

## Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

## 研究成果報告書(最終) &lt;概要&gt;

所 属	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 循環器内科学分野
氏 名	福田 大受
研究テーマ	マクロファージ TLR9 シグナルを介した動脈硬化とインスリン抵抗性発現機序の解明

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

## &lt;研究目的&gt;

マクロファージを中心とした慢性炎症が、動脈硬化とインスリン抵抗性の発症に重要な病態として関与している。しかしながら、血管壁と脂肪組織において、慢性炎症を惹起するメカニズムについては、共通する分子メカニズムの有無を含めて十分に明らかになっていない。

Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR)のひとつ TLR9 は、外来微生物由来の DNA だけでなく、自己由来の遊離 DNA 断片 (cell free DNA, cfDNA) をリガンドとして認識し、種々の慢性炎症性疾患の病態に関与する。近年、動脈硬化病変において血管内皮細胞や血管平滑筋細胞が、さらに、肥満の進行に伴い脂肪組織内で脂肪細胞が、アポトーシスや細胞死を起こしていることが明らかになってきた。そこで我々は、これらの過程で放出される cfDNA が TLR9 の内因性リガンドとなり、血管壁や脂肪組織においてマクロファージを活性化させることで、慢性炎症を惹起し、動脈硬化やインスリン抵抗性を引き起こすという仮説を着想した。

## &lt;研究手法と結果&gt;

## 1. 動脈硬化の誘導と肥満の誘導で組織内 TLR9 の発現は増加し、血中 cfDNA も増加する。

アンジオテンシン II (Ang II) 投与により動脈硬化を誘導した apolipoprotein E (ApoE) 欠損 (KO) マウスや、高脂肪食負荷にて肥満を誘導した野生型 (WT) マウスでは、それぞれのコントロール群に比べて、動脈硬化巣や肥満脂肪組織内での TLR9 の発現が増加するだけでなく、TLR9 の内因性リガンドとなりうる血中 cfDNA が有意に増加していた。さらにヒト臨床検体を用いた検討においても、血中 cfDNA は肥満やインスリン抵抗性の指標と有意な正の相関を認めた。

## 2. TLR9 活性化は動脈硬化病変の形成を促進する。

ApoE KO マウスと ApoE/TLR9 2重欠損 (dKO) マウスに Ang II を投与して動脈硬化病変の形成程度を比較した。血中脂質レベルや血圧には差を認めなかったが、ApoE/TLR9 dKO マウスで、病変形成やプラーク内へのマクロファージ浸潤、大動脈での炎症性物質の発現が有意に低下していた。

## 3. TLR9 活性化はインスリン抵抗性の発現を促進する。

WT マウスと TLR9 KO マウスに高脂肪食を与えて肥満を誘導した際に生じるインスリン抵抗性は、TLR9 KO マウスで軽度であった。内臓脂肪組織におけるマクロファージの浸潤や炎症性物質の発現は、有意に TLR9 KO マウスで少なかった。脂肪組織において、主にマクロファージが TLR9 を発現することから、骨髄移植を行い、骨髄特異的 TLR9 欠損マウスと骨髄特異的 TLR9 発現マウスを作製し、高脂肪食負荷を行った。全身の TLR9 の発現にかかわらず、骨髄における TLR9 が欠損したマウスでは、コントロールマウスと比較してインスリン抵抗性の発現が軽度であった。さらに、TLR9 の阻害性オリゴヌクレオチドを肥満誘導した WT マウスに投与したところ、インスリン抵抗性の発現が抑制された。

## 4. 障害を受けた血管内皮細胞や脂肪細胞は TLR9 を介してマクロファージを活性化させる。

WT マクロファージと TLR9 KO マクロファージを用いた in vitro 実験を行った。Ang II で刺激された血管内皮細胞や、TNF- $\alpha$  で刺激された脂肪細胞から得られる培養上清や培養上清中の cfDNA は、TLR9 を介してマクロファージからの炎症性物質の産生を促進することが明らかになった。

## &lt;研究成果&gt;

今回の研究結果は、cfDNA-TLR9 シグナルが、少なくとも部分的にマクロファージを活性化することで、動脈硬化やインスリン抵抗性の発症に関与することを示唆している。さらに、cfDNA-TLR9 シグナルは、これらの病態群に対する新たな治療対象やバイオマーカーとなる可能性も示唆された。

## Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

## 研究成果報告書(最終) &lt;発表実績/予定一覧&gt;

所 属	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 循環器内科学分野
氏 名	福田 大受

1. 論文発表実績	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。</li> <li>掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。</li> <li>国内外雑誌を問わない。</li> <li>印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。</li> <li>欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>
1	Hara T, <u>Fukuda D</u> , Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. <i>Atherosclerosis</i> . 2015;242:639-646.
2	Bando S, <u>Fukuda D</u> , Soeki T, Nishimoto S, Uematsu E, Matsuura T, Ise T, Tobiume T, Yamaguchi K, Yagi S, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M and Sata M. Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. <i>Atherosclerosis</i> . 2015;242:407-414.
3	Salim HM, <u>Fukuda D</u> , Higashikuni Y, Kimie Tanaka K, Yoichiro Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M Sata M. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, ameliorates endothelial dysfunction and atherogenesis in normoglycemic apolipoprotein-E deficient mice. <i>Vascular Pharmacology</i> . 2015 in press.
4	Bando M, Yamada H, Kusunose K, <u>Fukuda D</u> , Amano R, Tamai R, Torii Y, Hirata Y, Nishio S, Satomi J, Nagahiro S, Sata M. <i>JACC Cardiovasc Imaging</i> . 2015 in press.
5	Ishida M, Shimabukuro M, Yagi S, Nishimoto S, Kozuka C, <u>Fukuda D</u> , Soeki T, Masuzaki H, Tsutsui M, Sata M. MicroRNA-378 Regulates Adiponectin Expression in Adipose Tissue: A New Plausible Mechanism. <i>PLoS One</i> . 2014;9: e111537.
6	Matsumoto S, Shimabukuro M, <u>Fukuda D</u> , Soeki T, Yamakawa K, Masuzaki H, Sata M. Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, restores endothelial function by reducing vascular inflammation and by increasing the phosphorylation ratio Ser(1177)/Thr(497) of endothelial nitric oxide synthase in diabetic mice. <i>Cardiovasc Diabetol</i> . 2014;13:30.
7	Soeki T, Yamaguchi K, Niki T, Uematsu E, Bando S, Matsuura T, Ise T, Kusunose K, Hotchi J, Tobiume T, Yagi S, <u>Fukuda D</u> , Taketani Y, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Plasma MicroRNA-100 Is Associated With Coronary Plaque Vulnerability. <i>Circ J</i> . 2015;79(2):413-438.
8	Takashima A, Shimabukuro M, Tabata M, <u>Fukuda D</u> , Uematsu E, Ishibashi-Ueda H, Takanashi S, Sata M. Histopathological heterogeneity of in-stent restenosis in four coronary endarterectomy specimens. <i>Cardiovasc Pathol</i> . 2015; 24:194-197.
9	Yagi S, Aihara KI, <u>Fukuda D</u> , Takashima A, Hara T, Hotchi J, Ise T, Yamaguchi K, Tobiume T, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Akaike M, Sata M. Effects of Docosahexaenoic Acid on the Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease. <i>J Atheroscler Thromb</i> . 2015;22(5):447-454.
10	Yagi S, Hara T, Ueno R, Aihara KI, <u>Fukuda D</u> , Takashima A, Hotchi J, Ise T, Yamaguchi K, Tobiume T, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Akaike M, Sata M. Serum concentration of eicosapentaenoic acid is associated with cognitive function in patients with coronary artery disease. <i>Nutr J</i> . 2014;13:112.
11	Hirata Y, Kurobe H, Higashida M, <u>Fukuda D</u> , Shimabukuro M, Tanaka K, Higashikuni Y, Kitagawa T, Sata M. HMGB1 plays a critical role in vascular inflammation and lesion formation via toll-like receptor 9. <i>Atherosclerosis</i> . 2013;231:227-233.

