77　生活習慣病に伴う慢性炎症の新しい制御法の開発	佐田　政隆

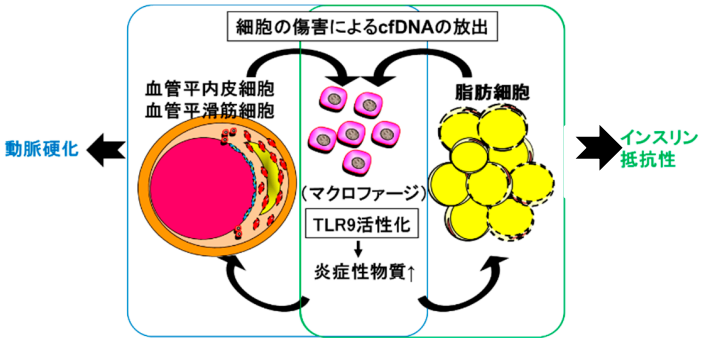
【目的】メタボリックシンドロームや動脈硬化の病態においては、脂肪組織や血管壁における無菌的慢性炎症が大きな役割を担うことが広く知られている。しかし、生活習慣病によってどのようにして慢性炎症が惹起されるのか十分に明らかになっていない。Toll 様受容体-9（*TLR9*）は、本来、外来性の病原体由来の DNA 断片を認識した自然免疫受容体であるが、最近では、自己由来の遊離核酸断片（cell free DNA, cfDNA）を認識して、自己免疫性疾患などの病態に関与していることが報告されている。そこで、生活習慣病によって慢性炎症が生じる機序について、特に cfDNA と TLR9 の果たす役割について検討を行った。

【方法】(1) 野生型マウスならびに、*TLR9* 欠損に高ショ糖高脂肪食を投与して、血中の cfDNA、脂肪組織における炎症、インスリン抵抗性を比較した。また、骨髄移植を行い、慢性炎症に関与した細胞群を同定した。また、オリゴヌクレオチドを用いて、TLR9 をブロックしたことで、肥満による慢性炎症が制御できるかどうかを検討した。(2) *TLR9* 欠損マウスとアポリポ蛋白 E 欠損（*ApoE* KO）マウスを交配して *TLR9*/*ApoE* 二重欠損マウス（*TLR9*/*ApoE* dKO）を作製して、Angiotensin Ⅱ（Ang Ⅱ）持続投与下における動脈硬化病変ならびに慢性炎症を *ApoE* 欠損マウスと比較検討した。また、骨髄移植を行い、動脈硬化、慢性炎症に関与した細胞群を同定した。また、オリゴヌクレオチドを用いて、TLR9 をブロックしたことで、動脈硬化を制御できるかどうかを検討した。

【結果】(1) 肥満に伴って脂肪組織から、cfDNA が放出された。そして、*TLR9* が cfDNA によって活性化され、脂肪組織での慢性炎症ならびにインスリン抵抗性が引き起こした。*TLR9* 欠損マウスでは、脂肪組織での炎症が減弱しており、肥満に伴うインスリン抵抗性が軽減していた。骨髄移植の実験から、骨髄細胞上の *TLR9* が重要であることが明らかになった。*TLR9* の阻害オリゴヌクレオチドは、肥満による脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性を改善した。(2) *ApoE* KO マウスに Ang Ⅱを投与したことで、血漿中の 1 本鎖 DNA などの cfDNA が増加した。また、大動脈において、cfDNA の受容体となりうる TLR9 の発現が Ang Ⅱ投与により有意に増加し、主たる発現細胞はマクロファージであった。*ApoE* KO と *TLR9*/*ApoE* dKO 間で体重、血圧、血漿脂質値に差を認めなかったが、*TLR9*/*ApoE* dKO マウスの動脈硬化病変およびプラーク内脂質量は、*ApoE* KO マウスに比べて有意に少なかった。また、*TLR9*/*ApoE* dKO マウスの腹部大動脈において、MCP-1 などの炎症性物質の発現やマクロファージの浸潤が減少していた。さらに、骨髄移植実験により、血管壁より骨髄の *TLR9* が重要であることが明らかとなった。*TLR9* の阻害オリゴヌクレオチドは、血管での慢性炎症と動脈硬化を抑制した。

