

平成 31 年 4 月 26 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年

受付番号 675

氏 名 香月 俊輔

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）ボストン（アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
静脈グラフト病変進展における PARP9/PARP14 によるマクロファージ形質制御
3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 25 日（724 日間）

4. 受入機関名及び部局名

ハーバード医科大学ブリガムアンドウィメンズ病院 相川真範

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入**

も可）

（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）

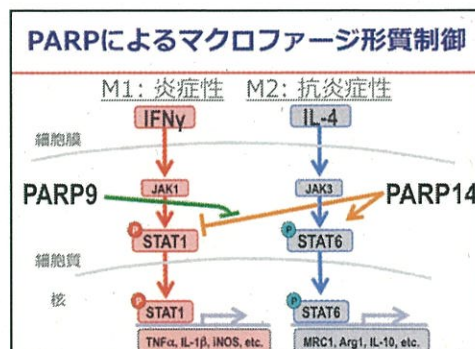
（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

1. 研究開始当初の背景

末梢動脈疾患患者は全世界で 2 億人以上と報告されている。重症虚血肢に頻用される静脈グラフトの 1 年以内の閉塞あるいは狭窄率は 40~50%にもものぼる。静脈グラフト不全に対する有効な薬物治療は存在せず、侵襲的かつ高額な再灌流療法の適応となり、最重症例では下肢切断に至ることから新規治療法の研究開発は急務である。術後 1 ヶ月以内の静脈グラフトの急性閉塞は、血管傷害や吻合不全などの単なる技術的な問題に起因する可能性があるが、それ以降の壁肥厚は、病変進展に伴い動脈硬化様の病変を呈する。しかしながら、静脈グラフト病変の進展においては、動脈硬化病変の炎症の首座であるマクロファージの役割を含む多くのことが未だ明らかではない。申請者の留学先であるハーバード大学ブリガムアンドウィメンズ病院相川眞範博士の研究室はマクロファージ活性化において Dll4-Notch 経路が重要な役割を果たすことを明らかにし (Fung et al, Circulation 2007)、さらにマクロファージの Dll4-Notch 経路を介する炎症が動脈硬化、静脈グラフト不全、代謝障害を促進することを世界に先駆けて報告した (Fukuda et al, PNAS 2012, Koga et al, ATVB 2015)。

一方、マクロファージにはいくつかの形質があることが提唱され、その多様性が注目されている。代表的なものが、炎症性の“M1”と非/抗炎症性の“M2”であり、昨今“M1”と“M2”のふたつの極性」だけで炎症の機序の全容を解明することは難しいと一般的にも理解されているが、組織内でのバランス (例えば“M1”>“M2”) が血管病の進展に寄与する可能性がある。よってマクロファージ形質制御の機序の解明は、マクロファージ活性化による組織の炎症の抑制を可能とし、静脈グラフト不全の治療法の開発に繋がると考えられる。

相川研究室では、最先端のプロテオミクスを駆使し、未知の制御因子を網羅的に探索した。IFN γ 刺激は STAT1 のリン酸化を介して“M1”形質に、IL-4 刺激は STAT6 のリン酸化を介して“M2”形質に誘導する。同研究室は IFN γ あるいは IL-4 刺激により形質誘導させた“M1”あるいは“M2”マクロファージ培養細胞のプロテオームのフィルタリングおよびクラスタリング解析を行い、マクロファージ形質の新たな制御因子としてポリ (ADP リボース) ポリメラーゼ (PARP) 9 と PARP14 を見出した。PARP は NAD を基質として PARP 自身やヒストンなどの標的蛋白質に ADP リボースを連鎖付加 (ADP リボシル化) する酵素であり、これまで PARP によるマクロファージ活性化制御についての報告は無い。ヒト初代培養細胞において、siPARP9 は IFN γ による M1 マーカー遺伝子の発現、STAT1 のリン酸化を抑制し、逆に siPARP14 はこれらを亢進させた。一方、siPARP14 は IL-4 による M2 マーカー遺伝子の発現、STAT6 のリン酸化を抑制した。PARP9 は触媒活性を有さず、STAT1 および STAT6 を ADP リボシル化しないことが報告されているため、申請者は『PARP14 が STAT1 の ADP リボシル化を介してそのリン酸化を抑制、STAT6 の ADP リボシル化を介してそのリン酸化を促進することにより抗炎症性分子として作用し、PARP9 が、この PARP14 による STAT1 の ADP リボシル化に拮抗して、間接的に炎症性分子として作用する』という仮説を立案した (右図)。



