

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790305

研究課題名(和文) Nrf2を介した慢性炎症応答制御による動脈硬化症進行機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of transcription factor Nrf2 for arteriosclerosis through chronic inflammatory status

研究代表者

原田 伸彦 (HARADA, Nobuhiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20431439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化巣では炎症性マクロファージ(M1)や抗炎症性マクロファージ(M2)等の様々なマクロファージが混在し、この局所的な炎症応答バランスと病態進行との関連性が示唆されている。本研究では、転写因子Nrf2がこのマクロファージの炎症応答に関与しているかどうかを遺伝子改変動脈硬化症モデルマウスを用いて検証した。その結果、後期の動脈硬化巣においてNrf2はM1マクロファージに関与して動脈硬化巣の進行に促進的に働くことが明らかになった。これらについての成果論文は国際科学誌FRBMに掲載された。

研究成果の概要(英文)：It has become widely accepted that macrophages exhibit heterogeneity in the atherosclerotic plaques during the progression of atherosclerosis. Plaque-associated macrophages can undergo pro-(M1) and anti-inflammatory (M2) polarization depending on the inflammatory status. To clarify the roles of Nrf2 in atherogenesis, we used an ApoE and Nrf2 double KO mouse model. As a result, we have clarified the role of Nrf2 in the M1 macrophage cells during the development of atherosclerosis in late stage, which indicates that Nrf2 may influence the inflammatory reactions in the plaques. The paper containing these results was accepted for publication in FRBM.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：マクロファージ 慢性炎症

### 1. 研究開始当初の背景

近年、日本人の食事の西洋化が進むにつれて動脈硬化を基盤とする脳梗塞または心筋梗塞が重要な疾病の一つとなっており、効果的な予防・治療法の開発が期待されている。動脈硬化発症のメカニズムとして酸化仮説が提唱されている。酸化仮説によると高脂血症などにより生体内で増加した低比重リポタンパク (LDL) が活性酸素などにより酸化され、血管内皮細胞の障害を起し、血管壁内へ浸潤してきたマクロファージが酸化 LDL を貪食し泡沫細胞化が起り動脈硬化巣が形成していくとされている。

動脈硬化症は単なる脂質異常というだけではなく、慢性炎症性疾患ととらえられるようになってきた。病巣である血管壁内に浸潤してきたマクロファージを主体とした炎症細胞が様々な炎症応答を示し複雑な病態を形成していることが明らかになってきている。マクロファージの分化は炎症性サイトカイン等を発現するマクロファージ (M1) と抗炎症性サイトカイン等を発現するマクロファージ (M2) の大きく 2 つに分類される。動脈硬化巣では M1、M2 などの性状の異なるマクロファージが混在していて、これらが発現するサイトカインなどによる炎症応答バランスが病態に影響していると考えられている。最近の動脈硬化症モデルマウスを用いた報告では、病巣形成初期は M2 主体で集簇し、進行期では M1 主体に変化するということが示されている。このように硬化巣における炎症応答バランスが病態進行に関係があることが示唆されているが、詳細は不明である。Nrf2 は CNC ファミリーに属する bZip 型転写因子であり、親電子性物質や活性酸素により活性化され抗酸化剤応答配列 (ARE) に結合することにより異物代謝酵素や抗酸化タンパク質などの生体防御遺伝子群の発現を統一的に制御する。Nrf2 はマクロファージで抗酸化・抗炎症遺伝子群を誘導するので、動脈硬化症には抑制的に働くと考えられていたが、Nrf2 遺伝子欠損マウスでは動脈硬化症が抑制されることが明らかになってきた。我々の解析より、Nrf2 は動脈硬化巣形成の進行期でのみ促進的に影響を及ぼすことが明らかになった。近年、酸化リン脂質刺激により Nrf2 を介してヘムオキシゲナーゼ (HO-1) の発現を特徴とした Mox という新しいマクロファージに分化が起こることが報告された。これらの結果より Nrf2 は動脈硬化巣の進行期で動脈壁内のマクロファージの炎症応答バランスに関与し病巣の進行を促進することが予想される。この分子メカニズムの詳細を明らかにすることは、動脈硬化症予防・治療への新たな分子標的を示すことが出来るのではないかと考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) Nrf2 欠損マウスにおける動脈硬化巣の炎症応答バランスへの影響を明らかにす