以上の結果より、メタボリックシンドロームや動脈硬化における慢性炎症において、cfDNA-*TLR9* 経路は重要な役割を担っており、新たな生活習慣病治療の標的になると考えられた。

cfDNA-TLR9 経路は、マクロファージの活性化を介して、脂肪組織の炎症や動脈硬化病変の形成に関与した



77. 生活習慣病に伴う慢性炎症の新しい制御法の開発

佐田　政隆

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 循環器内科学講座

Key words：生活習慣病，慢性炎症，動脈硬化，メタボリックシンドローム，自然免疫

緒　言

動脈硬化は動脈壁、メタボリックシンドロームは脂肪組織における慢性炎症を基盤にしたという概念が確立している。しかし、生活習慣病によって、動脈壁や脂肪組織に如何に慢性炎症が惹起されるのか不明な点が多い。一方、動脈硬化巣内の細胞がアポトーシスやピロトーシス、ネクローシスといった細胞死を起こしており、動脈硬化の進展に関与したことが示唆されている。また、肥満で大型化した脂肪細胞に細胞死が生じており、cell free DNA（cfDNA）といった遊離核酸断片を放出して、マクロファージを脂肪組織へリクルートして活性化していることを我々は見出した。そこで、本研究では、動脈や脂肪組織において、生活習慣病によって誘導される細胞死と慢性炎症の関連ならびにその分子機序の解明、さらにはそれに基づく治療法の開発を目指す。

方　法

1. 肥満に伴う脂肪組織の慢性炎症とインスリン抵抗性における cfDNA の役割の検討

野生型マウスと TLR9 欠損マウスに、生後 8 週から高脂肪高スクロース食を 12 週間投与した。経口ブドウ糖負荷ならびに腹腔内インスリン負荷を行い、インスリン抵抗性の推移を検討した。20 週齢において、皮下ならびに内臓脂肪組織、血液を採取した。免疫組織学的手法を用いて、脂肪細胞死、マクロファージ浸潤の程度を比較した。また、抗ペリリン染色や TUNEL 染色を行い、脂肪細胞ならびに浸潤した炎症細胞の傷害度とアポトーシスを評価した。さらには、二重鎖 DNA や一重鎖 DNA に対した抗体を用いた免疫電子顕微鏡や行い、脂肪細胞の死、マクロファージの浸潤、cfDNA の局在を観察した。さらに、炎症惹起物質としての cfDNA の血中濃度を測定した。また、cfDNA が慢性炎症を惹起した標的となる細胞を明らかにするために、野生型マウス（WT）と *TLR9* 欠損マウス（*TLR9* KO）間で、①WT→WT、②*TLR9*KO→WT、③WT→*TLR9*KO、④*TLR9*KO→*TLR9*KO の骨髄移植を行った。8 週齢から高脂肪高スクロース食を開始して、インスリン抵抗性、脂肪細胞での慢性炎症における、骨髄細胞の TLR9 の役割を明らかにした。

2. 動脈硬化における cfDNA の役割の検討

動脈硬化惹起性刺激による、血管細胞死と cfDNA への影響を検討した。野生型ならびに *ApoE* 欠損マウスにおいて、14 ならびに 28 週齢における、血管細胞死ならびに血中の cfDNA 濃度を測定した。また、動脈硬化を著明に促進することが知られているアンジオテンシンⅡを持続注入して、細胞死と血中 cfDNA 濃度への影響を検討した。

動脈硬化モデルである *ApoE* 欠損マウスと *TLR9* 欠損マウスを交配したことで *TLR9/ApoE* 2 重欠損マウスを作成した。西洋型食餌を 8 週齢から 28 週齢まで与え、大動脈の en face sudanⅣ染色ならびに大動脈基部の Oil Red O 染色、sirius red 染色を行い、病変の進行や不安定化を *ApoE* 欠損マウスと比較検討した。

cfDNA が動脈硬化における慢性炎症を惹起した標的となる細胞を明らかにするために、野生型マウス（WT）と *TLR9/ApoE* 2 重欠損マウス間で骨髄移植を行い、動脈硬化の進展と不安定化への影響を検討した。

