

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591337

研究課題名(和文)マクロファージのCOX-2を介したPPAR活性化機序と動脈硬化抑制効果の解析

研究課題名(英文)Effect of overexpression of COX-2 on the progression of atherosclerosis via activation of PPARs in macrophages

研究代表者

吉永 佳代(竹田佳代)(Yoshinaga, Kayo)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10537088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はCOX-2過剰発現マクロファージによるPPARs活性化機序とそれに引き続く抗動脈硬化作用の有無を確認することであり、本研究の結果COX-2過剰発現マクロファージにおいて内因性のリガンド上昇を介したPPAR α 、PPAR γ 活性上昇を認めること、LPSによるTNF- α 、MCP-1、MMP-9の発現はCOX-2過剰発現マクロファージでは有意に減弱し、またABCA1、ABCG1の産生は増加することを見出した。その後マクロファージ特異的COX-2-Tg-apoE-KOマウスの作成を行ったが、マウス作成の確認ができておらず、現在も確認作業中である。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to investigate whether overexpression of COX-2 induces PPARs-dependent anti-atherogenic action in macrophages and macrophage-specific COX-2 transgenic mice. We revealed that overexpression of COX-2 induced intracellular ligand-dependent activation of PPARs in macrophages. Moreover, LPS-induced expression of TNF- α , MCP-1 and MMP-9 were down-regulated, and expression of ABCA-1 and ABCG1 were up-regulated in COX-2-overexpressed macrophages. Furthermore, we next prepared the macrophage-specific COX-2 transgenic mice. Now, we are genetically confirming the succession of the preparation of the mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：脂質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

現在わが国では、生活スタイルの変化から糖尿病、高血圧、脂質異常症といった生活習慣病の増加が認められ、その結果、脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患の急増が深刻な社会問題に繋がっている。この動脈硬化症の発症・進展を阻止すること、そのための新しい予防法、治療法の開発は、医療財政の改善や患者QOLの改善に繋がる国家的命題であると言える。

核内受容体に属する peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR) 及び PPAR は、脂質代謝、糖質代謝に関与する転写因子であり、それぞれ脂質異常症治療、糖尿病治療のターゲット分子となっている。一方、この PPAR、 の活性化が血管構成細胞に対し直接的な抗動脈硬化作用を誘導することも知られている。

Cyclooxygenase-2 (COX-2) は、細胞内プロスタグランジン合成に重要な役割を持つ酵素であり、その中でも COX-2 は、細胞内常在型の COX-1 と違い、サイトカインなどの炎症惹起因子に反応して誘導される誘導型の酵素である。COX-2 の発現誘導は細胞内プロスタグランジン産生を引き起こし、種々の炎症応答を惹起すると考えられている。しかしこの COX-2 産生誘導による細胞応答に関しては、未だ不明な点も多い。実際、COX-2 の選択的阻害薬は、実臨床で抗炎症薬として用いられているが、その中で一部の COX-2 阻害剤は心血管イベントを有意に増加させることが報告されていること、抗動脈硬化作用を有するスタチンが、COX-2 の産生誘導効果を持つことなどから、COX-2 の発現増強が動脈硬化抑制効果を示す可能性がある。加えて我々は、COX-2 発現プラスミドを用いた細胞内 COX-2 発現増強により、マクロファージの PPAR 活性が上昇することを見出している。

2. 研究の目的

本研究は、マクロファージ特異的 COX-2 産生誘導マウスを作成し、このマウスが PPAR、 の活性化を介した動脈硬化進展抑制効果を誘導するか検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) RAW264.7 細胞に COX-2 発現プラスミド (pcDNA5-COX-2) を遺伝子導入し、さらに PPAR 或いは PPAR のリガンド結合部位の N 端側に Gal4 蛋白を結合させた変異蛋白発現ベクター (pMX-PPAR or pMX-PPAR) と Gal4 の DNA 結合領域をその上流に持つ Luciferase reporter plasmid (p4xUASg-tk-luc) を遺伝子導入 (PPARs ligand binding assay) し、24 時間培養したのちにその Luciferase 活性を測定した。また同時に COX-2 過剰産生マクロファージの細胞内プロスタグランジン (15d-PGJ₂、PGE₂、PGD₂) の生成量を Enzyme Immunoassay 法にて測定した。

2) RAW264.7 細胞に対し、COX-2 発現プラスミドを遺伝子導入し、その 24 時間培養後に LPS 存在下、非存在下にて 4 から 24 時間培養し、mRNA、細胞蛋白及び培養液を回収。TNF-、IL-1、MCP-1、MMP-9、ABCA1、ABCG1 産生を Real-time RT-PCR 法、Western Blot 法、ELISA 法にて検討した。また、PPAR、PPAR の siRNA を遺伝子導入し、COX-2 過剰発現マクロファージでのこれら抗動脈硬化作用への PPAR、 活性化の関与について検討した。

