

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870420

研究課題名(和文) 動脈硬化発症におけるCDMファミリー分子の役割とその制御機構

研究課題名(英文) The regulatory mechanism and the role of CDM family protein in atherosclerosis

研究代表者

實松 史幸 (Sanematsu, Fumiyuki)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80381094

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)：アテローム性動脈硬化発症の原因とされる泡沫細胞の形成過程において、「マクロピノサイトーシス」経路を介してLDLを蓄積することが知られている。しなしながら、その詳細なメカニズムは明らかではない。本研究は、泡沫細胞形成過程におけるRac活性化分子DOCK1/2/5の役割を理解することを目的とした。今回の解析により、DOCK1/2/5がマクロピノサイトーシス形成機構に関与していることを見出し、泡沫細胞形成に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Foam cell formation through macropinocytosis in atherosclerosis pathophysiology has been already established. However, detailed mechanism remains to be determined. This study aims to analyze the role of DOCK1/2/5 as Rac activator in foam cell formation. We discovered that the uptake of dextran-FITC was significantly reduced in bone marrow macrophage of DOCK1/2/5 triple knockout mice. Treatment of CPYPP as DOCK 1/2/5 inhibitor in wild type bone marrow macrophage showed the similar result. We found that DOCK1/2/5 function links macropinocytosis formation, suggesting that DOCK1/2/5 participate in foam cell formation. It leads to elucidate their pathogenesis and develop novel therapies.

研究分野：病態医化学

キーワード：マクロファージ 動脈硬化 マクロピノサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは体内に侵入した異物や細菌などを貪食することでそれらの除去に当たる、生体防御の最前線で働く免疫細胞である。一方、マクロファージは酸化及びアセチル化された変性 LDL(低比重リポ蛋白)を貪食し、細胞内に脂肪滴を蓄積し**泡沫細胞**となることが知られており、このマクロファージの泡沫細胞化はアテローム性動脈硬化の病態原因として考えられている。マクロファージによる変性 LDL を取り込む経路としては、SR-A や CD36 等のスカベンジャー受容体による細胞内取り込み経路があり、それらの取り込み経路についての解析は盛んに行われきた(*Cardiovasc Res.* 75: 468-477, 2007; *BBA* 1771: 1117-1124, 2007)。しかしながら、SR-A/CD36 ダブルノックアウトしたマウスにおいても動脈硬化プラーク形成が確認され、スカベンジャー受容体経路以外の「未知の LDL 取り込み経路」があることが示唆された(*J Clin Invest* 115: 2192-2201, 2005)。一方、マクロファージの新規の LDL 取り込み経路として、マクロピノサイトーシスによる取り込み経路が存在すること(*J Biol Chem* 277: 34573-80, 2002; *J Biol Chem* 280: 2352-60, 2005)、LDL 受容体ノックアウトマクロファージでも野生型と変わらずコレステロールを取り込む(*Plos One* 8: 58054, 2013)ことが報告されてきた。

CDM ファミリーは線虫からヒトに至るまで進化的に保存された分子であり、低分子量 G タンパク質の上流で機能することで、細胞骨格の制御にかかわっている。CDM ファミリーに属する Rac 活性化分子として、広範囲の細胞に発現している DOCK1(DOCK180)が知られている。現在まで培養細胞株を用いた解析より、DOCK1 は細胞運動、アポトーシス細胞の貪食、神経突起形成を制御することが報告されている(*Cell* 107: 27-41, 2001; *Nat. Cell Biol.* 2: 899-905, 2000; *Nature* 424: 461, 2003)。近年、申請者は Rac 活性化分子である DOCK1 が胚発生時における心血管形成に必須な分子であること(*Circ. Res.* 107: 1102-1105, 2010)、及び Dorsal ruffle 形成には DOCK1 が特異的に必須であり

DOCK5 は必須ではなく、その分子間には違った局在化機構が存在することを解明し (*J Biol. Chem.* 288: 8092-100, 2013)、DOCK1 及び DOCK5 の分子機能を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