3. cfDNA によるマクロファージ活性化の作用機序の解明

刺激を受けたり細胞死に至った脂肪細胞から放出された cfDNA がマクロファージを活性化する機序を検討した。3T3L1 脂肪細胞を低酸素、過酸化水素、TNFα、Angiotensin II などを用いて細胞死を誘導して、培養上清を採取した。

また、培養上清を野生型もしくは *TLR9* 欠損マウス由来マクロファージに添加して、活性化状態を NFκB やサイトカインの発現で検討した。また、*TLR9* に対した inhibitory オリゴヌクレオチドを投与して、cfDNA/*TLR9* 系の役割を検討した。同様に、培養血管内皮細胞や平滑筋細胞を刺激して培養上清の炎症惹起性を検討した。

4. 慢性炎症の病態に基づいた、生活習慣病に対する新規制御法の開発

細胞死により遊離される物資とその受容体が、脂肪組織と動脈硬化における慢性炎症の病態が明らかになったら、その受容体もしくはリガンドをブロックしたことにより、慢性炎症を標的とした新規の生活習慣病対策を考案した。

具体的には、TLR9 をブロックしたことが可能かどうかを検証した。予備実験においては、inhibitory オリゴヌクレオチド iODN2088（5'-tcc tga gct tga agt-3'）が CpG-ODN によるマクロファージならびにマウス細胞株 RAW264.7 の活性化を有効にブロックしたことを確認している。そこで、iODN2088 を *db/db* 肥満マウスの腹腔内へ投与（150 μ g を週三回）して、脂肪組織での炎症細胞浸潤やインスリン抵抗性が改善されるかどうかをコントロールオリゴヌクレオチドと比較検討した。また、*ApoE* 欠損マウスに iODN2088 ならびにコントロールオリゴヌクレオチドを腹腔内へ投与（150 μ g を週三回）して、動脈硬化の進展と不安定化を抑制したかどうかを検討した。

5. 統計処理

全ての数値は、平均±標準誤差として表示した。2 群間の比較は、unpaired Student's t test で行った。多群間の比較は、one-way analysis of variance（ANOVA）を行ったのち、Tukey test で検定した。二つの変数の関係は、一次回帰分析で行った。$P < 0.05$ を有意とした。

結　果

1. 肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症の機序に関する研究

（1）肥満に伴う脂肪細動の変性と cfDNA の増加

マウスに高脂肪食（High Fat Diet、HFD）を投与すると、肥大化脂肪細胞が細胞死を起こしていた。また、肥満によって cfDNA としての single strand（ss）DNA、double strand（ds）DNA の濃度が上昇した（図 1 上段）。ヒトにおいても内臓脂肪の蓄積に伴って血中の ssDNA 濃度が上昇した（図 1 下段）。

