

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591117

研究課題名(和文) N-アセチルグルコサミン代謝によるマクロファージ機能制御と動脈硬化における役割

研究課題名(英文) Role of N-acetyl-glucosamine Metabolism in the Regulation of Macrophage Function and Atherosclerosis

研究代表者

北本 史朗 (Kitamoto, Shiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00380436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：培養マクロファージ(M₁)において、O結合型N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾は転写因子NF- κ Bの活性化抑制を介してM1型活性化を抑制し抗炎症的に働くことが示唆された。一方、西洋食負荷ApoE欠損マウスモデルでは、O-GlcNAc修飾増加処置は対照群と比較して動脈硬化病変に有意な影響を与えなかった。本ApoE欠損マウスモデルでは高脂血症とともに高血糖を示すこと、培養M₁におけるO-GlcNAc修飾増加による抗炎症作用は高グルコース条件下で減弱したことから、O-GlcNAc修飾はM₁機能を複雑に制御しており動脈硬化において抗炎症・炎症促進両作用を惹起することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：O-linked N-acetyl-glucosamine (O-GlcNAc) modification was suggested to have anti-inflammatory effects of reducing M1 phenotype activation via inhibition of NF- κ B transcriptional activity in cultured macrophages (M₁), whereas augmentation of O-GlcNAc modification had no significant effects on atherosclerotic lesions of apoE deficient mice fed with Western diet. Because this apoE deficient mouse model shows hyperlipidemia and hyperglycemia and the anti-inflammatory effects of O-GlcNAc modification were blunted in high-glucose condition in cultured macrophages, O-GlcNAc modification is suggested to complexly regulate macrophage functions and mediate both anti-inflammatory and pro-inflammatory effects in the pathogenesis of atherosclerosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：動脈硬化 マクロファージ シグナル伝達 生体分子 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、現代社会の主要な死因・後遺症の原因である脳卒中、狭心症、急性心筋梗塞など様々な疾患の原因となる重要な基礎病態である。しかし、スタチンを代表とする薬物治療、カテーテル血管形成術、外科的血行再建術など、現在の動脈硬化性疾患に対する治療法の有効性は未だに十分とはいえず、動脈硬化の新たな治療・予防法の開発は依然として重要な課題である。

動脈硬化は、動脈壁の血管内皮細胞の障害・機能異常に引き続く、単球を中心とした炎症細胞の接着・浸潤および血管内膜へのコレステロール沈着により発生する。浸潤した単球はマクロファージ (Mφ) へと分化し、沈着したコレステロールを貪食して脂質を大量に蓄積した泡沫細胞となり動脈硬化プラーク (粥腫) を形成する。また、これらのコレステロールは酸化などの生化学的修飾を受けており、これらの Mφ は活性化され炎症性サイトカイン・ケモカインを産生して慢性炎症を惹起し、その後の動脈硬化プラークの増大 (動脈狭窄) と不安定化 (プラーク破裂と血栓形成・動脈閉塞) の大きな原因となる。このように Mφ の泡沫化・活性化は、動脈硬化の発生・進展において重要な役割を果たしていることから、これらを標的とした治療戦略は極めて有効と考えられる。

申請者は、カニクイザルの動脈硬化モデルのマイクロレイ解析において、糖質分解酵素キチナーゼ遺伝子発現が動脈硬化病変サイズと相関することを発見し、キチナーゼの動脈硬化における役割を検討した。その結果、キチナーゼは Mφ においてコレステロール輸送蛋白 ABCA1、ABCG1 発現を増加してコレステロール排出能を高めること、M1 型 Mφ の活性化を抑制して M2 型 Mφ への分化を誘導し炎症性サイトカイン MCP-1、TNF α 発現を低下し抗炎症的に働くこと、が明らかとなった。また、キチナーゼ阻害剤投与により ApoE 欠損マウスの動脈硬化病変が増加したことから、キチナーゼはこれらのコレステロール排出促進・抗炎症作用を介して抗動脈硬化的に働くことが示唆された。これらの結果はこれまでに全く報告のない新しい知見であり、そのさらなる詳しいメカニズムの解明は、動脈硬化の新たな治療法の発見につながることを期待される。

