

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870171

研究課題名(和文)末梢血細胞のインスリンシグナルに注目した新規動脈硬化マーカーの探索

研究課題名(英文)Discovery of novel markers for atherosclerosis

研究代表者

土屋 恭一郎 (TSUCHIYA, KYOICHIRO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60451936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージおよび血管内皮細胞においてフォークヘッド転写因子(FoxO)に調節される因子を探索した。マクロファージ特異的FoxO1/3a/4欠損マウス由来腹腔内マクロファージにおいて、炎症性遺伝子発現が野生型マウス由来腹腔内マクロファージと比較して顕著に抑制されていた。また、LPS刺激によるNF- $\kappa$ B p65サブユニットのリン酸化についてもMYFKOマウス由来腹腔内マクロファージにおいて抑制されていた。また、血管内皮細胞において、恒常活性型FoxO1の過剰発現によりlipocalin-2の発現が誘導されていた。

研究成果の概要(英文)：We explored forkhead transcription factors-dependent genes in macrophages and endothelial cells, using macrophage-specific FoxO1/3a/4-knockout mice and FoxO1-constitutive-active adenovirus, respectively. FoxO1/3a/4 ablation in macrophages markedly inhibited LPS-induced inflammatory responses. In EC, FoxO1 overexpression strongly induced lipocalin-2 expression.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

フォークヘッド転写因子(FoxO)は1, 3a, 4のサブファミリーを有し、インスリン(Ins)刺激によりAkt依存性にリン酸化され、核内より核外へ転出されることによりその転写活性が抑制される(図1)。2型糖尿病に代表されるIns抵抗性の病態では、肝・筋などのIns標的臓器と同様、血管内皮細胞(EC)やマクロファージ(Mφ)でもインスリン抵抗性が出現し、FoxOの持続的な活性化(=脱リン酸化)が認められる。申請者らは、ECとMφのFoxOの動脈硬化の発症・進展における影響を明らかにするため、ECまたはMφ特異的に全てのFoxOサブファミリーを欠損させたマウスを作製した。EC特異的FoxO欠損(EC-FoxO-KO)マウスでは顕著な動脈硬化の進展抑制が認められ、同マウスのECでは一酸化窒素の産生増加、炎症反応の抑制、及び細胞老化の遅延を認め、FoxOがECのIns抵抗性と動脈硬化をリンクする責任的因子であることが示唆された。一方、

Mφ特異的FoxO欠損(Mφ-FoxO-KO)マウスでは動脈硬化が促進し、細胞増殖の促進による末梢血単球数の増加が機序として考えられた。すなわち、動脈硬化の発症・進展においてFoxOは細胞種特異的に極めて重要な病態生理的意義を有することが考えられる。

2. 研究の目的

これらの知見より、ECまたはMφのFoxO活性はIns抵抗性を基盤とする動脈硬化の進展を反映していることが示唆される。従って臨床的には、これらの細胞のFoxO活性を評価することで、動脈硬化の疾患マーカーとして応用できる可能性が考えられる。

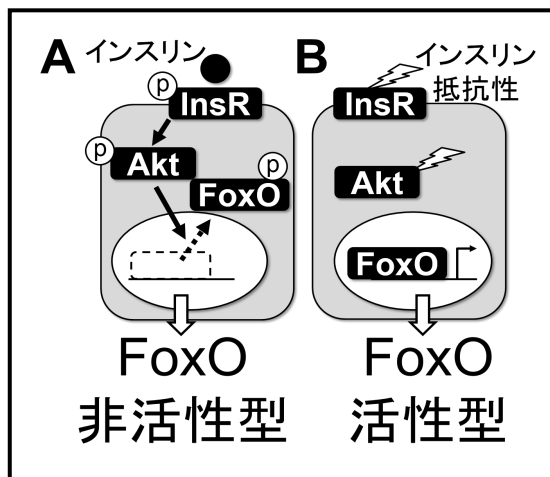
ECの直接採取は困難であるが、末梢血にはECの前駆細胞(endothelial progenitor cells: EPC)が存在しており、ECの代替となる可能性が考えられる。そこで本研究では、末梢血中のEPCと単球のInsシグナル/FoxO活性に注目した新たな動脈硬化マーカーの探索に取り組みたい。

