

令和元年5月27日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21370

研究課題名(和文) 摂食抑制ペプチドのネスファチンの動脈保護薬としての可能性

研究課題名(英文) Vasoprotective effects of nesfatin-1

研究代表者

森 雄作 (Mori, Yusaku)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90595919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：摂食抑制ホルモンとして同定されたネスファチン-1は心血管系にも直接影響を及ぼすことが明らかとなりつつある。しかし、動物モデルではネスファチン-1の投与による心血管系の保護作用と障害作用の両者が報告されている。本研究ではネスファチン-1の投与量を調節することで心血管系に悪影響を及ぼすことなく臓器保護作用のみを得ることができるかをマウス大腿動脈ワイヤー傷害モデルで調べた。投与量を調節したネスファチン-1は、脈拍数と収縮期血圧を変化させることなく、傷害動脈の新生内膜過形成を抑制した。さらにネスファチン-1前駆タンパクのトランスジェニックマウスにおいても傷害動脈の新生内膜過形成の抑制が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネスファチン-1は肥満症治療の創薬ターゲットとして注目されているが、心血管系に対する悪影響を及ぼす懸念があった。本研究から、適切な投与量を選択することでネスファチン-1は心血管系に悪影響を及ぼすことなく、動脈保護作用を示すことが明らかにされた。本研究の結果は、ネスファチン-1が肥満症のみでなく心血管疾患の新たな治療薬を開発するための手がかりとなる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Nesfatin-1 is a novel anorexic peptide hormone that also induces direct cardiovascular actions. However, it is unclear whether nesfatin-1 can be a therapeutic target for the treatment with cardiovascular diseases because both beneficial and harmful cardiovascular effects of nesfatin-1 are reported in animal models. Here, we evaluated the vasoprotective and vasopressor effects of nesfatin-1 at different doses in mouse models of femoral artery wire injury. Compared with vehicle, nesfatin-1 treatments at 2.0 and 10 µg/kg/day elevated plasma nesfatin-1 levels with no changes in systolic blood pressure. Furthermore, these treatments reduced neointimal hyperplasia without inducing undesirable remodeling in injured arteries. In mice with transgene nucleobindin-2, which is a precursor of nesfatin-1, neointimal area was also lower than those observed in littermate controls. Our findings indicate that nesfatin-1 can be a therapeutic target for improved treatment of peripheral artery disease.

研究分野：糖尿病代謝内分泌

キーワード：ネスファチン-1 マウス 動脈リモデリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネスファチン-1 は中枢神経系に作用して食欲を抑制するペプチドホルモンとして同定され、肥満症治療の創薬ターゲットとして注目されている。さらにネスファチン-1 は心血管系にも直接的に作用することが明らかになりつつある。コホート研究では、血中ネスファチン-1 濃度の低値と心血管疾患の発症リスク増加が関連することが報告されている。心血管疾患は肥満症患者における主要な死因の一つであり、ネスファチン-1 の心血管作用を解明することには重要な意義がある。

心血管疾患の動物モデルを用いた基礎研究で、ネスファチン-1 を末梢投与すると臓器障害が軽減されることが報告されており、ネスファチン-1 は抗肥満薬としてのみではなく、心血管疾患の新たな治療薬となる可能性がある。

一方で、ネスファチン-1 の末梢投与によって血圧が上昇することも報告されている。血圧の上昇は心血管疾患の発症リスク増加につながるため、ネスファチン-1 の昇圧作用は臨床応用を妨げる要因となる。しかし、ネスファチン-1 の臓器保護作用は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以下で示されているが、血圧上昇作用は約 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の急速投与で示されている。このため、ネスファチン-1 の投与量を調節することで昇圧作用を生じることなく臓器保護作用のみを得ることができるかについて明らかではない。

2. 研究の目的

本研究はマウスモデルを用いて、異なる投与量のネスファチン-1 が血圧と動脈リモデリングに及ぼす影響を調べることを目的とした。また、培養のヒト血管内皮細胞と血管平滑筋細胞を用いてネスファチン-1 の血管作用に関与する分子機序を調べた。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