マクロピノサイトーシスはチロシンリン酸化受容体の下流において、低分子量 G タンパク質 Rac の活性化を介して細胞骨格が再構成されることでその形態機能を果たすことが知られている(*Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 639-649, 2008)。しかしながら、マクロピノサイトーシスによる Native LDL 取り込み経路とその泡沫細胞化の詳細なシグナル伝達経路は未だ不明な点も多く、病態医学的にもそれらの包括的な理解が必要であるにも関わらず、解析が進んでいない点も多い。

従来より、Rac の下流で働く Dorsal ruffle とマクロピノサイトーシスの形成機構は似ていると考えられており(*Nat Rev Cell Biol* 5: 647-657, 2004)、我々は DOCK1 欠損及び CDM ファミリー分子がマクロファージ上でのマクロピノサイトーシスに影響する可能性を考えた。

そこで、マクロファージ上で Triple knockout となる TKO(LysMcre DOCK1^{lox/lox} DOCK2^{-/-} DOCK5^{-/-})マウスを作出し、そのマウスより骨髄マクロファージを分化させ、その機能を野生型と比較検討を行うこととした。

3. 研究の方法

DOCK1/2/5 が関与するマクロピノサイトーシスによる取り込み能の比較評価

・野生型と TKO マクロファージにおいて、M-CSF もしくは PMA 刺激の下、dextran-FITC 及び Native LDL の細胞取り込み量の差異が無いか刺激濃度およびタイムコースを比較しながら検討を行う。具体的には Timelapse 顕微鏡を用いて観察し、取り込み量を定量する。

マクロピノサイトーシス形成時における DOCK1/2/5—Rac シグナルの制御機構の解析

・DOCK1/2/5 阻害剤である CPYPP を用い

て、マクロピノサイトーシスを介しての取り込み能がそれらのシグナル経路に与しているかを定量する。

In vitro における泡沫細胞形成能の解析

・TKO マクロファージではスカベンジャー受容体下流の機能は変化しないことを確かめるため、蛍光ラベルした Ac LDL と OxLDL の取り込み能を蛍光顕微鏡観察下で評価する。

・野生型及び TKO マウスよりマクロファージを分化培養し、その細胞に Native LDL を高濃度 (250-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で培養した後、Oil RedO 染色を行い、その脂肪滴を観察評価する。

・Oil RedO を用いて、脂肪滴取り込み量を実体顕微鏡下で撮影し、その定量解析を行う。

ApoE^{-/-} TKO マウスの病態評価解析

・ApoE^{-/-}TKO マウスを作製し、ApoE^{-/-}単独マウスとのアテローム形成の比較評価を行う。具体的にはマウスに高脂肪食で飼育し、大動脈胸に形成される粥状のプラーク形成を観察する。ApoE^{-/-}TKO マウスだとアテローム形成面積の低下を観察する。Oil RedO にて染色し、その面積を画像定量化し、プラーク形成面積を測定する。また、大動脈の HE 切片を作製観察し、Oil RedO ポジティブ面積を比較検討する。

・高脂肪食下で ApoE^{-/-}野生型及び TKO を飼育し、体重測定、マクロファージ上の細胞膜コレステロール量及び血中の中性脂肪量の測定を評価する。

4. 研究成果

1) 野生型と TKO マクロファージにおいて、M-CSF 刺激の下、dextran-FITC 及び DiI-Native LDL の細胞取り込み量の差異が無いか検討を行ったところ、TKO において顕著に取り込みが減少した。

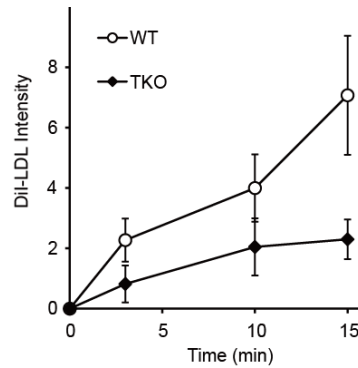


図 M-CSF 刺激下において、TKO マクロファージは DiI-Native LDL 取り込み能が低下する。

2) DOCK1/2/5 阻害剤である CPYPP を用いて、マクロファージにおける取り込み能がそれらのシグナル経路に与しているかを検討したところ、dextran-FITC 及び Native LDL の細胞取り込み量の差異が無いか検討を行ったところ、TKO において顕著に取り込みが減少した。