3. 研究の方法

野生型およびMφ-FoxO-KOマウスよりチオグリコレート誘導性腹腔内マクロファージを採取し、LPS刺激後に遺伝子発現を解析した。また、マウスEC細胞株(MS-1細胞)にFoxO1の恒常活性型変異体(ADA-FoxO1)アデノウイルスを導入し、遺伝子発現を解析した。

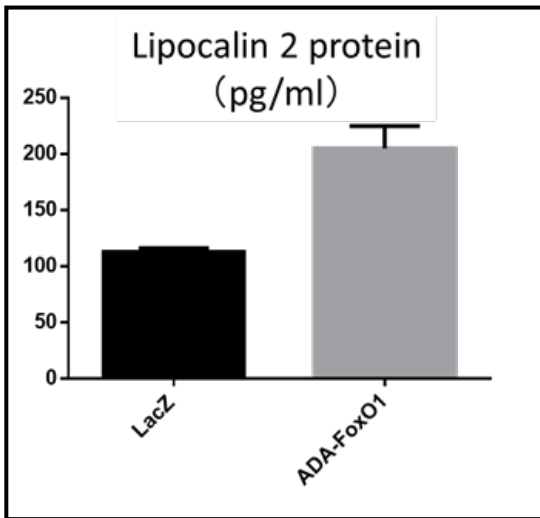
4. 研究成果

Mφ-FoxO-KOマウスにおいて、動脈硬化の表現型に関わるマクロファージの炎症性遺伝子発現について、チオグリコレート誘導性腹腔内マクロファージを用いて検討した。LPS(10ng/ml)刺激において、TNF-α, IL-6, IL-1β, iNOSなどの炎症性遺伝子発現はMYFKOマウス由来腹腔内マクロファージにおいて著明に発現が抑制されていた。また、LPS刺激によるNF-κB p65サブユニットのリン酸化についてもMYFKOマウス由来



**図1 インスリンシグナルによるFoxOの機能調節**(A)Ins抵抗性の非存在下では、Aktのリン酸化(p)を介してFoxOはリン酸化され、核外移行により転写因子として非活性型となる。(B)Ins抵抗性の病態ではFoxOのリン酸化は抑制され、活性型の状態を保つ。InsR:Ins受容体

腹腔内マクロファージにおいて抑制されていた。これまで、FoxO1 は LPS の受容体 TLR-4 の発現を負に制御することで炎症抑制性に作用していると報告されていたが、FoxO1, 3a および 4 全てを欠損した Mφ-FoxO-KO マウス由来腹腔内マクロファージにおいては、TLR-4 とその会合分子の発現は mRNA および蛋白レベルともに変化を認めなかった。従って、MYFKO マウス由来腹腔内マクロファージにおける LPS 誘導性炎症性遺伝子の発現抑制には、TLR-4 シグナルの発現調節とは異なる機序が想定され、TLR-4 以下 NF-κB p65 サブユニット活性化に至るいずれかのステップに作用していると考えられた。また、EC においては、FoxO1 の恒常活性型変異体 (ADA-FoxO1) アデノウィルスをマウス血管内皮細胞株



**図 2 ADA-FoxO1 過剰発現における培養上清の lipocalin-2 蛋白濃度 ELISA 法による測定**

(MS-1 細胞)に過剰発現させ、DNA マイクロアレイ解析を施行した。ADA-FoxO1 (100MOI)により FoxO1 mRNA は約 30 倍に上昇を確認した。DNA マイクロアレイ解析により、36 の遺伝子の発現が ADA-FoxO1 により 2 倍以上に増加していた。このうち、Lcn2 (lipocalin-2/NGAL) は定量的 RT-PCR 及び ELISA 法において遺伝子発現及び蛋白分泌の増加が確認された(図

2)。lipocalin-2 はグラム陰性菌に対する鉄イオン封鎖効果による強力な静菌作用を持つ物質として同定された (Nature 2004;432:917-921)。EC 機能との関連においては、ラットへの lipocalin-2 投与により血管組織の eNOS 機能不全 (eNOS アンカップリング)、酸化ストレス産生の増加を伴い、血管機能障害が惹起されることが報告されている (Br J Pharmacol 2012;165:520-31)。しかし、EC 由来の Lipocalin-2 の意義、及びインスリン抵抗性・FoxO による発現調節機構は明らかになっていない。今後、インスリンシグナル及び FoxO による発現調節機構と血管生物学的意義を明らかにしていきたい。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

土屋 恭一郎 (TSUCHIYA, Kyoichiro)

東京医科歯科大学医学部附属病院 助教

研究者番号: 60451936