

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09512

研究課題名(和文)新規脂肪由来分泌因子による血管リモデリング制御機構

研究課題名(英文)Regulation of pathological vascular remodeling by a novel adipocytokines

研究代表者

大橋 浩二(Ohashi, Koji)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：10595515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥満状態で低下する新規アディポサイトカイン、アディポリンの病的血管リモデリングに対する役割を検討した。アディポリン欠損マウス(APL-KO)と、野生型(WT)マウスに大腿動脈ワイヤー傷害モデルを作製したところ、傷害後の血管壁においてAPL-KOはWTと比較して新生内膜肥厚の増強と、新生内膜での平滑筋細胞増殖を認めた。また傷害血管壁におけるマクロファージ浸潤と炎症性応答もWTと比較して増加した。さらに培養細胞における検討では、アディポリンはマクロファージの炎症性応答、平滑筋細胞の増殖を、TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  RII/Smad2シグナルを介して抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肥満でその発現が低下し、インスリン感受性を促進する新規のアディポサイトカインとして、我々が同定したアディポリンに着目し、自ら作製した遺伝子改変マウスを用いて、内因性アディポリンの血管病モデルにおける役割の解明を行うという非常に新規性に富み独創性が高いものである。今回の結果から、内因性アディポリンの欠如は、肥満に伴う動脈硬化、病的血管リモデリングの増悪に繋がること示唆され、アディポリンを標的とした研究は、心血管病の病態生理の発見や新規の治療法の開発に発展する可能性を秘めており、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Dysregulation of adipocytokines are involved in the pathogenesis of vascular disease. We previously identified adipolin (APL) as an insulin-sensitizing adipocytokine reduced in obesity. Here, we investigated whether APL modulates pathological vascular remodeling. APL-knockout (KO) and wild-type (WT) mice were subjected to wire-induced injury of the femoral artery. APL-KO mice showed increased neointimal thickening after vascular injury compared with WT mice, which was accompanied by an enhanced inflammatory response and vascular cell proliferation in injured arteries. Treatment of cultured macrophages with APL reduced inflammatory responses, which were reversed by inhibition of TGF- $\beta$  RII/Smad2 signaling. APL also reduced proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) through TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  RII/Smad2-dependent pathway. Our data indicate that APL protects against the development of pathological vascular remodeling by attenuating macrophage inflammatory responses and VSMC proliferation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血管リモデリング 抗炎症作用 内皮保護作用 平滑筋細胞増殖抑制作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国を含めた先進諸国において、心血管病は年々増加しており死亡率も高く、社会問題になっている。近年肥満、特に内臓脂肪の蓄積を基盤としたメタボリックシンドロームが心血管病の重要な発症基盤であることが多く報告されている。我々は長年にわたり脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインとメタボリックシンドローム、特に心血管病についての研究に従事してきており、新規アディポサイトカインの探索の過程で、アディポネクチンパラログである CTRP12 が脂肪組織に多く発現し、肥満マウスにおいて血中濃度が低下していること、抗糖尿病作用を有していることを見出し、アディポリンと命名した(Enomoto T, Ohashi K et al. *J Biol Chem.* 2011)。またアディポリンの全身投与は、肥満マウスにおける脂肪組織での炎症を抑制することを報告した。心血管病と慢性炎症は強く関連することより、アディポリンが抗炎症作用を介して、肥満に伴う心血管病に防御的に作用するという仮説を立て、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では、血管病に対するアディポリンの作用について遺伝子改変マウスを用いて個体レベルで明らかにする。さらに、その分子機序を細胞レベルでも明らかにする。本研究の目的は、アディポリンの機能解析により、アディポリンを標的とした動脈硬化性疾患の治療応用へと展開することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子改変マウスの作製

アディポリンは他臓器に比べて圧倒的に脂肪組織で高発現していることより、常法により全身アディポリン欠損(APL-KO)マウスを作製し、脂肪由来のアディポリンの役割を検討する。

#### (2) アディポリンの心血管病モデルにおける保護作用の検討。

病的血管リモデリングの評価: 8~10 週齢の APL-KO と野生型(WT)マウスの左側大腿動脈に、側枝から直径 0.38 mm のスプリングワイヤーを挿入することで大腿動脈の内皮を剥奪し血管傷害モデルを作製する。ワイヤー抜去時に挿入部位の側枝は結紮する。術後 3 週目に解剖し、傷害血管を取り出し、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィン切片を作成する。ヘマトキシリン、エオジン染色後、傷害血管壁の新生内膜面積と中膜の面積を測定し、内膜/中膜面積比にて血管リモデリングを評価する。また WT マウスにアディポリンを過剰発現するアデノウイルスを右頸静脈から静注し、全身のアディポリン血中濃度を 2 倍程度に増加させ、血管リモデリングに対するアディポリンの作用を解析する。