3) ヒト SR-A プロモーターをその上流に持つ発現ベクターを用い、そのプロモーター部位の下流にヒト COX-2 遺伝子を組み込んだ発現ベクター (pSR-A-COX-2) を構築。次にこの発現ベクターがマクロファージ特異的に COX-2 発現能を持ちうるかを、マクロファージ系の細胞である RAW264.7 細胞と SR-A 発現能をもたない 293 細胞への遺伝子導入を行い、Western blot 法にて確認した。

4) 3) で作成した pSR-A-COX-2 をもとに、マクロファージ特異的 COX-2-Tg マウスの作成を申請者の所属する大学の専門施設 (熊本大学 生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究部門) に依頼。作製したキメラマウスを交配し、尾部より回収した DNA を解析することでマクロファージ特異的 COX-2-Tg マウスの生成を確認する。

4. 研究成果

<平成23年度に実施した研究の成果>

COX-2発現プラスミド (pcDNA5-COX-2) を用いた COX-2 過剰発現 RAW264.7 細胞 (マクロファージ) を構築し、その細胞の PPAR、PPAR 活性を Luciferase 法で測定したところ、コントロールの細胞に比し有意な PPAR、PPAR 活性上昇を認めた。また、COX-2 過剰産生マクロファージの細胞内 15d-PGJ₂、PGE₂、PGD₂ 生成量は有意に上昇した。

COX-2 過剰発現 RAW264.7 細胞に対し LPS 存在下、非存在下にて 4 から 24 時間培養し、mRNA、細胞蛋白及び培養液を回収。TNF-、MCP-1 の産生を Real-time RT-PCR 法、ELISA 法にて検討したところ、LPS による TNF-、MCP-1 の発現は COX-2 過剰発現 RAW264.7 細胞では有意に減弱した。さらに PPAR、PPAR の siRNA で PPAR、PPAR の発現を抑制させた COX-2 過剰発現 RAW264.7 細胞では、これら TNF-、MCP-1 の発現減弱効果は有意に回復した。

<平成24年度及び平成25年度に実施した研究の成果>

前年度に施行できなかった MMP-9、ABCA1、ABCG1 の産生に対する COX-2 過剰発現の影響に関する検討を invitro の実験系で行い、COX-2 過剰発現により MMP-9 の産生抑制、ABCA1、ABCG1 の産生増加が起ることを確認した。

以上 ~ の結果から、COX-2 の過剰発現は、マクロファージでの PPAR、PPAR 活性を上

昇させること、さらにこれらPPAR、PPAR活性上昇を介した抗動脈硬化作用を発揮することが考えられ、COX-2過剰発現が動脈硬化症に対し進展抑制効果の示す可能性が示唆された。

次に、in vivoの検討を行う目的で、マクロファージ特異的COX-2-Tgマウスの作成として、以下の1)、2)を行った。

1) ヒトSR-Aプロモーターをその上流に持つ発現ベクターを用い、そのプロモーター部位の下流にヒトCOX-2遺伝子を組み込んだ発現ベクター(pSR-A-COX-2)を構築した。次にこの発現ベクターをマクロファージ系腫瘍細胞であるRAW264.7細胞とSR-A発現能をもたない293細胞への遺伝子導入を行ったところ、RAW264.7細胞のみでCOX-2のmRNAレベル、蛋白レベルでの発現を認めた。

2) 1)で作成したpSR-A-COX-2をもとに、マクロファージ特異的COX-2-Tgマウスの作成を申請者の所属する大学の専門施設(熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究部門)に依頼した。

得られたキメラマウスの尾部より回収したDNAを鋳型とし、ヒトSR-AプロモーターとヒトCOX-2遺伝子に相応するプライマーを数種作成、これらプライマーを用いて導入遺伝子の存在をPCRで確認したところ、全てのラインで目的とするbase pairの複製DNAを確認できたが、negative controlに用いたC57/bl6マウスのDNAからも同様の複製DNAが得られたため、プライマーペアの数を増やし、再度確認を行った。しかし20種以上の組み合わせを施行したが、やはりnegative controlでのDNA複製が全てのプライマーペアで確認されたため、マクロファージ特異的COX-2-Tg-apoE-KOマウスの作成が確認できていない。鋳型となるDNAのコンタミネーションではないことは確認できたが、特異性の確認ができていないことから、現在得られた複製DNAのシーケンスを行い、複製DNAの特異性を確認中である。またPCRでの確認作業を断念し、サザンプロットでの確認を行うための、特異的プローブの作成中である。