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2015年8月	Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. The activation of toll-like receptor 9 deteriorates blood flow recovery after hind-limb ischemia. ESC Congress 2015, London, England
2	2015年8月	Hashimoto R, Shimabukuro M, Salim H.M, Hara T, Fukuda D, Yagi S, Soeki T, Sata M. Antagonism of protease-activated receptor 2 (PAR-2) rescues vascular endothelial dysfunction in diabetic mice. ESC Congress 2015, London, England
	2015年4月	Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Inhibition of Activated Factor X Attenuates Neointima Formation after Wire-Mediated Vascular Injury. 第79回日本循環器学会学術集会(大阪)
	2015年4月	Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata S. Inhibition of Activated Factor X Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis in ApoE-deficient Mice. 第79回日本循環器学会学術集会(大阪)
	2015年4月	Shimabukuro M, Fukuda D, Sato H, Nishimoto S, Hara T, Takashima A, Hirata Y, Kurobe H, Yagi S, Soeki T, Izaki H, Sakaue H, Kitagawa T, Kanayama H, Sata M. Depot- and Gender-Specific Regulation of the Innate Immune System in Adipose Tissues: A Study from Human Biopsy Samples. 第79回日本循環器学会学術集会(大阪)
	2015年4月	Soeki T, Matsuura T, Bando S, Tobiume T, Hara T, Takashima A, Bando M, Yamazaki H, Saito Y, Ise T, Kusunose K, Yamaguchi K, Yagi S, Fukuda D, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Antiarrhythmic and Antiapoptotic Effects of C-type Natriuretic Peptide in Rats with Myocardial Ischemia/Reperfusion. 第79回日本循環器学会学術集会(大阪)
	2015年2月	福田大受、原知也、島袋充生、佐田政隆： 活性型血液凝固第X因子が血管の炎症と動脈硬化に与える影響 第44回日本心臓血管作動物質学会 シンポジウム(高松)
	2015年2月	原知也、福田大受、田中君江、東邦康智、平田陽一郎、八木秀介、山田博胤、添木武、若槻哲三、島袋充生、佐田政隆： 活性型第X凝固因子によるマクロファージ活性化を介した新しい動脈硬化進展機序の検討 第44回日本心臓血管作動物質学会(高松)
3	2014年11月	Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. Genetic Deletion of Toll-like Receptor 9 Accelerates Blood Flow Recovery after Hindlimb Ischemia. AHA Scientific Sessions 2014, Chicago, U.S.A
4	2014年11月	Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Rivaroxaban, a Direct Factor Xa Inhibitor, Attenuates Neointima Formation after Mechanical Vascular Injury. AHA Scientific Sessions 2014, Chicago, U.S.A
5	2014年8月	Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Rivaroxaban, a direct factor Xa inhibitor, attenuates plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice by inhibiting macrophage activation. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain
6	2014年8月	Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Rivaroxaban, a direct factor Xa inhibitor, attenuates neointima formation following vascular injury in the mouse through the inhibition of proliferative activation of vascular smooth muscle cells. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain
7	2014年8月	Bando S, Fukuda D, Soeki T, Uematsu E, Shimabukuro M, Sata M. Relationship between NLRP3 inflammasome activation in adipose tissue and atherosclerosis. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain
8	2014年8月	Takashima A, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Combined administration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduces atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain

9	2014年8月	Shimabukuro M, Matsumoto S, Fukuda D, Hara T, Soeki T, Sata M. Antagonism of protease-activated receptors salvages vascular endothelial dysfunction in KK-Ay diabetic mice: a novel mechanism of rivaroxaban, an oral factor Xa inhibitor. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain
10	2014年8月	Bando S, Soeki T, Tobiume T, Matsuura T, Uematsu E, Fukuda D, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Atrial late potentials and atrial substrate remodeling in patients with atrial fibrillation. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain
11	2014年8月	Soeki T, Uematsu E, Bando S, Matsuura T, Tobiume T, Fukuda D, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Relationship between local production of microRNA-328 and atrial substrate remodeling in atrial fibrillation. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain
12	2014年8月	Matsuura T, Soeki T, Uematsu E, Bando S, Tobiume T, Fukuda D, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. A renin inhibitor prevents atrial endocardial dysfunction in rapidly paced rats with streptozotocin-induced diabetes. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain
13	2014年8月	Shimabukuro M, Ishida M, Yagi S, Fukuda D, Soeki T, Sata M. Post-transcriptional regulation of adiponectin by microRNA-378 in adipose tissue: a novel mechanism for hypoadiponectinemia. ESC Congress 2014, Barcelona, Spain
14	2014年6月	Shimabukuro M, Okawa C, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Yamada H, Kurobe H, Fukuda D, Takao S, Sato M, Sata M. Effects of oxidized cholesterol components in epicardial fat and atherosclerotic lesions in obese pigs fed high-fat diet: a gas chromatography-mass spectrometry analysis. EAS Congress 2014, Madrid, Spain
15	2014年3月	Bando S, Soeki T, Hara T, Takashima A, Bando M, Ogasawara K, Saito Y, Matsuura T, Hotchi J, Kimura E, Ise T, Tobiume T, Yamaguchi K, Yagi S, Iwase T, Fukuda D, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Kangawa K, Sata M. Ghrelin Ameliorates the Progression of Experimental Autoimmune Myocarditis. 第78回日本循環器学会学術集会(東京)
16	2014年3月	Ishida M, Shimabukuro M, Yagi S, Fukuda D, Soeki T, Sata M. Post-transcriptional Regulation of Adiponectin by microRNA 378 in White Adipose Tissue: A Novel Mechanism. 第78回日本循環器学会学術集会(東京)
17	2014年3月	Bando S, Soeki T, Matsuura T, Tobiume T, Hara T, Takashima A, Bando M, Ogasawara K, Saito Y, Hotchi J, Kimura E, Ise T, Yamaguchi K, Yagi S, Iwase T, Fukuda D, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Atrial Late Potentials and Atrial Substrate Remodeling in Patients with Atrial Fibrillation. 第78回日本循環器学会学術集会(東京)
18	2014年3月	Matsumoto S, Shimabukuro M, Fukuda D, Hara T, Soeki T, Sata M. Antagonism of Protease-activated Receptors Rescues Vascular Endothelial Function in KK-Ay Mice: A Novel Mechanism of Rivaroxaban, a Factor Xa Inhibitor. 第78回日本循環器学会学術集会(東京)
19	2014年3月	Ishida M, Shimabukuro M, Yagi S, Fukuda D, Soeki T, Sata M. Post-transcriptional Regulation of Endothelial NADPH Oxidase 4 (NOX4) by miR-100: A Human Biopsy Study in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue. 第78回日本循環器学会学術集会(東京)

### 3. 投稿、発表予定

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2015年11月 発表予定	Sachiko Nishimoto, Daiju Fukuda, Yasutomi Higashikuni, Kimie Tanaka, Yoichiro Hirata, Shusuke Yagi, Takeshi Soeki, Hiroshi Sakaue, Michio Shimabukuro, Masataka Sata. Toll-like receptor 9 plays a pivotal role in angiotensin II-induced atherosclerosis. AHA Scientific Sessions 2015, Orlando, U.S.A
2	2015年11月 発表予定	Tomoya Hara, Daiju Fukuda, Kimie Tanaka, Yasutomi Higashikuni, Yoichiro Hirata, Shusuke Yagi, Hirotsugu Yamada, Takeshi Soeki, Tetsuzo Wakatsuki, Michio Shimabukuro, Masataka Sata. Hematopoietic Protease-Activated Receptor-2 Plays a Critical Role in Vascular Inflammation and Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. AHA Scientific Sessions 2015, Orlando, U.S.A
3	2015年11月 発表予定	Hotimah Masdan Salim, Daiju Fukuda, Yasutomi Higashikuni, Kimie Tanaka, Yoichiro Hirata, Shusuke Yagi, Takeshi Soeki, Michio Shimabukuro, Masataka Sata. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, ameliorates endothelial dysfunction and atherogenesis in apolipoprotein-E deficient mice through GLP-1 dependent and independent manners. AHA Scientific Sessions 2015, Orlando, U.S.A
4	2015年11月 発表予定	Akira Takashima, Daiju Fukuda, Kimie Tanaka, Yasutomi Higashikuni, Yoichiro Hirata, Hirotsugu Yamada, Takeshi Soeki, Tetsuzo Wakatsuki, Michio Shimabukuro, Masataka Sata. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit Inflammatory Responses in Macrophages by the Reduction of Toll-like Receptor 4 Expression in Lipid Rafts, Leading to the Suppression of Atherogenesis in Apolipoprotein E Deficient Mice. AHA Scientific Sessions 2015, Orlando, U.S.A
	2015年9月 投稿 (現在査読中)	Sachiko Nishimoto, Daiju Fukuda, Yasutomi Higashikuni, Kimie Tanaka, Yoichiro Hirata, Chie Murata, Joo-ri Kim-Kaneyama, Fukiko Sato, Masahiro Bando, Tetsuya Hayashi, Issei Imoto, Hiroshi Sakaue, Michio Shimabukuro, Masataka Sata. Obesity-induced DNA release from adipocytes provokes chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. Science Advances