

氏名（本籍）	白井 玲美奈（東京都）
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第118号
学位授与の日付	平成31年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	血管炎症および動脈硬化に対するNeopterinの抑制作用
論文審査委員	(主査) 渡部 琢也 教授 山内 淳司 教授 田中 正人 教授 柳 茂 教授

論文内容の要旨

【背景】

世界の死因の第一位は冠動脈の動脈硬化に起因する虚血性心疾患である（世界保健機関 [WHO]、2016 年）。また、本邦においても虚血性心疾患による死亡数が極めて多いのが現状である（厚生労働省 人口動態統計、2016 年）。これまで様々な対症療法が開発・施行されてきたが、本死亡数を減少させるには未だに至っておらず、動脈硬化の早期診断および有効な予防・治療法の開発が強く望まれている。動脈硬化病変は、血管内皮細胞の炎症・単球接着、酸化 Low-Density Lipoprotein (LDL) によるマクロファージの泡沫化、血管平滑筋細胞の遊走・増殖により形成される [Nat Rev Immunol. 2006;6:508–19, Clin Chim Acta. 2013;424:245–52]。

Neopterin は、マクロファージから産生される Guanosine Triphosphate (GTP) の代謝産物で、ヒト大動脈および頸動脈硬化病変において強発現しているが、動脈硬化病変形成との因果関係は明らかでない。故に本研究では、Neopterin の血管炎症および動脈硬化に対する制御作用を検討した。まず、冠動脈疾患 (CAD) 患者における冠動脈病変および血漿中 Neopterin 発現レベルを解析した。また、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC)、ヒト単球由来マクロファージ (HMDM)、ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC) に対する Neopterin の作用を *In Vitro* で、動脈硬化モデルの *Apoe*^{-/-}マウスにおける動脈硬化病変の進展に対する作用を *In Vivo* で検討した。

【方法・結果】

1. Non-CAD・CAD 患者のヒト冠動脈硬化病変と血漿中における Neopterin 発現

Non-CAD 患者と CAD 患者の冠動脈硬化病変の連続切片において Neopterin による免疫染色を行ったところ、Non-CAD 患者では Neopterin はほとんど発現しておらず、CAD 患者では冠動脈の脂肪線条やプラーク内のマクロファージ泡沫細胞の集簇部分に強発現していた (図 A,B)。また、冠動脈硬化病変における Neopterin 発現は冠動脈疾患の重症度に伴って増加していた。更に、Non-CAD 患者 43 例と CAD 患者 92 例において血漿中 Neopterin 濃度を ELISA で測定したところ、Non-CAD 群に比べ CAD 群では血漿中 Neopterin は有意に高値であった (図 C)。

2. HAEC の増殖および炎症・単球接着に対する Neopterin の作用

Neopterin は、HAEC の増殖を有意に抑制した。HAEC において Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) 誘導性の炎症分子に対する mRNA およびタンパク質発現を RT-PCR 並びに Western Blotting で検討した。Neopterin は Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)、Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)、Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) の mRNA 発現を有意に抑制し (図 D)、ICAM-1、VCAM-1、Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) のタンパク質発現/リン酸化を有意に抑制した (図 E)。更に Neopterin は、TNF- α 誘導性の HAEC への単球接着を濃度依存性に有意に抑制した (図 F)。

3. HMDM の炎症性フェノタイプに対する Neopterin の作用

マクロファージは炎症性 (M1) 或いは抗炎症性 (M2) のフェノタイプに分類され、そのバランスが動脈硬化病変形成に関与すると考えられているため、Neopterin の炎症性フェノタイプへの作用を Western Blotting で検討した。Neopterin は初代培養ヒト単球からマクロファージへの分化に影響することなく、抗炎症性の M2 優位に分化誘導した。その際に、NF- κ B のリン酸化抑制および PPAR- γ の発現促進が関与していた (図 G)。

4. HMDM の泡沫化および泡沫化関連タンパク質に対する Neopterin の作用

Neopterin は、HMDM における酸化 LDL による泡沫化を有意に抑制した (図 H)。泡沫化に関連する分子を検討したところ、Neopterin は Cluster of Differentiation 36 (CD36) の発現を抑制し、ATP-Binding Cassette Transporters A1 (ABCA1)、ABCG1 の発現および活性を促進していた。

5. HASMC の遊走・増殖およびそれらに関するシグナルに対する Neopterin の作用

Neopterin は、HASMC において Angiotensin II 誘導性の遊走を有意に抑制し、アポトーシスを誘導することなく HASMC の増殖を有意に抑制した (図 I,J)。これには c-Src/Raf-1/ERK1/2、AKT の発現/リン酸化の抑制を介していた。

6. *ApoE*^{-/-}マウスの大動脈および大動脈弁輪部における動脈硬化病変進展に対する Neopterin の作用

ApoE^{-/-}マウスに、高コレステロール食を負荷し、PBS (コントロール) または Neopterin を 4 週間腹腔内投与した。コントロール群と比較して Neopterin 投与群では血漿中 Neopterin 濃度が有意に増加し、大動脈の動脈硬化病変が有意に減少していた (図 K,L)。また、大動脈弁輪部の動脈硬化病変、単球/マクロファージの浸潤、平滑筋細胞の含有量、血管炎症が有意に抑制されていた。更に、抗 Neopterin 抗体を浸透圧ポンプにより 4 週間持続投与したところ、コントロール群と比較して抗 Neopterin 抗体投与群では大動脈 (図 M,N) および大動脈弁輪部の動脈硬化病変が有意に増加していた。

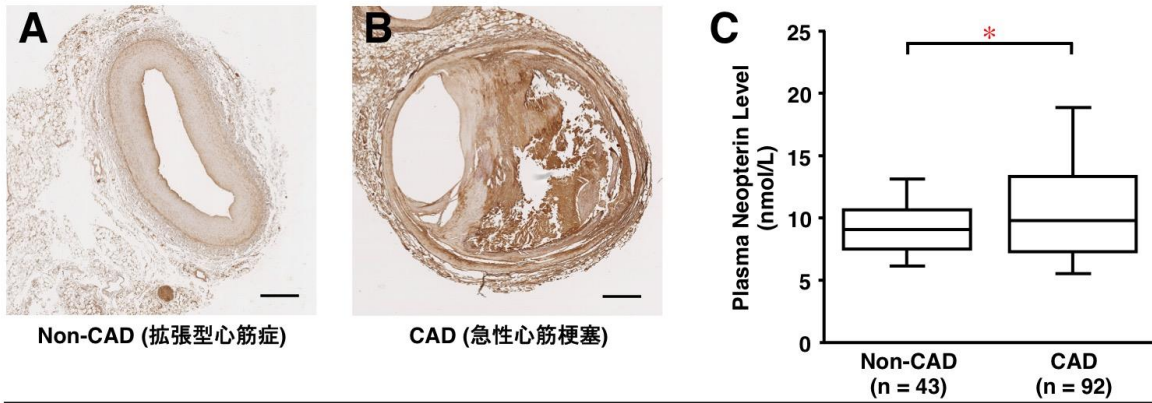
【結論】

本研究において、Neopterin は血管内皮細胞・マクロファージの炎症反応、血管内皮細胞・血管平滑筋細胞の増殖、マクロファージの泡沫化を抑制することで動脈硬化病変進展を抑制することが明らかになった。冠動脈硬化病変での Neopterin 強発現は動脈硬化病変の進展を抑えるために代償的にマクロファージから Neopterin が産生されていたと推察された。Neopterin は血管炎症および動脈硬化を抑制するため、動脈硬化や冠動脈形成術後の再狭窄の予防における新たな治療標的となることが示唆された。

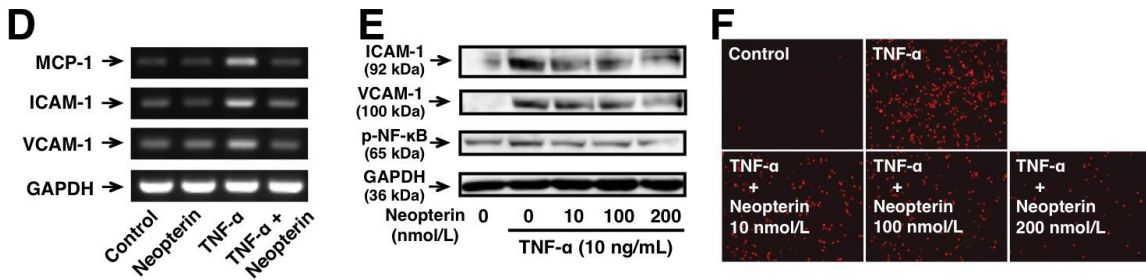
【研究結果の掲載誌】

Shirai R, Sato K, Yamashita T, Yamaguchi M, Okano T, Watanabe-Kominato K, Watanabe R, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Neopterin counters vascular inflammation and atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2018;7:e007359.

ヒト冠動脈硬化病変およびヒト血漿中のNeopterin発現

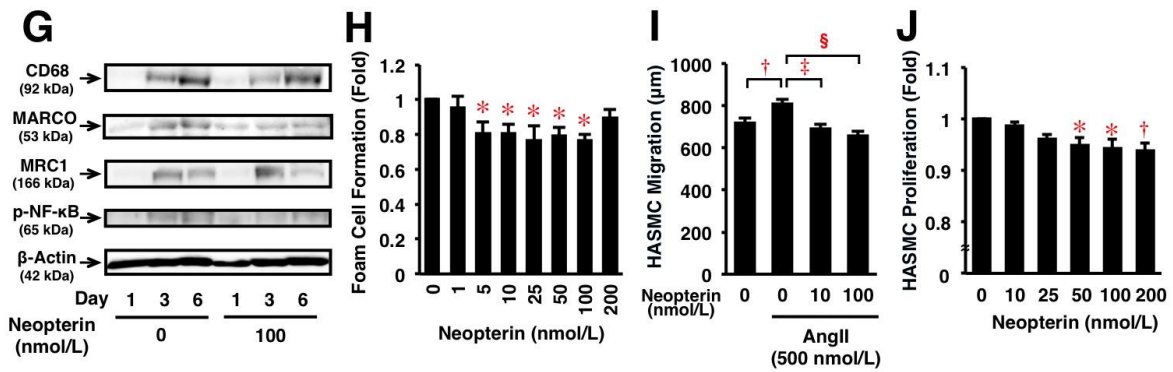


血管内皮細胞の炎症・単球接着

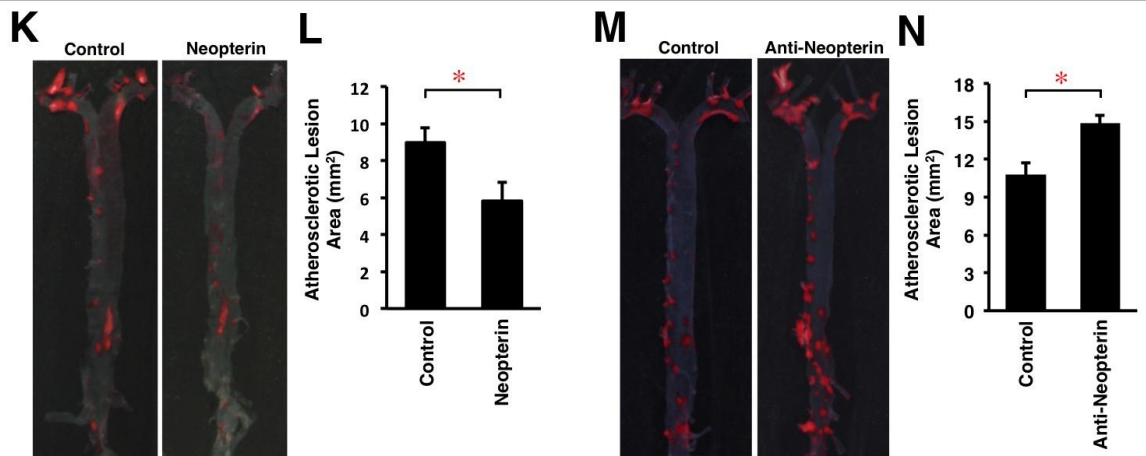


ヒト単球由来マクロファージの炎症性フェノタイプ・泡沫化

血管平滑筋細胞の遊走・増殖



ApoE^{-/-} マウスの大動脈硬化病変



C, H-J, L, N; * $P < 0.05$, † $P < 0.01$, ‡ $P < 0.0005$, § $P < 0.0001$

審査結果の要旨

世界の死因の第1位は、虚血性心疾患(冠動脈疾患[CAD])である(2016年 世界保健機関発表)。その代表が急性心筋梗塞であるが、最新の医療を尽くしても、世界および本邦における主な死因になっている。本疾患は動脈硬化に起因するため、動脈硬化性疾患の有効な予防・治療法の開発が強く望まれている。故に本研究では、かつてない血管細胞の分子を標的にした新たな治療薬を開発するため、炎症の際に生じる GTP 代謝産物である Neopterin の動脈硬化抑制作用を検討した。本研究では、培養ヒト血管細胞(内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ)や動脈硬化モデルの ApoE 欠損マウスを用いた実験、臨床研究に渡る Translational Research を行い、Neopterin の抗動脈硬化作用を世界に先駆けて明らかにした。

CAD 患者の冠動脈病変において、Neopterin は動脈硬化性プラーク内のマクロファージ集簇部に一致して強く発現していた。血漿 Neopterin 濃度は、CAD 患者 92 例では Non-CAD 患者 43 例に比較して有意に高値であった。これは、Neopterin がプラークの進展を防ぐために反応性に増加しているものと推察された。

In vitro の実験では、Neopterin はヒト大動脈内皮細胞における Tumor Necrosis Factor- α 誘発性の炎症マーカー(Monocyte Chemotactic Protein-1 [MCP-1]、Intercellular Adhesion Molecule-1、Vascular Cell Adhesion Molecule-1)の発現、単球-内皮細胞との接着、マクロファージにおける炎症性フェノタイプを有意に抑制した。Neopterin は、ヒト単球由来マクロファージにおいてスカベンジャー受容体 CD36 の発現を抑制し、ATP-Binding Cassette Transporter A1 と G1 による Cholesterol Efflux を促進させ、酸化 LDL による泡沫化を有意に抑制した。Neopterin は、ヒト大動脈平滑筋細胞において c-Src/Raf-1/ERK1/2 を介し遊走・増殖を抑制し、PI3K/Akt を介し Fibronectin の発現を増加させた。

ApoE 欠損マウスに Neopterin を 4 週間投与したところ大動脈の動脈硬化病変が有意に減少し、プラーク内におけるマクロファージや CD8 陽性 T 細胞の浸潤および平滑筋細胞の増殖も抑制され、Pentraxin-3 や MCP-1 の炎症マーカーも抑制された。また、プラークの破裂し易さ(不安定性)を示すプラーク内のマクロファージ/平滑筋細胞の割合も Neopterin 投与により有意に減少していた。逆に、ApoE 欠損マウスに Neopterin 中和抗体を 4 週間投与し内因性の Neopterin を減弱させたところ大動脈の動脈硬化病変は有意に増大した。

以上から、Neopterin は、血管炎症と動脈硬化に対し抑制作用を有していることは明白であるため、CAD 患者において Neopterin が増加しているのは血管炎症や動脈硬化病変が進展するのに抗うためと推察された。Neopterin は、CAD の有無を診断するバイオマーカーになり、動脈硬化治療のターゲットにも成り得ることから今後の医療へ貢献するものと考えられ学術的価値が高く、本研究内容は、*J Am Heart Assoc* 2018;7:e007359 に掲載されている。

申請者は、平成 31 年 2 月 4 日に行った学位審査会での発表や質疑応答で十分な見識を示し、研究者としての基本的な資質も十分であると判断された。よって、東京薬科大学大学院生命科学研究科博士後期課程の学位審査の基準を十分満たしており学位に値すると判断した。