キチナーゼはグリコシル結合加水分解酵素であり、その器質キチンを分解すると N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が遊離される。これまでに GlcNAc 投与が、小児の慢性炎症性腸疾患を改善すること (*Aliment Pharmacol Ther* 2000)、肥満細胞の抗原刺激による脱顆粒を抑制し実験的アレルギー反応を抑制すること (*Life Sci* 2010)、ヘル

パー T 細胞の免疫反応を抑制し実験的自己免疫性脳脊髄炎を改善すること (*J Biol Chem* 2011)、が報告されている。また、その下流の O 結合型 GlcNAc (O-GlcNAc) 修飾は、核内・細胞質内タンパク質のセリン・スレオニン残基に生じてその機能を制御していると考えられており、O-GlcNAc 修飾増加がバルーン傷害後の動脈の炎症および新生内膜形成を抑制すること (*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008)、NF- κ B p65 の O-GlcNAc 修飾が平滑筋細胞における TNF α による炎症性サイトカインの発現を抑制すること (*PLoS ONE* 2011)、が報告されている。さらに、培養肝細胞において脂質代謝制御に関わる転写因子 LXR が O-GlcNAc 修飾により活性化すること (*J Biol Chem* 2010) が報告されており、GlcNAc および O-GlcNAc 修飾が抗炎症的に働き、脂質代謝にも関与していることが示唆される。

2. 研究の目的

以上の背景より本研究は、GlcNAc および O-GlcNAc 修飾による Mφ の機能制御および動脈硬化の発生・進展における役割を解明することにより、動脈硬化の新しい予防・治療法の確立に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 実験

① <Mφ 機能における GlcNAc および O-GlcNAc 修飾の役割の検討>

培養 Mφ には、マウス Mφ 様細胞 RAW264.7 細胞、マウス腹腔内 Mφ およびマウス骨髄由来 Mφ を使用した。

培養 Mφ [10%FBS 低グルコース (1g/L) DMEM 培地で培養] に、GlcNAc 処置、UDP-GlcNAc 処置、O-GlcNAcase 阻害剤 PUGNAc (薬理的 O-GlcNAc 修飾抑制) 処置、siRNA 導入を用いた特異的 O-GlcNAcase 阻害による O-GlcNAc 修飾抑制処置、O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) 遺伝子過剰発現による O-GlcNAc 修飾増加処置を行い、各処置において、4 群 [1. コントロール群、2. 処置群、3. (LPS+IFN γ) 刺激群、4. (LPS+IFN γ) 刺激+処置群] を作成し、以下の Mφ 機能の評価を行った (LPS+IFN γ 刺激: M1 型 Mφ 活性化)。

(a) Boyden chemotaxis chamber を用いた遊走因子 MCP-1 に対する遊走能の評価

(b) コレステロール代謝能 (コレステロール取込み能・排出能、泡沫化)・コレステロール代謝関連遺伝子 (PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1、SR-B1、SR-A、CD36) 発現の評価

(c) M1/M2 型 M ϕ マーカー・炎症性サイトカイン (iNOS, IL-1 β , IL-6, IL-12, Fizz1, Arg1, IL-10, TNF α , MCP-1) 発現の評価

(d) 各種転写因子 (NF- κ B, AP-1, LXR α) の O-GlcNAc 糖鎖修飾および転写因子活性の評価

(2) *in vivo* 実験

①<動脈硬化発症 ApoE 欠損マウスを用いた動脈硬化の発生・進展における O-GlcNAc 修飾の役割の検討>

8 週齢の動脈硬化発症 ApoE 欠損マウスに GlcNAc を経口投与 [投与量 0.25 mg/ml (約 50 mg/kg/日)], もしくは O-GlcNAcase 阻害剤 PUGNAc を浸透圧ポンプの皮下留置により投与 (10mg/kg/日) し、6 週間西洋食 (21%脂肪、0.15%コレステロール) を与えた (各群 10 匹作製)。6 週間後、血圧・脈拍を測定した後に採血を行い、心臓~左右腸骨動脈分岐部を採取した。心臓~大動脈基部は新鮮凍結連続切片を作製し、各切片は mac-3 (M ϕ) 免疫染色、CD4 (T 細胞) 免疫染色、 α -actin (平滑筋細胞) 免疫染色を行い、動脈硬化病変の大きさ・性状を解析した。大動脈弓部~左右腸骨動脈分岐部 (各群 5 匹) はホルマリン固定後に切開・展開・ピン固定し、Oil red-O 染色を行い動脈硬化病変の表面積を計測した。また、個別に大動脈弓部~左右腸骨動脈分岐部 (各群 5 匹) からは mRNA (大動脈弓部) およびタンパク質 (下行大動脈~左右腸骨動脈分岐) を回収し、定量的 PCR 法、ウェスタンブロット法による評価を行った。