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 8件)

1. Uchimura K, Hayata M, Mizumoto T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Morinaga J, Onoue T, Yamazoe R, Ueda M, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi N, Ogawa W, Fukuda K, Kondo T, Matsumura T, Araki E, Tomita K, Kitamura K. The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. *Nat Commun.* 5;3428, 2014. 査読有

2. Kinoshita H, Matsumura T, Ishii N, Fukuda K, Senokuchi T, Motoshima H, Kondo T, Taketa K, Kawasaki S, Hanatani S, Takeya M, Nishikawa T, Araki E. Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 431:124-130, 2013. 査読有

3. Matsumura T, Taketa K, Motoshima H, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Yamada S, Kukidome D, Kondo T, Hisada A, Katoh T, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Association between circulating leukocyte subtype counts and carotid intima-media thickness in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 12:177, 2013. 査読有

4. Shimoda S, Maeda T, Furukawa N, Ichinose K, Taketa K, Igata M, Senokuchi T, Matsumura T, Araki E: Evaluation of a new device for measurement of hemoglobin A1c for Japanese subjects. *Diabetol Int.* 4:112-116, 2013. 査読有

5. Taketa K, Matsumura T, Furukawa N, Araki E: Pharmacotherapeutic Options for the Prevention of Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes. *Clinical Medicine Reviews in Vascular Health.* 4:43-53, 2012. 査読有

6. Matsumura T, Taketa K, Shimoda S, Araki E: Thiazolidinedione-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ is a potential target for diabetic macrovascular complications. *J Diabetes Invest.* 3:11-23, 2012. 査読有

7. Matsumura T, Kinoshita H, Ishii N, Fukuda K, Motoshima H, Senokuchi T, Taketa K, Kawasaki S, Nishimaki-Mogami T, Kawada T, Nishikawa T, Araki E: Telmisartan exerts antiatherosclerotic effects by activating peroxisome proliferator-activated receptor- in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1268-1275, 2011. 査読有

8. Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E: Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 339-344, 2011. 査読有

[学会発表](計 17件)

