

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790793

研究課題名(和文)ニューロメジンUの慢性炎症を介した動脈硬化誘発機序の解明

研究課題名(英文)The effect of neuromedin U to atherosclerosis caused by chronic inflammation

研究代表者

堀 美香(Hori, Mika)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：60598043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Apoe<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup> マウスは、高脂肪食負荷により、Apoe<sup>-/-</sup> マウスに対し血清総コレステロール値は2倍という非常に高値を示したが、動脈硬化性病変の進展は認められなかった。また、両マウスの腹腔マクロファージにおいて、酸化LDLの取り込みや酸化LDL 負荷時の炎症反応に差は認められなかった。

Nmu<sup>-/-</sup> マウスは高脂肪食負荷により脂肪性肝炎を誘発するが、Apoe<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup> マウスでは肝臓中の泡沫化マクロファージが増加するのみで脂肪性肝炎の誘発は認められなかった。これらのことから、NMU はコレステロール代謝及び何らかの炎症反応において重要な役割を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Serum total cholesterol level was 2-fold higher in Apoe<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup> mice in Apoe<sup>-/-</sup> mice by a high-fat diet (HFD) treatment. However, there were no differences between both mice in atherosclerosis progression by both en face and aortic valve section analysis. There were no differences between peritoneal macrophages in both mice in the uptake of ox-LDL or the inflammation induced by ox-LDL treatment.

Nmu<sup>-/-</sup> mice developed hepatic steatosis induced by HFD, but Apoe<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup> mice did not develop it but increased the number of lipid-laden macrophages. Our findings suggest that NMU has no effect on the development of atherosclerosis, but has significant roles in cholesterol metabolism and some inflammation reaction.

研究分野：医歯薬学

キーワード：動脈硬化 コレステロール マクロファージ 神経ペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリックシンドロームはがん、動脈硬化性疾患、自己免疫性疾患等のリスク因子として報告されている。メタボリックシンドロームは、本邦の死亡者の30%を占める動脈硬化性疾患の最大要因であると考えられる。しかしながら、メタボリックシンドロームがこれらの疾患にどのように寄与するのかが不明な点が多い。近年、肥満時の脂肪組織には炎症性サイトカインが存在し、組織中にマクロファージやT細胞が浸潤し慢性的な炎症状態「慢性炎症」を呈することが明らかにされている(Nishimura S et al., Nat. Med. 2009; 15: 914-920)。申請者はこれまでにN-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 投与ハムスターを用いた膵臓がん実験において、高脂肪食負荷により血清脂質及び内臓脂肪量の増加と共に、膵臓組織に脂肪細胞が著明に浸潤し、通常食群に比較して早期かつ高頻度にかんが発生することを明らかにした(Hori M et al. Pancreas, 2011; 40: 1234- 1240.)。このハムスターの膵臓において COX-2 等の炎症関連遺伝子の発現が上昇していたことから、膵臓内部の脂肪細胞を起因とした慢性炎症が膵臓がんの寄与することが示唆された。これらのことから、申請者は、慢性炎症の終末像の一端が膵臓がんとするなら、もう一端には動脈硬化症が存在するのではないかと考えた。

本研究では、慢性炎症の key molecule としてニューロメジン U (NMU) に着目した。NMU は視床下部由来の新規神経ペプチドとして当センターの寒川らにより発見され、その発現はユビキタスであるが、特に消化管、骨髄及び中枢神経系で高発現し、摂食抑制、血圧上昇作用などを有することが報告されている。また、*Nmu*<sup>-/-</sup>マウスは肥満を呈し、血清脂質、血糖値及び血圧上昇など、メタボリックシンドロームの病態を認めた(Harada R et al., Nat. Med. 2004; 10:1067-1073)。また、NMU はマクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞において発現が確認されていること、マスト細胞を介した炎症惹起作用を有すること、Th2 型 T 細胞において細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、サイトカイン産生を誘導することが報告されている(Moriyama M et al., J. Exp. Med. 2005; 202: 217-224; Jhonson EM et al., J. Immun. 2004; 173: 7230- 7238)。申請者は、脂質異常症と動脈硬化の発症メカニズムの解明およびその治療法の開発を目指した研究を行っており、*Nmu*<sup>-/-</sup>マウスに高脂血症の遺伝的負荷をかけるため、*Apoe*<sup>-/-</sup>マウスを掛け合わせた *Apoe*<sup>-/-</sup>*Nmu*<sup>-/-</sup>マウスを作製した。そこで、これらの遺伝子改変動物がメタボリックシンドロームの病態と血管壁における慢性炎症の成り立ちとの関連、そして動脈硬化発症、進展へのメカニズムの解析に有用であることに着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、慢性炎症の key molecule としての NMU のメタボリックシンドローム及び慢性炎症を介した動脈硬化性病変形成への寄与を明らかにし、新しい動脈硬化発症および進展の機序を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) *WT, Nmu*<sup>-/-</sup>, *Apoe*<sup>-/-</sup>, 及び *Apoe*<sup>-/-</sup>*Nmu*<sup>-/-</sup> マウスにおける動脈硬化性病変の比較検討