②<M ϕ 特異的 OGT 過剰発現マウスを用いた動脈硬化の発生・進展における O-GlcNAc 修飾の役割の検討>

マウス OGT 遺伝子の MGC cDNA クローン (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を入手し、cDNA 増幅後に確認シーケンスを行った。また、本クローンが OGT 遺伝子と異なる遺伝子であったため、マウス培養 M ϕ の tot1 mRNA より OGT 遺伝子をクローニングし、Cre 依存性組織特異的過剰発現マウス作製用ベクター (pCAGGS-loxP-EGFP-loxP plasmid) にサブクローニングして組織特異的 OGT 過剰発現マウスの作製を行った。

(3) *in vitro* 追加実験

<M ϕ 機能における GlcNAc および O-GlcNAc 修飾の作用に対するグルコース濃度の影響についての検討>

(1) の実験で確認された GlcNAc および O-GlcNAc 修飾の抗炎症作用に関して、グルコ

ース濃度の影響を、低グルコース濃度 (1g/L) 群、高グルコース濃度 (4.5g/L) 群で比較検討した。

(a) M1/M2 型 M ϕ マーカー・炎症性サイトカイン (iNOS, IL-1 β , IL-6, IL-12, Fizz1, Arg1, IL-10, TNF α , MCP-1) 発現の評価

4. 研究成果

(1) *in vitro* 実験

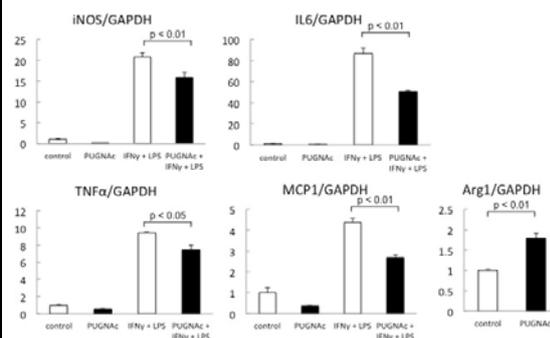
①<M ϕ 機能における GlcNAc および O-GlcNAc 修飾の役割の検討>

薬理学的実験では主に RAW264.7 細胞およびマウス腹腔内 M ϕ を使用した。O-GlcNAcase siRNA 導入および OGT 遺伝子導入にはエレクトロポレーション法を用いたが、初代培養 (マウス腹腔内および骨髄由来) M ϕ では遺伝子導入効率・生存率ともに不良であったため RAW264.7 細胞を使用した。なお、siRNA 導入実験では全ての検討において有意な一定の結果を得られず、O-GlcNAcase 遺伝子発現抑制が不十分であった可能性を否定できなかった。

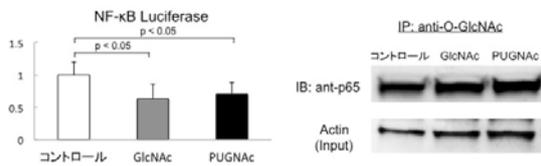
(a) マクロファージの遊走能に関しては、GlcNAc、UDP-GlcNAc、PUGNAc、OGT 遺伝子導入のいずれの処置においても、対照群と比較して有意な影響を認めなかった。

(b) コレステロール代謝能、コレステロール代謝関連因子に関しては、RAW264.7 細胞において GlcNAc、PUGNAc 処置により ABCA1 発現増加や泡沫化抑制傾向を認めたが、有意差は認められなかった。初代培養 M ϕ を用いた実験では、明らかな傾向を認めなかった。