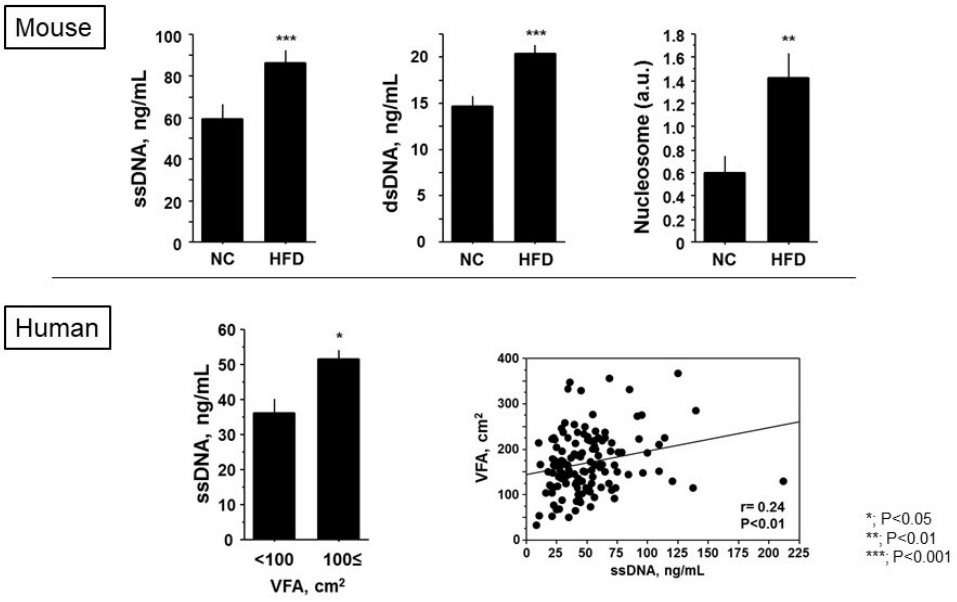


図 1. 肥満にともない、cfDNA 濃度が上昇する

（上段）マウスに高脂肪食負荷（HFD）を投与すると、血中の ssDNA、dsDNA、nucleosome の濃度が上昇した。

（下段）ヒトにおいても内臓脂肪面積（VFA）と血中 cfDNA 濃度は相関し、インスリン抵抗性と関連した。2 群間の比較は、unpaired Student's t test で行った。二つの変数の関係は、一次回帰分析で行った。

(2) *TLR9* 欠損マウスにおける脂肪組織における炎症の減弱とインスリン抵抗性の減弱

野生型マウスと *TLR9* 欠損マウスに高脂肪食（HFD）を投与したところ、*TLR9* 欠損マウスでは、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤とインスリン抵抗性が軽減していた（図 2）。また、骨髄移植の実験によって、骨髄由来細胞に発現している *TLR9* が、肥満に伴う、脂肪組織での炎症とインスリン抵抗性の発現に重要であることが明らかになった。

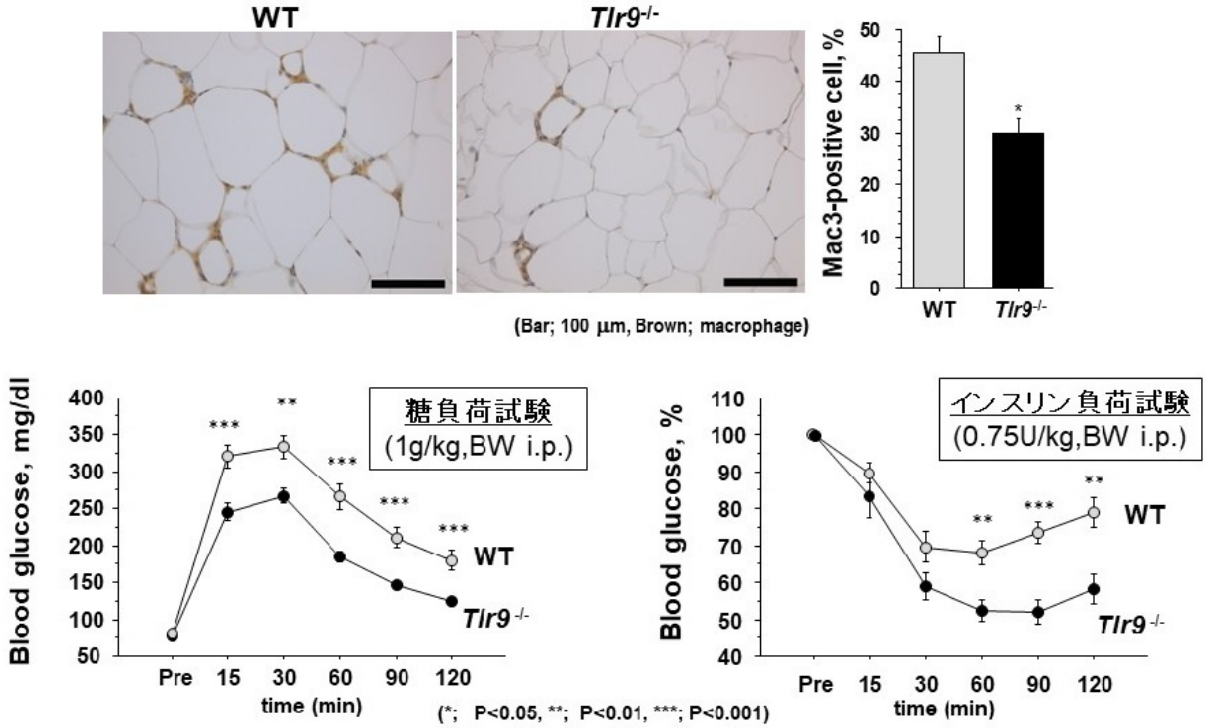


図 2. 肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症とインスリン抵抗性に関して、野生型と *TLR9* 欠損マウスの比較

（上段）*TLR9* 欠損マウスにおいては、野生型マウスに比較して、肥満に伴うマクロファージの浸潤が軽減していた。2 群間の比較は、unpaired Student's t test で行った。

（下段）*TLR9* 欠損マウスにおいては、肥満に伴うインスリン抵抗性が軽減していた。2 群間の比較は、unpaired Student's t test で行った。

2. 脂肪細胞由来の cfDNA がマクロファージを活性化する機序の検討

3T3-1 脂肪細胞培養液の上清を、野生型ならびに *TLR-9* 欠損マウス由来のマクロファージに添加すると、炎症性サイトカインの産生が増加した。脂肪細胞を TNFα で刺激するとその程度は増加した。また、*TLR9* 欠損マウス由来のマクロファージでは軽減していた（図 3）。

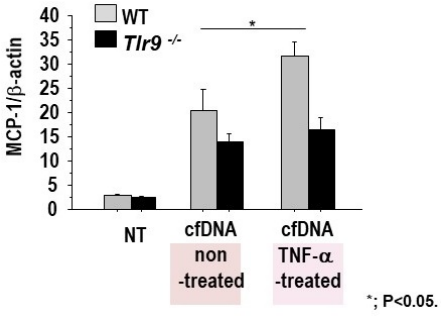


図 3. 3T3L1 脂肪細胞培養上清によるマクロファージの活性化

3T3L1脂肪細胞培養上清中のDNAを濃縮して、野生型ならびに*TLR9* 欠損マウス由来のマクロファージに添加したとこ

ろ、MCP-1の産生が亢進した。脂肪細胞をTNF-αで傷害しておくとその程度が増強した。脂肪細胞培養上清によるマクロファージ活性化作用は、*TLR9* 欠損マウス由来のマクロファージでは減弱していた。多群間の比較は、one-way analysis of variance（ANOVA）を行ったのち、Tukey test で検定した。

3. 動脈硬化における慢性炎症の機序に関する研究

生活習慣病によってどのようにして慢性炎症が惹起されるのかを検討した。肥満に伴って脂肪組織から自己由来の遊離核酸断片（cell free DNA、cfDNA）が放出され、本来、病原体由来の DNA 断片を認識する Toll 様受容体-9（*TLR9*）を cfDNA が活性化し、脂肪組織での慢性炎症ならびにインスリン抵抗性が引き起こされた。

また、アポリポ蛋白 E 欠損（*ApoE* KO）マウスに Angiotensin Ⅱ（Ang Ⅱ）を投与することで、血漿中の 1 本鎖 DNA などの cfDNA が増加した。大動脈において、cfDNA の受容体となりうる TLR9 の発現が Ang Ⅱ投与により有意に増加し、主たる発現細胞はマクロファージであった。*TLR9/ApoE 2* 重欠損（dKO）マウスを確立し、AngⅡ投与下で誘導される動脈硬化病変を解析した。両群間で体重、血圧、血漿脂質値に差を認めなかったが、*TLR9/ApoE*dKO マウスの動脈硬化病変およびプラーク内脂質量は、*ApoE* KO マウスに比べて有意に少なかった。また、*TLR9/ApoE* dKOマウスの腹部大動脈において、MCP-1などの炎症性物質の発現やマクロファージの浸潤が減少していた。さらに、骨髄移植実験により、血管壁より骨髄の *TLR9* が重要であることが明らかとなった。また、TLR9 のアゴニストや AngⅡなどで傷害を与えた血管内皮細胞を用いてマクロファージを刺激することで、NF-κB シグナルの活性化が認められ、TNF-αや MCP-1 などの炎症関連分子の発現が有意に増加した。

以上より、血管傷害により遊離した cfDNA が、マクロファージ *TLR9* を活性化し血管の炎症を惹起し、動脈硬化の進展を促進することが示唆された。

4. TLR9/cfDNA をターゲットとした生活習慣病の治療法の開発

（1）肥満に伴う脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性に対する戦略

マウスに、*TLR9* の阻害作用のあるオリゴヌクレオチドを腹腔内に週 3 回注射すると、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤とインスリン抵抗性が改善した（図 4）。

