

研究助成 2016—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

所 属	国立大学法人 東京医科歯科大学 循環制御内科学
氏 名	小西正則
研究テーマ	好中球の新規シグナル機構による動脈硬化発症メカニズムの解明

- ・ 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)

本研究では、好中球細胞外トラップ(Neutrophil Extracellular Traps: NETs)によるマクロファージのオートファジー制御が、動脈硬化症の発症および病状進展機序に重要な働きを担っていることを明らかにするため、細胞実験および動物実験を行った。

細胞実験では、NETsによるマクロファージにおけるオートファジー活性に対する影響を解析するため、ヒト細胞株を入手し実験に用いた。ヒトHL-60細胞にAll-trans retinoic acid (ATRA)を投与し好中球様細胞に分化させ、その後にコレステロールを投与し NETsを誘導した。NETsの解析のため、走査型電子顕微鏡での形態学的評価と、免疫染色法および細胞溶解液のウエスタンブロットティングでのシトルリン化ヒストンと酵素類(Neutrophil elastase, Myeloperoxidase等)の評価を行い、ヒストン修飾酵素 Peptidylarginine deiminase (PAD) 4 の非特異的阻害剤であるCl-amidine投与後に、好中球からのNETs誘導が阻害されることを見出した。さらに、ヒトTHP-1細胞を培養し、Paramethoxyamphetamine (PMA)を投与しマクロファージ様細胞に分化させ、NETsとの共培養を行った。マクロファージ溶解液のウエスタンブロットティングでのMicrotubule-associated protein light chain 3(LC3) IIの発現量を定量し、コレステロールの濃度依存性にオートファジーが活性化されることを確認した。さらに、NETs投与群ではコレステロールによるマクロファージのオートファジーが抑制されていることを見出した。一方で、NETs投与群ではマクロファージのインフラマソームの構成因子であるNucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And Pyrin Domain Containing (NLRP) 3 および活性型Interleukin (IL) 1 β の発現が亢進していた。さらに、マクロファージの受容体を探索し、Toll-like receptor (TLR) 4 をノックダウンしたマクロファージでは、NETsによるインフラマソームの活性化が抑制されることを見出した。

動物実験では、Apolipoprotein E (ApoE) 欠損マウスにおいて 12 週間の高脂肪食負荷による動脈硬化症モデルを作成し、マクロファージにおけるオートファジーならびにインフラマソーム活性を検討した。透過型電子顕微鏡での評価と脂肪染色法・免疫染色法を用いて、動脈硬化巣に好中球と NETs が局在することを確認した。さらに、免疫染色法により、マクロファージのインフラマソーム活性化を確認した。なお、陽性コントロールとしては、自己免疫性心筋炎マウスの心筋炎組織を用いた。動脈硬化巣の組織溶解液を用いたウエスタンブロットティングにて、シトルリン化ヒストン、LC3 II、および NLRP3 発現の亢進を確認した。また、ApoE 欠損マウスにおいて 12 週間の高脂肪食負荷を行い、Cl-amidine、C34 (TLR4 阻害剤)、溶媒 [phosphate buffered saline (PBS)] を高脂肪食負荷開始時から毎週 2 回腹腔内注射投与し、動脈硬化巣の評価を行った。予備実験では症例数が少ないこともあり表現型の有意差は認められなかったが、本実験の際は薬剤投与量・回数の調節を行う予定とした。また、マクロファージ特異的 Autophagy protein (Atg) 5 欠損マウス、好中球特異的 PAD4 欠損マウスを用いた機能解析を行うため、Atg5flox マウス、Lysosome M (LysM) cre マウス、PAD4flox マウス、Myeloid-related protein (MRP) 8 cre マウスを入手し、Atg5flox マウスと LysM cre マウス、および PAD4flox マウスと MRP8 cre マウスを繁殖し、Genotyping を行った。

様式 4-2②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 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。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	なし	
2		
3		
4		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	なし	
2		
3		
4		