アディポリンの病的血管リモデリングに対する作用のメカニズム解析: 傷害血管の新生内膜での平滑筋細胞増殖を BrdU/ SMA の二重染色にて評価する。また脱落した血管内皮の再生部位は Evans blue dye で染色されないことより、Evans blue dye を静注することにより、青く染まる内皮再生障害部位を評価する。

#### (3) 血管構成細胞に対するアディポリンの作用の解明

リコンビナント蛋白作製: HEK293F 細胞にアディポリンの cDNA を高発現した安定細胞株を、無血清培地で培養し、培養液中に分泌されたアディポリン蛋白をアフィニティークラムを用いて精製する。

マクロファージへの影響: マウス腹腔内マクロファージと、RAW 264.7 細胞を用い、アディポリン蛋白添加による、TNF- $\alpha$  や LPS 添加後の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6 など)の発現を評価する。

血管内皮細胞への影響: ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いる。アディポリン蛋白添加により、8.0mm pore の Trans-well を用いて、血管内皮細胞の遊走能を評価する。またアディポリン蛋白添加後に、Serum deprivation を 48 時間施行することでアディポリンのアポトーシスに対する作用を解析する。アポトーシスは TUNEL 染色を用いて評価する。

血管平滑筋細胞への影響: ヒト大動脈平滑筋細胞(HASMC)を用い、増殖因子(PDGF-BB)添加による細胞増殖能を細胞数と BrdU 染色で評価する。

#### (4) 血管構成細胞に対する APL のシグナル伝達機構の解明

血管構成細胞を用いて、細胞の APL による表現型制御に関与しているシグナル伝達経路を明らかにする。シグナル伝達物質(Smad2/3, AMPK, Akt, P38, ERK, JNK, NF- $\kappa$ B など)への作用をリン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティング法により評価する。細胞の表現型に関与するシグナル経路の解明には、そのシグナル伝達物質に対する siRNA や阻害剤を用いて検討する。

#### (5) TGF- $\beta$ 1 蛋白量の測定

培養血管構成細胞(腹腔マクロファージ, HASMC)にアディポリン蛋白を添加した後の培養上清中の TGF- $\beta$ 1 濃度を、ELISA システム(R&D)を用いて測定する。またワイヤー傷害後の血管壁における TGF- $\beta$ 1 蛋白量についても ELISA システム(R&D)を用いて測定する。

#### 4. 研究成果

APL-KO マウスは従来法を用いて、全身の APL 欠損マウスを作製した。APL の欠損は脂肪組織での mRNA 発現、血中濃度の測定で確認した。作製した APL-KO マウスは WT マウスと比較して、12 週齢で体重、血圧、血糖、臓器重量に差を認めなかった。また脂肪組織で他の CTRP ファミリー (アディポネクチン、CTRP1、CTRP9) の発現が代償的に変化しないことを定量的 PCR 法にて確認した。

APL-KO マウスと WT マウスに 8~10 週齢の時点で、左大腿動脈ワイヤー傷害手術を施行したところ、APL-KO マウスは WT マウスと比較して、新生内膜/中膜面積比が有意に大きく、新生内膜の肥厚が増強していた。この時新生内膜内のマクロファージの浸潤 (CD68 染色で評価) も KO で有意に多く、TNF、IL6、MCP1 等の炎症性メディエーターの発現も有意に高値を示した。一方、APL を発現するアデノウイルスを静注することにより、APL 血中濃度を 2 倍程度に増加させると、対照群と比較して、新生内膜/中膜面積比は低く、炎症性メディエーターの発現も低下していた。

ワイヤー傷害後の再内皮化障害は、病的血管リモデリングを促進することが知られており、今回の検討でもエバンスブルーを解剖 24 時間前に静脈注射し、青く染まらない再内皮化部位の面積を測定したところ、APL-KO では WT と比較して、再内皮化面積が有意に低値を示した。HUVEC に APL 蛋白を添加すると、内皮細胞の遊走が促進し、Serum deprivation 48 時間で誘導したアポトーシスも抑制し、APL は直接内皮保護作用を発揮することが示唆された。

炎症性応答は病的血管リモデリングを促進することが報告されている。今回マウス腹腔内マクロファージを用いた *in vitro* の検討では、LPS 誘導性の炎症性メディエーター (TNF、IL6、MCP1) の発現上昇を、APL は濃度依存性に抑制した。メカニズムとしては、APL 蛋白は Smad2 のリン酸化を増強することが明らかとなり、TGF $\beta$ 1/Smad2 シグナルの阻害剤である、SB431542 により、APL の抗炎症作用がリバーサされることより、APL の抗炎症作用には TGF $\beta$ 1/Smad2 シグナルを介することが示された。