る。動脈硬化症モデルマウスをもちいて Nrf2 の動脈硬化巣における病態進行と硬化巣のマクロファージ炎症応答バランス (M1, M2, Mox の存在比) への影響を明らかにする。

(2) 動脈硬化症に対するマクロファージとそれ以外の細胞における Nrf2 の役割を明らかにする。骨髓移植法を用いて動脈硬化巣の形成に対する Nrf2 のマクロファージとそれ以外の細胞での役割の違いについて明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) Nrf2 遺伝子欠損による動脈硬化症の進行度ごとの病態の違いを明らかにする。動脈硬化症モデルマウスである ApoE 遺伝子欠損マウスを Nrf2 遺伝子との二重欠損マウス [ApoE(-/-)::Nrf2(-/-)] を用いて、Nrf2 が動脈硬化巣形成に与える影響を解析する。ApoE(-/-) マウスおよび ApoE(-/-)::Nrf2(-/-) マウスを用いて高脂肪食 (含 1.25% コレステロール) を投与し、大動脈および大動脈洞の動脈硬化巣形成について解析する。動脈硬化巣形成は脂肪染色や免疫組織化学染色法によって病巣の大きさを評価する。これまでの解析により Nrf2 遺伝子欠損マウスでは、高脂肪食投与後 5 週間では動脈硬化巣の形成に差はみられないが、12 週間投与では硬化巣の抑制が起こることが明らかになっている (図 1)。

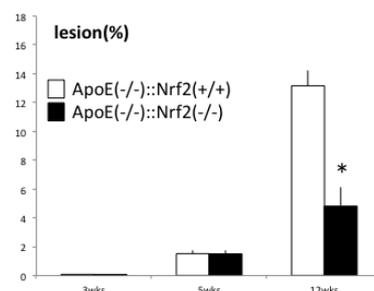


図1. 脂肪染色による大動脈全体の動脈硬化巣の定量

動脈硬化症 ApoE(-/-) マウスにおける Nrf2 遺伝子の有無による動脈硬化巣における遺伝子発現変化に関して高脂肪食投与前、5 週間投与、12 週間投与の動脈硬化巣の遺伝子発現について定量的 PCR 法を用いて経時的に解析し、病巣におけるマクロファージなどの性状の違いと病態との関係を明らかにする。特に硬化巣のマクロファージの M1、M2、Mox への分化について検証する。硬化巣のタンパク質の発現変化については免疫組織化学的染色により解析を行う。

(2) Nrf2 遺伝子欠損による動脈硬化巣抑制の責任細胞を明らかにする。(1) の解析でみられた炎症応答への Nrf2 の役割がマクロ

ファージによる応答で起こっているのかどうかを明らかにするために、*ApoE(-/-)::Nrf2(-/-)* マウスに、*ApoE(-/-)::Nrf2(+/+)* マウスの骨髄細胞 (BMC) を移植することにより骨髄由来細胞特異的に *Nrf2* の発現をレスキューする。また逆の組み合わせにより骨髄由来細胞特異的に *Nrf2* を欠損させる。このマウスで動脈硬化巣の形成への影響を比較するとともに、免疫組織学的方法により *Nrf2* の病巣における発現についても解析する。

#### 4. 研究成果

(1) *ApoE(-/-)::Nrf2(-/-)* マウスでは高脂肪食 5 週間投与、12 週間投与の動脈硬化巣の遺伝子発現について定量的 PCR 法を用いて経時的に解析したところ、12 週間投与の動脈硬化巣でのみ *Nrf2* の標的遺伝子である *SLPI*、*Ho-1*、*CD36*、*Txnd1* および *Srxn1* の発現が低下して (図 2) さらに M1 マクロファージのマーカー遺伝子である *Arg1* または *iNOS* の発現が有意に低下していた (図 3)。