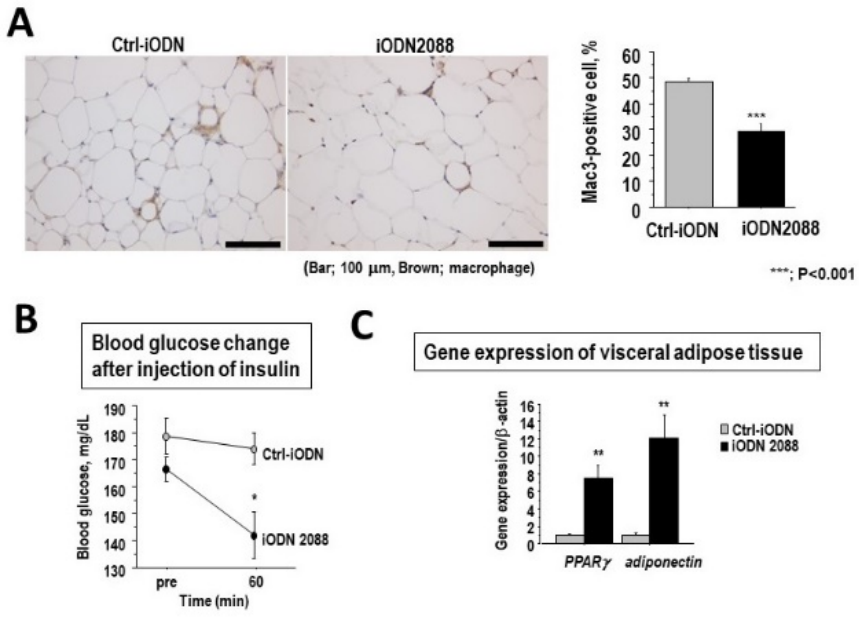


図 4. TLR9 阻害オリゴヌクレオチドによる炎症抑制効果

マウスの腹腔内に*TLR9* 阻害オリゴヌクレオチドiODN2088を投与したところ、肥満に伴う脂肪細胞の炎症が抑制された（A）。また、iOD2088の投与は、インスリン抵抗性を改善して（B）、脂肪組織でのインスリン感受性改善遺伝子の発現を増強した（C）。2群間の比較は、unpaired Student's t test で行った。

(2) 肥満に伴う脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性に対する戦略

ApoE 欠損マウスに、*TLR9* の阻害作用のあるオリゴヌクレオチドを腹腔内に週 3 回注射すると、動脈硬化性病変の進行が抑制された。また、動脈硬化プラーク内へのマクロファージの浸潤が減弱し、脂肪蓄積が抑制された。また、炎症性サイトカインや MMP9 の発現が抑制された。

考　察

本研究においては、肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症とそれに伴うインスリン抵抗性に、肥大した脂肪細胞から放出される自己 DNA が、マクロファージの自然免疫受容体 *TLR9* を刺激すること示された。また、*TLR9* 阻害することが、肥満に伴うインスリン抵抗性の改善に重要であることが明らかになった。同様に、動脈硬化においても、アンジオテンシン II などの動脈硬化惹起物質が、血管細胞のアポトーシスなどの細胞死を誘導して自己 DNA を増加させた。

TLR9 は本来、外来性病原体の DNA を認識する自然免疫に重要な受容体である。最近の報告では、*TLR* ファミリーの *TLR4* が遊離脂肪酸を認識して、脂肪組織での慢性炎症の悪循環に関与することが示されている [2]。今回、我々の研究によって、生活習慣病によって、脂肪細胞や血管細胞の細胞死を引き起こし、そこから放出される DNA が自然免疫受容体 *TLR9* を活性化し、慢性炎症を惹起することが明らかとなった。我々の研究によって、生活習慣病によって生じるインスリン抵抗性、動脈硬化を防ぐうえで、自己 DNA/*TLR9* 系がキーとなる経路であることが明らかとなった。今後、自己 DNA/*TLR9* 系を標的として、新たな生活習慣病の合併症治療法の開発が行われることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院医歯薬学研究部の福田大受特任講師と西本幸子客員研究員である。

文　献

1) Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama JR, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. Sci Adv. 2016 Mar 25;2(3):e1501332. doi: 10.1126/sciadv.1501332. eCollection 2016 Mar. PMID: 27051864

2) Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Jan;27(1):84-91. Epub 2006 Nov 2. PMID: 17082484