(c) M1/M2 型 M ϕ マーカー・炎症性サイトカイン発現に関しては、GlcNAc、PUGNAc、OGT 遺伝子導入処置により、M1 型 M ϕ マーカー・炎症性サイトカイン発現減少と M2 型 M ϕ マーカー発現の増加を認めた [下図 (マウス腹腔内 M ϕ における PUGNAc 処置の実験結果)]。



(d) 転写因子 NF- κ B、AP-1、LXR α に関して検討を行った結果、O-GlcNAc 修飾増加 (GlcNAc、PUGNAc) 処置は NF- κ B 活性を抑制し、NF- κ B p65 蛋白の O-GlcNAc 修飾を増加した [下図、左: レポーター遺伝子アッセイ (RAW264.7 細胞)、右: 免疫沈降-ウェスタンブロット法 (マウス腹腔内 M ϕ)]。



以上の *in vitro* 実験の結果より M ϕ において O-GlcNAc 修飾は、転写因子 NF- κ B 活性の抑制を介して M1 型活性化を抑制し抗炎症的に働くことが示唆された。

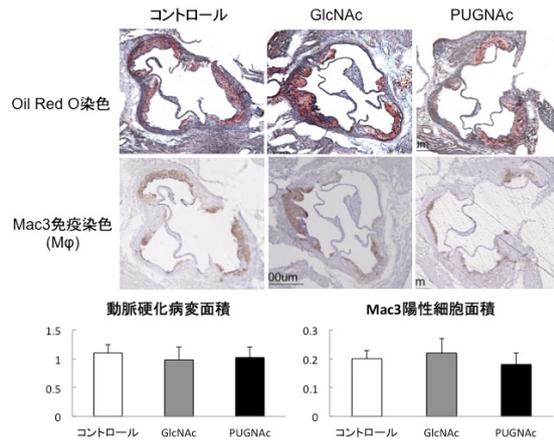
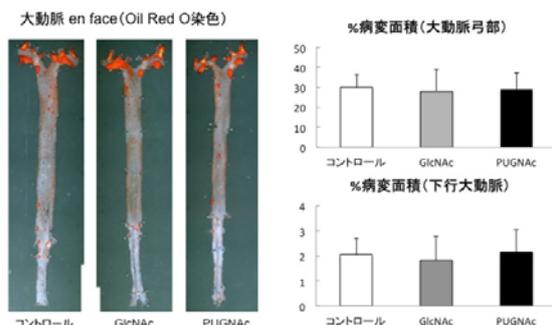
(2) *in vivo* 実験

① <動脈硬化発症 ApoE 欠損マウスを用いた動脈硬化の発生・進展における O-GlcNAc 修飾の役割の検討>

西洋食投与終了時の体重、収縮期血圧、心拍数、総コレステロール値、中性脂肪値に関して、対照群、GlcNAc 投与群、PUGNAc 投与群の 3 群間で有意差は認められなかった (下表)。

	n	体重	収縮期血圧	心拍数	総コレステロール	中性脂肪
コントロール	10	30.4 ± 1.4	113.6 ± 9.3	532.6 ± 21.4	906.6 ± 113.5	134.5 ± 87.9
GlcNAc	10	31.6 ± 2.5	118.1 ± 6.8	531.9 ± 23.9	911.6 ± 105.1	142.3 ± 42.3
PUGNAc	10	31.2 ± 1.9	112.9 ± 15.5	543.5 ± 49.4	907.5 ± 119.6	138.0 ± 15.4

下行大動脈より回収したタンパク質を用いて Western blot 解析を行い、GlcNAc および PUGNAc 投与群において O-GlcNAc 修飾タンパク質の増加を確認した。大動脈基部および大動脈の動脈硬化病変を解析した結果、予想に反し対照群と O-GlcNAc 修飾増加 (GlcNAc、PUGNAc) 処置群間において動脈硬化病変のサイズ・性状 (MOMA2 陽性 M ϕ 細胞浸潤等) に有意な差を認めなかった (下図)。