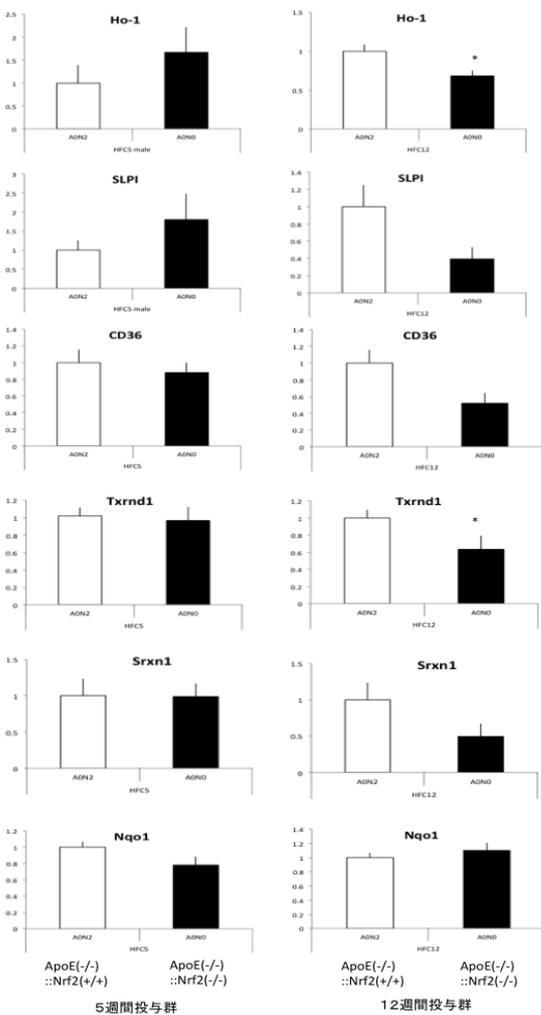


図2.動脈硬化巣におけるNrf2標的遺伝子群の発現

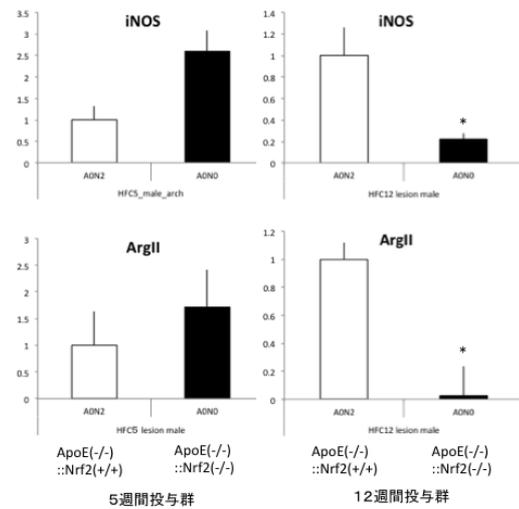


図3.動脈硬化巣におけるM1マクロファージのマーカー遺伝子群の発現

し、M2 のマーカー遺伝子である *Arg1* および *IL-10* の発現には変化が見られなかった (図 4)。

MOX の特徴である *Ho-1*、*Txnd1* および *Srxn1* の発現は *Nrf2(-/-)* では低下していた。また、動脈硬化巣の免疫学的解析により、後期の病巣の一部のマクロファージで *Nrf2* の発現亢進がみられることが明らかになった (図 5)。