各マウスに高脂肪食を負荷し、20 週齢で解剖し、大動脈を採取し、ホルマリン固定後に脂肪染色 (Oil-red O 染色) を行い、病変の確認及び組織切片の作成を行った。染色後、動脈硬化性病変の大動脈全体に対する面積比を算出し、定量化した。また、同条件で各マウスの長期飼育を行い、生存率について検討し、心臓組織切片を観察した。

#### (2) *WT, Nmu*<sup>-/-</sup>, *Apoe*<sup>-/-</sup>, 及び *Apoe*<sup>-/-</sup>*Nmu*<sup>-/-</sup> マウス肝臓及び小腸における脂質代謝、炎症反応の検討

(1)で解剖した各マウスにおいて、血清生化学値の測定、肝臓及び小腸における遺伝子発現解析を RT-PCR により行った。肝臓組織における免疫組織染色及び Sudan III 染色を行った。また、各マウスの早期の病態を調べるために、9 週齢、13 週齢にて各マウスの解剖を行い、同様に解析を行った。

#### (3) *Apoe*<sup>-/-</sup> 及び *Apoe*<sup>-/-</sup>*Nmu*<sup>-/-</sup> マウス腹腔マクロファージにおける脂質代謝及び炎症反応の比較検討

各マウスに thioglycollate を腹腔内注射し、5 日後に腹腔マクロファージを回収し、酸化 LDL 存在下で 24 時間培養後、回収し、Oil-red O 染色を行った。また、脂質代謝・炎症関連遺伝子の発現について RT-PCR により検討を行った。

#### (4) 各マウスにおける腸内細菌叢の変化の検討

各マウスの糞から DNA を抽出し、T-RFLP 法により腸内フローラについて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) *WT, Nmu*<sup>-/-</sup>, *Apoe*<sup>-/-</sup>, 及び *Apoe*<sup>-/-</sup>*Nmu*<sup>-/-</sup> マウスにおける動脈硬化性病変の比較検討

高脂肪食負荷した *Apoe*<sup>-/-</sup>*Nmu*<sup>-/-</sup> マウスでは、*Apoe*<sup>-/-</sup> マウスに対し、血清総コレステロール値は 2 倍という非常に高値を示したが (3736 ± 996 mg/dL vs 1953 ± 275 mg/dL; p<0.01)、en face による大動脈の評価及び大動脈洞における組織切片の解析においてプラーク面積に差は認められなかった。また、*WT, Nmu*<sup>-/-</sup> マウスにおいては、プラークが認められなかった。しかしながら、高脂肪食を負荷した *Apoe*<sup>-/-</sup>*Nmu*<sup>-/-</sup> マウスは、*Apoe*<sup>-/-</sup> マウスに比較して生存率が低下していた。そこで、各マウスの心臓組織切片の解析を行ったところ、心臓

の中隔枝がコレステリンにより閉塞していることが明らかになった。このことから、*ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは、中隔枝のコレステリン閉塞により心筋梗塞が誘発され、生存率が低下していることが示唆された。

#### (2) *WT*, *Nmu<sup>-/-</sup>*, *ApoE<sup>-/-</sup>*, 及び *ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウス肝臓及び小腸における脂質代謝、炎症反応の検討

各マウスにおける肝臓組織切片の解析から、*WT* 及び *Nmu<sup>-/-</sup>* マウスは脂肪性肝炎を発症していることが明らかになった。一方、*ApoE<sup>-/-</sup>* 及び *ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは脂質を取り込んだ泡沫化マクロファージが多数出現するのみで、脂肪性肝炎の発症は認められなかった。また、肝臓におけるコレステロール量は、*ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは、血清コレステロール値と同様に、*ApoE<sup>-/-</sup>* マウスと比較して2倍であったが、肝臓のコレステロール合成及び代謝関連遺伝子の発現に量に差はみられず、CD68 のようなマクロファージ関連遺伝子の発現が2倍に上昇していた。

*ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは、9、13週齢においても、血清コレステロール値は、*ApoE<sup>-/-</sup>* マウスの2倍であった。また、*ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスの肝臓では、コレステロール代謝関連転写因子 SREBP2、及びその制御下にある LDL 受容体 (LDLR)、HMG-CoA 還元酵素の発現が *ApoE<sup>-/-</sup>* マウスと比較して低下していた。また、小腸においても LDLR の発現が低下していたことから、*ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスは、*ApoE<sup>-/-</sup>* マウスと比較し、各組織の LDLR からの血中コレステロールの取り込みの低下により、血清コレステロール値が上昇することが示唆された。

#### (3) *ApoE<sup>-/-</sup>* 及び *ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスの腹腔マクロファージにおける脂質代謝及び炎症反応の比較検討

各マウスの腹腔マクロファージにおいて、酸化 LDL の取り込みに差は認められなかった。また、酸化 LDL 添加時に、SREBP2、LDLR 等のような脂質代謝関連遺伝子や TNF $\alpha$  等の炎症関連遺伝子の発現に差は認められなかった。また、SR-A のようなスカベンジャー受容体の発現にも差は認められなかった。

#### (4) 各マウスにおける腸内細菌叢の変化の検討

*Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは、*WT* に比較して腸内細菌 Lactobacillales 属、Prevotella 属の増加が認められた。*ApoE<sup>-/-</sup>* 及び *ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは、腸内細菌叢に差は認められなかった。

#### 研究のまとめ

高脂肪食負荷した *ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは、*ApoE<sup>-/-</sup>* マウスに対し、血清総コレステロール値は2倍という非常に高値を示すにもかかわらず、動脈硬化性病変に差は認められないことが明らかになった。このことから、

*ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは、顕著な血清コレステロール値の上昇にもかかわらず、動脈硬化が進展しないことから、ApoE 欠損下において、NMU の欠損によりマクロファージの機能が変化するという仮説をたてた。しかしながら、両マウスの腹腔マクロファージにおける酸化 LDL の取り込み量や酸化 LDL 取り込み時の脂質代謝・炎症反応に差は認められなかった。また、9週・13週齢のような早期においては、*ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスの肝臓、小腸において、LDLR の発現が低下していたことから、*ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* マウスにおける顕著な高コレステロール血症の一因として、LDLR の発現低下が関与していることが示唆された。また、*Nmu<sup>-/-</sup>* マウスでは腸内細菌叢の変化が認められたことから、NMU は脂質代謝及びマクロファージ以外の炎症反応及び腸内細菌叢の変化との関連が示唆された。

#### 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)

〔学会発表〕(計8件)

(1) Mika Hori, Hitomi Komai, Toshihide Mizuno, Mariko Harada-Shiba; Increase of serum VLDL and LDL-cholesterol and decrease of the number of hepatic macrophages in *ApoE<sup>-/-</sup>Nmu<sup>-/-</sup>* mice, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月26日, パシフィコ横浜 (横浜)

(2) 長谷川夕希子, 堀美香, 中神朋子, 斯波真理子, 内湊安子, GLP-1 のコレステロール代謝に及ぼす影響, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2014年7月10日, 京王プラザホテル (東京)

(3) 長谷川夕希子, 堀美香, 中神朋子, 斯波真理子, 内湊安子, 肝細胞における GLP-1 のコレステロール代謝に及ぼす影響, 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014年5月24日, リーガロイヤルホテル (大阪)

(4) 堀美香, 駒井仁美, 水野敏秀, 斯波真理子, ニューロメジン U の役割と動脈硬化との関連, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月5日, 神戸国際展示場 (神戸)

(5) 堀美香, 水野敏秀, 斯波真理子, ニューロメジン U の脂質代謝及び動脈硬化との関わり, 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2013年11月23日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

(6) Mika Hori, Toshihide Mizuno, Mariko Harada-Shiba, Association of neuromedin U with lipid metabolism and atherosclerosis, 第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2013年7月18日, 京王プラザホテル (東京)

(7) Mika Hori, Toshihide Mizuno, Mariko Harada-Shiba, Association of neuromedin U with lipid metabolism; 81st European atherosclerosis society congress, Lyon, France, 2013年6月2日 Lyon, France

(8) Mika Hori, Mariko Harada-Shiba, The Bioactive Peptide Neuromedin U is Associated

with Lipid Metabolism and Inflammation, 第 35  
回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 14 日,  
マリンメッセ福岡 (福岡)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀 美香 (HORI MIKA)

国立研究開発法人国立循環器病研究セン

ター・研究所・上級研究員

研究者番号：60598043