2. 研究開始当初の目的

プロテオミクスにより見出された PARP9 と PARP14 のマクロファージの形質制御、さらには静脈グラフト不全における役割を解明し、静脈グラフト不全の革新的治療法の実現のための基盤研究を推進することを本研究課題の目的とした。

具体的に研究当初は以下の 4 つを目的とし、派遣期間中に 1) ~ 3) を行なった。

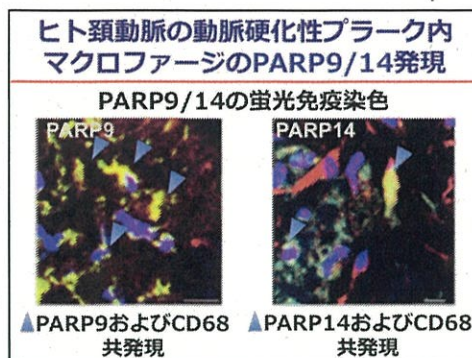
- 1) プロテオミクスによる PARP9/14 による STAT リン酸化制御機構の検証
- 2) 多様な形質を有するマクロファージの活性化における PARP9/14 の役割の検証
- 3) マクロファージ選択的 siPARP9、siPARP14 封入脂質ナノ粒子の作製
- 4) PARP9/14 によるマクロファージの形質制御による静脈グラフト不全予防効果の検証

3. 研究の方法および研究成果

1) プロテオミクスによる PARP9/14 による STAT リン酸化制御機構の検証

現在相川研究室では高感度液体クロマトグラフトンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた ADP リボシル化の解析を行っている。STAT1 α は STAT1 の isoform であり IFN γ によ

リン酸化される。まずこの STAT1 α における、PARP14 による ADP リボシル化標的部位が同定された。質量分析の結果、STAT1 α のリン酸化部位 (Tyr701) 近隣のグルタミン酸残基 (Glu657 および Glu705) が PARP14 によってモノ ADP リボシル化を受けていた。さらにこの結果を検証するため、STAT1 α 上の PARP14 による ADP リボシル化標的部位であるグルタミン酸残基のグルタミン残基への変異 (E657Q および E705Q) を、マウス骨髄由来細胞に導入した。同変異の導入により IFN γ によって誘導される STAT1 α のリン酸化が増強され、向炎症性サイトカインの発現が促進された。最後に、LC-MS/MS を用いて、PARP14 による STAT1 の ADP リボシル化への PARP9 の拮抗作用を検証した。PARP14 によって誘導される STAT1 α の Glu657、Glu705 でのモノ ADP リボシル化は recombinant PARP9 により抑制された。



2) 多様な形質を有するマクロファージの活性化における PARP9/14 の役割の検証

ヒト動脈硬化巣では PARP9/14 を共発現する集団、いずれかを発現する集団、発現のない集団が認められ、病変部におけるマクロファージ形質の不均一性が示された (上図)。

※ 1)、2) の結果は、当研究室の Iwata H らにより Nature Communications 誌に報告された。

3) マクロファージ選択的 siPARP9、siPARP14 封入脂質ナノ粒子の作製

内頸動脈を下大静脈で置換したマウス静脈グラフトモデルにおいて、近年相川研究室が MIT の Daniel Anderson 博士と共同開発した脂質ナノ粒子を用いて、マクロファージ選択的に siPARP9 あるいは siPARP14 を送達し、静脈グラフト不全が抑制あるいは促進されるかの検証を予定した。脂質ナノ粒子作製の前段階として、siPARP9、siPARP14 について各々設計された 10 種類の siRNA 配列から、封入に適した最もノックダウン効率の高い siRNA 配列を同定した。今後動物実験に向けて siPARP9 および siPARP14 の脂質ナノ粒子の作製を行う。

4. 当該研究からの展開

3. に示すように本研究自体の進捗は当初の予定よりやや遅れたが、以下のような大変興味深い実験結果が得られ、想定を超えた展開を迎えた。

【研究展開の背景】

高用量スタチンによる積極的脂質低下療法下にも脂質コントロールに難渋する家族性高コレステロール血症あるいは心血管イベント発現リスクの高い患者に近年適応となった Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) 阻害薬は、脂質異常症に対する新たな選択肢として大きな注目を集めている。海外特別研究員派遣開始後、平成 29 年米国心臓病学会において、申請者の留学先であるハーバード大学ブリガムアンドウィメンズ病院循環器内科の Marc S Sabatine 博士らより、末梢動脈疾患患者における Fourier Trial のサブ解析の結果が報告された。PCSK9 阻害薬であるエボロクマブは主要な心血管イベントのみならず、下肢虚血、大切断、緊急再血行再建といった急性下肢イベントについても改善した (Bonaca et al, Circulation 2018)。しかしながら、依然として PCSK9 阻害薬の脂質低下作用によらない血管保護効果については明らかではない。

PCSK9 は主に肝臓、腎臓、腸管で産生され、肝細胞の細胞膜上の LDL 受容体をリソソームに誘導、分解することにより、血中 LDL コレステロールレベルを上昇させる。急性冠症候群患者の冠動脈病変を血管内超音波で評価した ATHEROREMO-IVUS 試験では、血中 LDL コレステロールレベルの調整後も、血中 PCSK9 レベルと非責任病変における壊死性コアの割合および量の間に相関関係が認められた (Cheng et al, Atherosclerosis 2016)。肝臓で産生された PCSK9 は血液を介して遠隔臓器に作用することから (Lagace et al, JCI 2006)、血中 PCSK9 は血中 LDL コレステロールレベルとは独立して血管病変の進展に関与する可能性が考えられる。

PCSK9 は前述の臓器のみならず、ヒト動脈硬化巣における血管平滑筋細胞やマウス頸動脈における新生内膜平滑筋細胞のような血管病変部位にも発現が確認されている (Ferri et al, Atherosclerosis 2011)。さらに動脈硬化病変の炎症の首座であるマクロファージにおける内因性あるいは外因性の PCSK9 による向炎症作用を示唆する実験結果が近年続々と報告されている。マクロファージが発現する内因性の PCSK9 に関しては、マクロファージ様細胞に PCSK9 を過剰発現させると NF- κ B 経路を介した酸化 LDL による炎症反応が増強され、

PCSK9 gene silencing により同反応は抑制されることが報告されている。動物モデルにおいても ApoE 欠損マウスのマクロファージにヒト PCSK9 を過剰発現させることにより、脂質レベルとは独立した動脈硬化病変の増悪が示されている (Giunzioni et al, J Pathol 2016)。一方、今年に入り、外因性の PCSK9 により、ヒトおよびマウス初代培養細胞に炎症反応が惹起されることが報告された (Ricci et al, Sci Rep 2018)。彼らの報告においてさらに我々が着目したのは、野生型の骨髄細胞由来マクロファージのみならず、PCSK9 の主たる標的蛋白である LDL 受容体を欠損したマクロファージにおいても recombinant PCSK9 による向炎症作用が認められた点であった。なぜなら、この結果は PCSK9 が既知の標的膜蛋白以外の未だ同定されていない膜蛋白を標的とし、その分解を介して LDL 受容体非依存性の向炎症経路を形成している可能性を示唆しているからである。

そこで我々は研究開始当初の静脈グラフト不全におけるマクロファージ形質制御のコンセプトを踏襲し、『PCSK9 が、LDL 受容体非依存性に、すなわち未知の炎症関連標的膜蛋白分解を介したマクロファージの形質制御により、静脈グラフト病変の進展を促進する』という仮説を立案、検証することにした。

【研究目的】

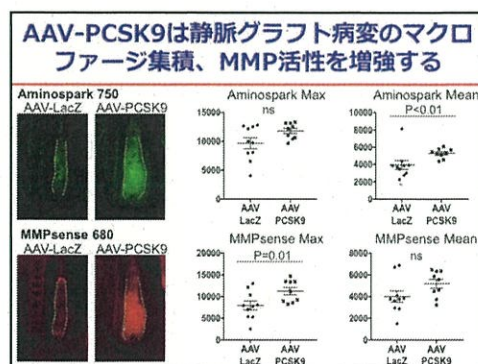
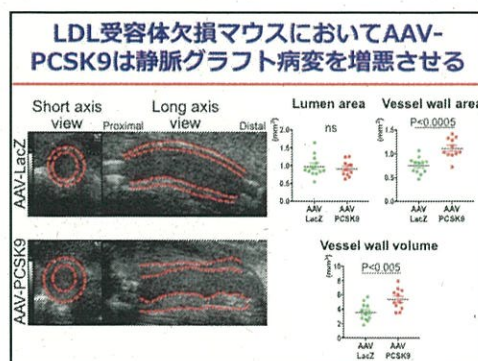
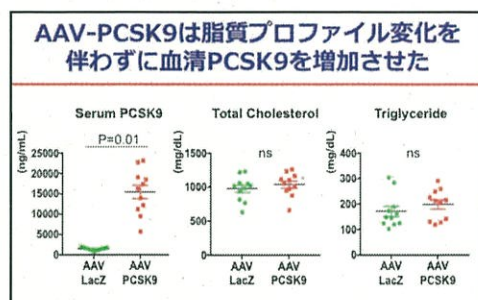
マクロファージ形質制御、静脈グラフト不全における PCSK9 の役割を解明し、PCSK9 阻害薬の静脈グラフト不全に対する治療適応を検討する、さらには PCSK9 の未知の標的膜蛋白を同定し、同蛋白を特異的かつ効率的に抑制する革新的治療法の開発への基盤研究とする。海外特別研究員派遣期間には LDL 受容体非依存性経路による PCSK9 の静脈グラフト病変促進効果を検証した。

【研究方法および成果】

本研究では、LDL 受容体非依存性経路の検証のため、LDL 受容体欠損マウスを使用した。Gain-of-function アプローチとして PCSK9 の gain-of-function form の肝臓での産生を特異的に誘導するアデノ随伴ウイルス (adeno-pAAV/D377Y-mPCSK9, AAV-PCSK9) を使用した。コントロールとしてプラスミドの insert を LacZ に置換した AAV-LacZ を作製した。AAV-PCSK9 は LDL 受容体欠損マウスにおいて脂質プロファイル変化を伴わずに血清 PCSK9 を増加させ (右上段)、このモデルの使用により LDL 受容体分解による脂質増加作用とは独立した機序の検証が可能と考えられた。AAV-PCSK9 を単回尾静脈投与 (1×10^{11} vg) し、1 週間後に採取した F4/80 陽性腹腔内マクロファージでは、IL-1 β 、TNF α 、MCP-1 などの炎症性サイトカインの上昇が認められた。次に内頸動脈を下大静脈で置換したマウス静脈グラフトモデルにおいて、AAV-PCSK9 が静脈グラフト不全を促進するか検証した。AAV は動物モデル作製 1 週間前に単回尾静脈投与を行った。小動物用高精度超音波 (Vevo2100、VisualSonics 社) にて静脈グラフト作製 4 週間後の内膜中膜厚および血管径の変化を非侵襲的に追跡した。AAV-PCSK9 により短軸像での血管壁の面積、および長軸方向の広がりを含む血管壁容積のいずれも有意に増加、病変の増悪を認めた (右中段)。

病変部でのマクロファージ集積および MMP 活性の検出のため、近赤外線プローブ (AminoSPARK 750nm、MMPSense 680nm、Perkin-Elmer 社) を静注し、小動物用高精度生体顕微鏡 (FV1000、Olympus 社) を用いて観察したところ、AAV-PCSK9 は静脈グラフト病変のマクロファージ集積、MMP 活性を増強していた (右下段)。

病理学的解析では、AAV-PCSK9 により静脈グラフトの内膜中膜厚および面積の増加を認めた (次ページ)。炎症を来した静脈グラフト病変には動脈硬化病変同様、マクロファージ



集積の増加、コラーゲンの減少が認められ、進展するとプラーク破綻を来すことさえある (Yazdani et al, JACC Cardiovasc Interv 2012)。生体顕微鏡の結果に一致して AAV-PCSK9 群の静脈グラフトではマクロファージ集積が増加していた。また Picrosirius red 染色では AAV-PCSK9 群の静脈グラフトにおいて thin collagen fiber が増加しており、生体顕微鏡 MMP 活性の増強は collagen remodeling の一つの機序を反映している可能性が考えられた。以上の結果より PCSK9 が静脈グラフト病変を不安定化する可能性が示唆された。

【結論】

今回の結果からマウス静脈グラフト病変において PCSK9 が LDL 受容体分解による脂質増加作用とは独立した機序により静脈グラフト不全に寄与することが明らかとなった。引き続き PCSK9 のマクロファージ形質制御についての研究を継続する。本研究により PCSK9 が未だ有効な薬物治療の存在しない静脈グラフト不全の新規治療標的となる可能性が明らかとなり、また本研究を基盤として今後 PCSK9 の炎症に関連する未知の標的膜蛋白を同定し、同蛋白を特異的かつ効率的に抑制する新たな治療戦略の開発が待たれる。