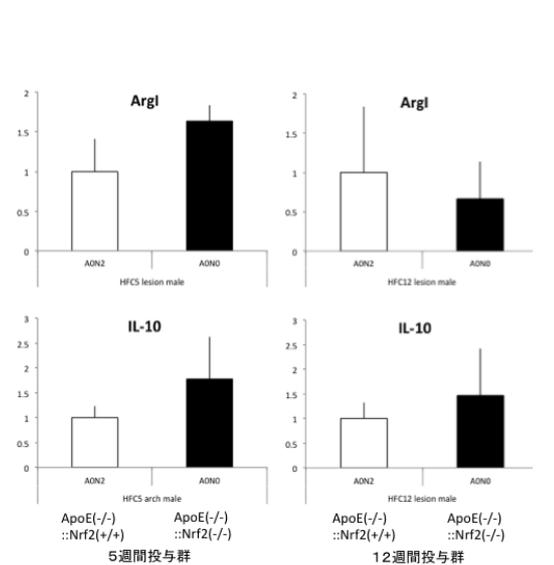


図4.動脈硬化巣におけるM2マクロファージのマーカー遺伝子の発現

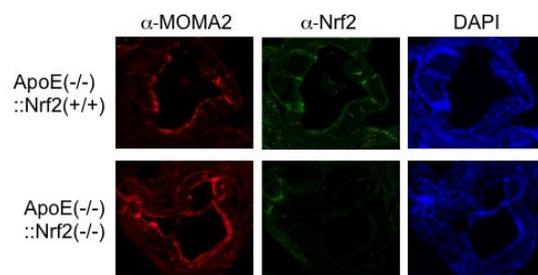


図5.大動脈基部の免疫組織染色像

与して動脈硬化症の病態を進行させることが示めされた。

(2) 骨髄移植により *ApoE(-/-)::Nrf2(+/+)* マウスに *ApoE(-/-)::Nrf2(-/-)* マウスの骨髄細胞を移植して、骨髄細胞特異的に *Nrf2* を欠損させ、高脂肪食を 12 週間投与したところ、*ApoE(-/-)::Nrf2(+/+)* マウスに *ApoE(-/-)::Nrf2(+/+)* マウスの骨髄細胞を移植させたマウスと比べて有意に動脈硬化巣の形成が抑制された(図6)。また、このマウスでは免疫組織学的解析により病巣の *Nrf2* の発現亢進が起きていないことが明らかになった(図7)。このことより、動脈硬化巣の形成には骨髄細胞(マクロファージ)の *Nrf2* が大きく関与していることが明らかになった。

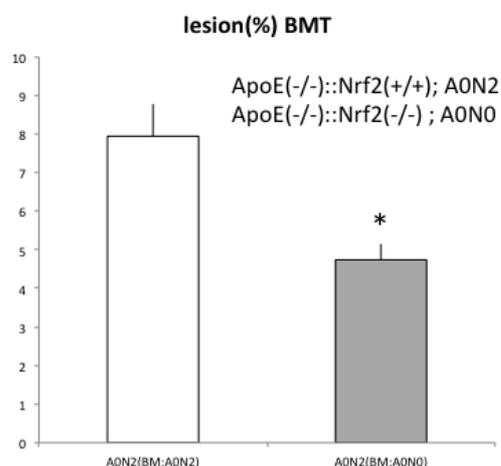


図6. 骨髄移植実験における脂肪染色による大動脈全体の動脈硬化巣の定量

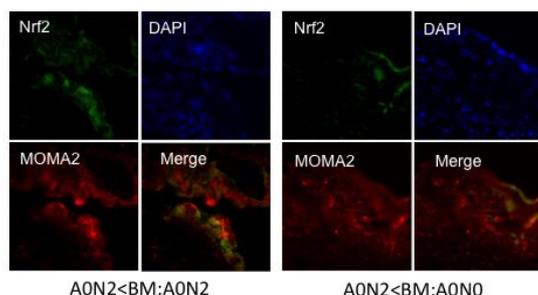


図7. 骨髄移植実験における大動脈基部の免疫組織染色像

以上の結果より、後期の動脈硬化巣では一部のマクロファージにおいて *Nrf2* が活性化していて、そのことが M1 マクロファージに影響して動脈硬化巣形成の亢進に関与することが示唆された。また、*Nrf2* 依存的と考えられている MOX マクロファージの動脈硬化症促進への関与も示唆された。

#### 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 1件)

1. Nobuhiko Harada, Koichi Ito, Tomonori Hosoya, Junsei Mimura, Atsushi Maruyama, Noriko Noguchi, Ken-ichi Yagami, Naoki Morito, Satoru Takahashi, Jon M. Maher, Masayuki Yamamoto, Ken Itoh, *Nrf2* in bone marrow-derived cells positively contributes to the advanced stage of atherosclerotic plaque formation, *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 2012, 2256–2262, doi: 10.1093/nar/gkt243. 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

1. 原田伸彦、三村純正、丸山敦史、山本雅之、伊東健、動脈硬化症に対する転写因子 *Nrf2* のマクロファージにおける役割について、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11~13 日、横浜市

〔図書〕(計 0件)

〔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

原田 伸彦 (HARADA, NOBUHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20431439

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: