadowaki S, Narumi T, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Kuwahara K, Nakao K, Takeishi Y, Kubota I: Cardiac-specific overexpression of high mobility group box 1 (HMGB1) attenuates cardiac dysfunction induced by pressure overload. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America; November 12-16 2011
- ⑦ Kato S, Watanabe T, Suzuki S, Ishino M, Sasaki T, Shishido T, Sadahiro M, Kubota I: Atrial endothelial impairment through toll-like receptor-4 signaling may cause atrial thrombogenesis. XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010, Kyoto; Kyoto International Conference Center, May 13-16 2010

〔図書〕(計1件)

- ① 渡邊哲、久保田功. **Brugada** 症候群. 循環器疾患最新の治療 2012-2013. pp349-351. 南江堂、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 哲 (WATANABE TETSU)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：40359568