ワイヤー傷害後の新生内膜において、増殖の主たる細胞は平滑筋細胞であることが多く報告されている。新生内膜での増殖平滑筋細胞を、BrdU/ SMA 二重染色にて同定し、数を計測したところ、APL-KO の新生内膜内の増殖平滑筋細胞は WT と比較して有意に高頻度であった。HASMC を用いた検討では、APL 蛋白は濃度依存性に、PDGF-BB 誘導性の細胞増殖を抑制することが示された。HASMC においても APL 蛋白の添加は、Smad2 のリン酸化を亢進し、TGF $\beta$ 1/Smad2 シグナルの阻害剤である、SB431542 により、APL の平滑筋細胞増殖抑制作用がリバーサされることより、この作用に関しても TGF $\beta$ 1/Smad2 シグナルを介することが示された。

APL が Smad2 を活性化するメカニズムに関しては、TGF $\beta$ 1 RII を siRNA で 80%程度低下させることにより、APL による Smad2 リン酸化が完全にキャンセルされ、可溶性 TGF $\beta$ 1 RII の添加によってもキャンセルされることより、APL による Smad2 リン酸化は TGF $\beta$ 1 RII を介していることが示された。さらに、HASMC とマウス腹腔マクロファージに APL 蛋白を添加すると、培養上清中の TGF $\beta$ 1 濃度が有意に増加した。In vivo においても、傷害血管では TGF $\beta$ 1 蛋白量が増加したが、APL-KO の傷害血管では WT と比較して有意に低値であった。一方アデノウイルスにより、APL の血中濃度を上昇させた時の傷害血管での TGF $\beta$ 1 蛋白量は、対照群の傷害血管より有意に高値を示した。

以上の結果より、APL は傷害血管における、平滑筋細胞、マクロファージの TGF $\beta$ 1 を増加させることで、TGF $\beta$ 1 RII、Smad2 シグナルを介して、平滑筋細胞増殖抑制作用、抗炎症作用を発揮することにより、病的血管リモデリングを抑制することが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Ogawa H, Ohashi K\*, Ito M, Shibata R, Kanemura N, Yuasa D, Kambara T, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Otaka N, Kawanishi H, Yamaguchi S, Enomoto T, Abe T, Kaneko M, Takefuji M, Murohara T and Ouchi N. Adipolin/CTRP12 protects against pathological vascular remodeling through suppression of smooth muscle cell growth and macrophage inflammatory response. *Cardiovasc Res*. 2019. \*Corresponding author (査読有り) DOI: 10.1093/cvr/cvz074

Otaka N, Shibata R, Ohashi K, Uemura Y, Kambara T, Enomoto T, Ogawa H, Ito M, Kawanishi H, Maruyama S, Joki Y, Fujikawa Y, Narita S, Unno K, Kawamoto Y, Murate T, Murohara T and Ouchi N. Myonectin Is an Exercise-Induced Myokine That Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury. *Circ Res*. 2018;123:1326-1338. (査読有り) DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313777

Lau WB\*, Ohashi K\*, Wang Y, Ogawa H, Murohara T, Ma XL and Ouchi N. Role of

Adipokines in Cardiovascular Disease. *Circ J.* 2017;81:920-928. \***Eqall first author** (査読有り) DOI:10.1253/circj.CJ-18-0458

Kanemura N, Shibata R, **Ohashi K**, Ogawa H, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Ito M, Hayakawa S, Otaka N, Murohara T and Ouchi N. C1q/TNF-related protein 1 prevents neointimal formation after arterial injury. *Atherosclerosis.* 2017;257:138-145. (査読有り) DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.014

Ouchi N, **Ohashi K**, Shibata R and Murohara T. Protective Roles of Adipocytokines and Myokines in Cardiovascular Disease. *Circ J.* 2016;80:2073-80. (査読有り) DOI:10.1253/circj.CJ-16-0663

Hayakawa S, **Ohashi K\***, Shibata R, Takahashi R, Otaka N, Ogawa H, Ito M, Kanemura N, Hiramatsu-Ito M, Ikeda N, Murohara T and Ouchi N. Association of Circulating Follistatin-Like 1 Levels with Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Healthy Men. *PLoS One.* 2016;11:e0153619. \***Corresponding author** (査読有り) DOI:10.1371/journal.pone.0153619

Hiramatsu-Ito M, Shibata R, **Ohashi K**, Uemura Y, Kanemura N, Kambara T, Enomoto T, Yuasa D, Matsuo K, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Otaka N, Kihara S, Murohara T and Ouchi N. Omentin attenuates atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2016;110:107-17. (査読有り) DOI:10.1093/cvr/cvv282

[学会発表](計 15件)

学会発表(海外)