3) 野生型及び TKO マウスよりマクロファージを分化培養し、その細胞に Human Native LDL を高濃度 (250-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で培養した後、Oil RedO 染色を行い、その脂肪滴の観察定量を行った。しかしながら、Oil RedO 染色面積において、野生型と TKO マウスにおいて顕著な差を得ることは出来なかった。

さらなる適切な実験条件の検討が必要であると考えたが、Human native LDL が高価であることと、実験に必要な Native LDL が高濃度 (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で使用しなくてはいけないこと、Native LDL の保存もきかないことより、研究室内で Native LDL を常に調製できるようにセットアップすることが次の検討課題であると考えた。

4) ApoE^{-/-}TKO マウスを作製し、ApoE^{-/-}単独マウスとのアテローム形成の比較評価を行うことを目的としたが、ApoE^{-/-}TKO は 5 つの遺伝子組み換えを行うため、マウスの作出までに多大な時間を費やすので、まずは ApoE^{-/-}を含む Single Knockout マウスで比較検討を行った。高コレステロール食を長期投与 (17 週) した後、大動脈に形成された粥状プラーク形成 (Oil RedO 染色) を観察した。その結果、ApoE^{-/-}, ApoE^{-/-}

LysMcre D1^{lox/lox}, ApoE^{-/-}D2^{-/-}, ApoE^{-/-}D5^{-/-}間において、プラーク形成度及び血中における Triglyceride 量を測定したが、有意な差は見られなかった。

現在、ApoE^{-/-}TKO を得ることが出来たため、ApoE^{-/-}TKO における高コレステロール食の長期投与(17週)を行っておりその解析を予定している。

今回の研究により、Rac 活性化分子 DOCK1/2/5 はマクロピノサイトーシスを介して LDL 取り込み機能を担うことを *in vitro* の実験より見出した。このことは、マクロファージの泡沫細胞化過程において、顕著な影響をあたえることが考えられる。

今後の展望として、*in vivo*での DOCK1/2/5 の欠損が動脈硬化の病態進展にどのように影響を及ぼしているのかを様々な角度より解析すべきだと考えている。しかしながら、LDL 取り込み経路として、マクロピノサイトーシス経路は別のスカベンジャー経路が有る以上、マクロピノサイトーシス経路を阻害できたとしても動脈硬化病変の著しい減退は観察しづらい可能性も考えられる。個体レベルにおいて、顕著な差を見出すことが難しい場合は DOCK1/2/5 がどのようなシグナル経路を介してマクロピノサイトーシス機構に関与しているのか、DOCK1/2/5 と相互作用する分子は何か、DOCK1/2/5 のどの機能ドメインが関わっているのか等、さらなる *in vitro*の実験を追加していく考えである。

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 3 件)

1. Yanagihara T, Sanematsu F, Sato T, Uruno T, Duan X, Tomino T, Harada Y, Watanabe M, Wang Y, Tanaka Y, Nakanishi Y, Suyama M, Yoshinori F. Intronic regulation of Aire expression by Jmjd6 for self-tolerance induction in the thymus.

Nat Commun. 6:8820, 2015. 査読有り

2. Watanabe M, Terasawa M, Miyano K, Yanagihara T, Uruno T, Sanematsu F, Nishikimi A, Côté JF, Sumimoto H, Fukui Y. DOCK2 and DOCK5 Act Additively in Neutrophils To Regulate Chemotaxis, Superoxide Production, and Extracellular Trap Formation.

J Immunol. 193(11): 5660-7, 2014. 査読有り

3. Ogawa K, Tanaka Y, Uruno T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Côté JF, Fukui Y. DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links FcεRI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation.

J Exp Med. 211(7): 1407-19, 2014. 査読有り

〔学会発表〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

實松 史幸 (SANEMATSU FUMIYUKI)

宮崎大学 医学部 助教

研究者番号：80381094