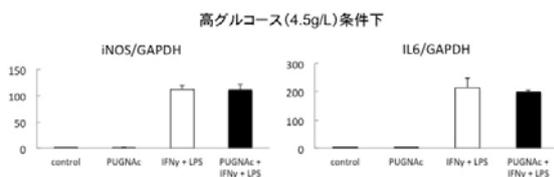
② <M ϕ 特異的 OGT 過剰発現マウスを用いた動脈硬化の発生・進展における O-GlcNAc 修飾の役割の検討>

OGT の MGC cDNA クローンを入手し cDNA を増幅・回収した。しかし、確認シーケンスを行った結果、正しい OGT 遺伝子ではなかったことから、マウス培養 M ϕ の tot1 mRNA より RT-PCR 法を用いてマウス OGT 遺伝子のクローニングを行った。このため、当初の予想以上の時間を要した。さらに、クローニングしたマウス OGT 遺伝子を Cre 依存性組織特異的過剰発現マウス作製用ベクター (pCAGGS-loxP-EGFP-loxP) にサブクローニングし、特異的 OGT 過剰発現マウスの作製を試みたが、最終年度中に目的の個体を得ることができなかった

(3) *in vitro* 追加実験

<M ϕ 機能における GlcNAc および O-GlcNAc 修飾の作用に対するグルコース濃度の影響についての検討>

(a) 低グルコース濃度群 (1g/L)、高グルコース濃度 (4.5g/L) 群で比較検討した。高グルコース条件下では前述の O-GlcNAc 修飾の抗炎症作用は減弱し、有意差は消失した [下図 (マウス腹腔内 M ϕ における PUGNAc 処置の実験結果)]。



総じて O-GlcNAc 修飾は M ϕ の炎症性フェノタイプを病態に応じて複雑に制御しており、動脈硬化において併存疾患により二面的 (抗炎症性・炎症促進性) 作用を惹起することが示唆された。

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 5 件)

- ① Kitamoto S, Egashira K, Ichiki T, Han X, McCurdy S, Sakuda S, Sunagawa K, Boisvert WA, Chitinase Inhibition Promotes Atherosclerosis in Hyperlipidemic Mice, *Am J Pathol.*, 査読有、183(1)巻、2013 年、313-325
- ② Ikeda J, Ichiki T, Matsuura H, Inoue E, Kishimoto J, Watanabe A, Sankoda C, Kitamoto S, Tokunou T, Takeda K, Fong GH, Sunagawa K., Deletion of phd2 in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling., *Journal of American Heart Association.*, 査読有、18;2(3) 巻、2013 年、e000178
- ③ Kitamoto S, Egashira K, Ichiki T, Han X, McCurdy S, Sakuda S, Sunagawa K, Boisvert WA, Chitinase Inhibition Promotes Atherosclerosis in Hyperlipidemic Mice, *The American Journal of Pathology*, 査読有、183 (1)巻、2013 年、313-325
- ④ Watanabe A, Ichiki T, Sankoda C, Takahara Y, Ikeda J, Inoue E, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K., Suppression of abdominal aortic aneurysm formation by inhibition of prolyl hydroxylase domain protein through attenuation of inflammation and extracellular matrix disruption., *Clinical Science (London)* 査読有、126(9)巻、2014 年、671-678
- ⑤ Hashimoto T, Ichiki T, Watanabe A, Hurt-Camejo E, Michaëlsson E, Ikeda J, Inoue E, Matsuura H, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K., Stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by AR-R17779 suppresses atherosclerosis and aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice, *Vascular Pharmacology*, 査読有、61(2-3)巻、2014 年、49-55

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kitamoto S, Egashira K, Ichiki T, Han X, Sakuda S, Sunagawa K, Boisvert WA, 発表表題 : Chitinase Inhibitor, Allosamidin, Accelerates Atherosclerotic Lesions in Hyperlipidemic Mice by Influencing M1/M2 Polarization and Cholesterol Metabolism in Macrophages, 学会名 : American Heart Association 2012 Scientific Sessions, 発表年月日 : 2012 年 11 月 5 日、発表場所 : Los angels, LA, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

北本 史朗 (KITAMOTO, Shiro)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号 : 0 0 3 8 0 4 3 6

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

William A. Boisvert

砂川 賢二 (SUNAGAWA, Kenji)

市来 俊弘 (ICHIKI, Toshihiro)