Hayato Ogawa, **Koji Ohashi**, Toyoaki Murohara, Noriyuki Ouchi. Adipolin/C1q/TNF-Related Protein 12 acts as a biomarker of coronary artery disease and prevents the pathological vascular remodeling. The 18th International Symposium on Atherosclerosis, Oral presentation, Toronto, Canada, 2018/06/10

Hayato Ogawa, **Koji Ohashi**, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi Adipolin/C1q/TNF-Related Protein 12 Acts as a Biomarker of Coronary Artery Disease and Prevents the Pathological Vascular Remodeling. The 6<sup>th</sup> International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis Oral presentation, Seoul, Korea, 2017/09/8

Naoya Otaka, Rei Shibata, **Koji Ohashi**, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi Myonectin/CTRP15 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. Poster presentation, ESC Congress 2017, 26-30 August, 2017, Barcelona, Spain

Hayato Ogawa, **Koji Ohashi**, Rei Shibata, Masanori Ito, Naoya Otaka, Hiroshi Kawanishi, Shukuro Yamaguchi, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi Adipolin/CTRP12 acts as a biomarker of coronary artery disease and protects against pathological vascular remodeling. Poster presentation, ESC Congress 2017, 26-30 August, 2017, Barcelona, Spain

Hayato Ogawa, **Koji Ohashi**, Rei Shibata, Masanori Ito, Naoya Otaka, Hiroshi Kawanishi, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi

A novel adipokine adipolin prevents pathological vascular remodeling following arterial injury.  
Poster presentation, AHA 2016 Scientific Sessions, 12-16 November, 2016, New Orleans, Louisiana, USA

**Koji Ohashi**, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi

A Novel Myokine Neuron-derived Neurotrophic Factor Modulates Endothelial and Cardiac Function in a Model of Myocardial Infarction.

The 5<sup>th</sup> International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis  
Oral presentation, The Best Research Award, Seoul, Korea, 2016/09/10

Hayato Ogawa, **Koji Ohashi**, Rei Shibata, Mizuho Hiramatsu-Ito, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi

Role of an adipokine omentin in preventing the development of atherosclerosis.  
Poster presentation, ESC Congress 2016, 27-31 August, 2016, Rome, Italy

Hayato Ogawa, **Koji Ohashi**, Rei Shibata, Noriyoshi Kanemura, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi

C1q/TNF-related protein 1 reduces vascular smooth muscle cell growth and neointimal thickening after vascular injury.

Poster presentation, ESC Congress 2016, 27-31 August, 2016, Rome, Italy

学会発表（国内）

**Koji Ohashi**, Noriyuki Ouchi, Hayato Ogawa, Rei Shibata and Toyoaki Murohara

Impact of the anti-inflammatory adipocytokine in vascular disease  
第 82 回 日本循環器学会学術集会 2018 シンポジウム, 2018/03/25

**大橋浩二**、小川隼人、室原豊明、大内乗有

新規アディポサイトカイン CTRP1 の心血管保護作用  
ポスター発表, 第 38 回 日本肥満学会, 2017/10/07、大阪

小川隼人、**大橋浩二**、柴田玲、室原豊明、大内乗有

新規アディポサイトカイン・Adipolin の心血管病における役割について  
Young Investigator Award Finalist, 口頭発表, 第 38 回 日本肥満学会, 2017/10/07、大阪

小川隼人、**大橋浩二**、柴田玲、大内乗有、室原豊明

新規アディポサイトカイン「アディポリン」の血管病における役割  
Young Investigator Award 受賞  
第 90 回 日本内分泌学会学術集会, 2017/04/20、京都

Hayato Ogawa, Koji Ohashi, Rei Shibata, Masanori Ito, Naoya Otaka, Hiroshi Kawanishi, Shukuro Yamaguchi, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi  
A novel adipokine adipolin attenuates neointimal thickening following vascular injury.  
Oral Presentation, Featured Research Session,  
第 81 回 日本循環器学会学術集会, 2017/03/18、金沢

Koji Ohashi, Rei Shibata, Toyoaki Murohara and Noriyuki Ouchi  
**Protective roles of C1q/TNF-related proteins as adipocytokines in cardiovascular disease.**  
シンポジウム10, Molecular basis of cardiovascular dysfunction in metabolic diseases. 第81回 日本循環器学会学術集会、2017/03/18、金沢

小川隼人、大橋浩二、柴田玲、金村則良、室原豊明、大内乗有  
「アディポネクチンパラログ、C1q/TNF-related protein 1 による血管リモデリング抑制作用」  
第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2016/07/15

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大内 乗有

ローマ字氏名： Ouchi Noriyuki

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：寄附講座教授

研究者番号(8桁): 00595514

研究分担者氏名：室原 豊明

ローマ字氏名： Murohara Toyoaki

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 90299503

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。