1. 松村剛, 竹田佳代, 石井規夫, 本島寛之, 瀬ノ口隆文, 木下博之, 福田一起, 西川

- 武志, 荒木栄一: 肥満における血清脂質値へのコレステロール合成・吸収能の影響, 第 16 回日本病態栄養学会年次学術集会, 2013/1/12-2013/1/13, 京都
2. 松村剛, 石井規夫, 竹田佳代, 本島寛之, 木下博之, 福田一起, 瀬ノ口隆文, 西川武志, 荒木栄一: 2 型糖尿病における大血管・細小血管合併症進展の指標としての白血球分画の有用性. 第 27 回糖尿病合併症学会. 2012/11/2-2012/11/3, 福岡
 3. 島川明子, 村上彩子, 前田貴子, 田中里奈, 竹田佳代, 瀬ノ口隆文, 河島淳司, 下田誠也, 西川武志, 荒木栄一: Von-Hippel-Lindau 病に伴う糖尿病を合併した妊娠の 1 例. 第 50 回日本糖尿病学会九州地方会, 2012/10/19-2012/10/20, 久留米
 4. 瀬ノ口隆文, 竹田佳代, 河島淳司, 下田誠也, 佐藤美希, 荒木栄一: 20 歳代で発症した GAD 抗体陰性、IA-2 抗体陽性緩徐進行 1 型糖尿病の 1 例. 第 50 回日本糖尿病学会九州地方会, 2012/10/19-2012/10/20, 久留米
 5. 前田貴子, 下田誠也, 竹田佳代, 井形元維, 瀬ノ口隆文, 古川昇, 荒木栄一: 新規 HbA1c 測定キットと HPLC 法における測定精度の比較・検討. 第 50 回日本糖尿病学会九州地方会, 2012/10/19-2012/10/20, 久留米
 6. 福田一起, 松村剛, 木下博之, 石井規夫, 瀬ノ口隆文, 本島寛之, 竹田佳代, 西川武志, 荒木栄一: Cytosolic phospholipase A2 制御による PPAR 活性化を介したインスリン抵抗性改善効果の検討. 第 50 回日本糖尿病学会九州地方会, 2012/10/19-2012/10/20, 久留米
 7. 松村剛, 石井規夫, 竹田佳代, 本島寛之, 木下博之, 福田一起, 瀬ノ口隆文, 西川武志, 荒木栄一: 2 型糖尿病における大血管・細小血管合併症進展の指標としての白血球分画の有用性. 第 50 回日本糖尿病学会九州地方会, 2012/10/19-2012/10/20, 久留米
 8. 松村剛, 竹田佳代, 石井規夫, 本島寛之, 瀬ノ口隆文, 木下博之, 福田一起, 西川武志, 荒木栄一: 肥満における血清脂質値へのコレステロール合成・吸収能の影響. 第 33 回日本肥満学会, 2012/10/11-2012/10/12, 京都
 9. 木下博之, 松村剛, 福田一起, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 本島寛之, 竹田佳代, 西川武志, 荒木栄一: NADPH oxidase 阻害によるマクロファージ増殖抑制を介した大血管合併症進展抑制効果. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012/5/17-2012/5/19, 横浜
 10. 松村剛, 竹田佳代, 本島寛之, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 西川武志, 荒木栄一: 2 型糖尿病における白血球分画と糖尿病血管合併症との相関. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012/5/17-2012/5/19, 横浜
 11. 松村剛, 竹田佳代, 本島寛之, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 西川武志, 荒木栄一: 2 型糖尿病における白血球分画と糖尿病血管合併症との相関. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012/5/17-2012/5/19, 横浜
 12. Matsumura T, Taketa K, Motoshima H, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Nishikawa T, Araki E: Associations between circulating leukocyte subtype counts and carotid intima-media thickness in Japanese subjects with type 2 diabetes. The 72th Annual Meeting of American Diabetes Association, 2012/6/8-2012/6/12, Philadelphia, USA
 13. 福田一起, 松村剛, 木下博之, 石井規夫, 瀬ノ口隆文, 本島寛之, 竹田佳代, 西川武志, 荒木栄一: スタチンは SMC の PPAR 活性化を誘導し抗動脈硬化作用を発揮する. 第 49 回日本糖尿病学会九州地方会, 2011/10/14- 2011/10/15, 福岡
 14. 木下博之, 松村剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 福田一起, 本島寛之, 竹田佳代, 西川武志, 荒木栄一: スタチンによる血管構成細胞特異的 PPAR 活性化とその機序解明. 第 54 回日本糖尿病学会総会, 2011/5/19-2011/5/21, 札幌
 15. 嶋田さやか, 松村剛, 竹田佳代, 本島寛之, 石井規夫, 西川武志, 荒木栄一: 高コレステロール血症合併 2 型糖尿病における脂質検査値と動脈硬化進展度との関連. 第 54 回日本糖尿病学会総会, 2011/5/19-2011/5/21, 札幌
 16. 竹田佳代, 松村剛, 嶋田さやか, 水流添 覚, 本島寛之, 近藤龍也, 久木留大介, 古川 昇, 下田誠也, 宮村信博, 西川武志, 荒木栄一: 2 型糖尿病の脂質管理におけるピタバスタチンの有用性の検討. 第 54 回日本糖尿病学会総会, 2011/5/19-2011/5/21, 札幌
 17. 松村剛, 竹田佳代, 本島寛之, 石井規夫, 嶋田さやか, 木下博之, 福田一起, 西川武志, 荒木栄一: 2 型糖尿病における大血管合併症進展の指標としての血中単球数の有用性. 第 54 回日本糖尿病学会総会, 2011/5/19-2011/5/21, 札幌
- 〔図書〕(計 5 件)
1. 松村剛, 荒木栄一: PPAR の最新動向 PPAR 標的薬の開発動向. 期待されるチアゾリジン薬. pp3-4-308, フジメディカル出版, 東京, 2013
 2. 松村剛, 荒木栄一: エネルギー代謝関連因

子 PPAR の新規活性化機序解明と動脈硬化症進展抑制への応用 .日本体質医学会雑誌 . 75(1) : 70-73, 2013

3. 荒木栄一, 吉永(竹田)佳代: 強化インスリン療法. Current Therapy .30(7): 67-73, 2012
4. 竹田佳代, 荒木栄一: 糖尿病とインクレチン. 最新医学 66(1): 42-48, 2011
5. 竹田佳代, 荒木栄一: 糖尿病急性合併症. + 内分泌・糖尿病内科学(森昌朋編), 197-201, シュプリンガー ジャパン株式会社, 東京, 2011

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永佳代(竹田佳代)(YOSHINAGA KAYO)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10537088

(2) 研究分担者

荒木栄一(ARAKI EIICHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 10253733

松村 剛(MATSUMURA TAKESHI)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20398192

石井規夫(ISHII NORIO)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 10599111

(3) 連携研究者

該当なし