本研究では野生型マウス(C57BL/6J)とネスファチン-1 の前駆タンパクであるヌクレオビンデイン-2 トランスジェニックマウス(NUCB2-Tg)を使用した(Shimizu H, et al. Nutrition & Diabetes 2016;7:e201)。

(2) 動物モデルの作成

野生型マウスはコントロール群、低用量ネスファチン-1 群(0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$, Nes-0.2)、中等量ネスファチン-1 群(2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$, Nes-2)、高用量ネスファチン-1 群(10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$, Nes-10)に振り分けた。ネスファチン-1 は内容液を徐放する浸透圧ポンプを背部皮下に植え込むことで持続的に投与した。ポンプ植え込みから 2 日後に大腿動脈にガイドワイヤーを挿入し、内腔より血管を傷害して末梢動脈リモデリングモデルを作成した。NUCB2-Tg マウスおよび non-transgenic littermate マウス(コントロールマウス)は浸透圧ポンプの植え込みを行わず、大腿動脈へのガイドワイヤー挿入のみを行った。末梢動脈リモデリングモデル作成から 22-24 日後にテイルカフ法で血圧を測定し、26 日後に血液と大腿動脈を採取した。

(3) 血中ネスファチン-1 濃度の測定

実験終了時に採取した血液検体を用いて血中ネスファチン-1 濃度を ELISA 法で測定した(ARG81768, Arigo Biolaboratories)。

(4) 大腿動脈リモデリングの評価

採取した大腿動脈をパラフィン包埋して組織切片を作成し、Elastica van Gieson 染色と抗 ki-67 抗体(Abcam Japan より購入)を用いた免疫染色を行った。

(5) 細胞実験

ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)とヒト大動脈平滑筋細胞(human aortic smooth muscle cell, HASMC)を Lonza Japan より購入して使用した。各測定を行う際に、HUVEC は 0.3% fetal bovine serum (FBS)添加 M199 培地、HASMC は 0.3% FBS 添加 SmBM 培地で前培養を行った。

(6) 一酸化窒素(nitric oxide, NO)産生の評価

濃度を振り分けたネスファチン-1 を HUVEC の培地に添加し、2 時間後に培地中の NO 代謝産物 NO^2 と NO^3 を蛍光法で測定した。

(7) 細胞増殖の評価

濃度を振り分けたネスファチン-1 を HUVEC と HASMC の培地に添加した。HASMC ではネスファチン-1 の添加から 1 時間後に細胞増殖因子 platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB, 20 ng/mL)を加えた。24-48 時間培養した後に WST-8 試薬を培地に加え、色調の変化を吸光度計で測定した。

(8) リン酸化タンパクの測定

HUVEC と HASMC をネスファチン-1 で刺激した後にタンパクを抽出した。抽出したタンパクは SDS-PAGE 法によって分離した後に polyvinylidene fluoride 膜に転写し、各種抗体を用いて Western blot 法を行なった。目的タンパクは発光試薬を用いて検出した。使用した抗体は、Cell Signaling Technology Japan より AMP-activated protein kinase(AMPK)・Akt・p42/p44、Sigma-Aldrich Japan より β -actin を購入した。

(9) siRNA トランスフェクション

ネガティブコントロールの siRNA および liver kinase B1 (LKB1) をターゲットとした siRNA を Thermo Fisher Scientific Japan より購入して使用した。

4. 研究成果

(1) 異なる投与量のネスファチン-1 が血圧と動脈リモデリングに及ぼす作用

中等量および高用量ネスファチン-1 の投与によって血中ネスファチン-1 濃度が上昇したが、低用量のネスファチン-1 では変化が見られなかった(図 1A)。いずれの投与量においてもネスファチン-1 は脈拍数と収縮期血圧を変化させなかった(図 1B, 1C)。ワイヤー傷害によって惹起された動脈リモデリングの評価では、中等量および高用量のネスファチン-1 の投与によって新生内膜過形成の抑制が認められた(図 1D, 1E)。

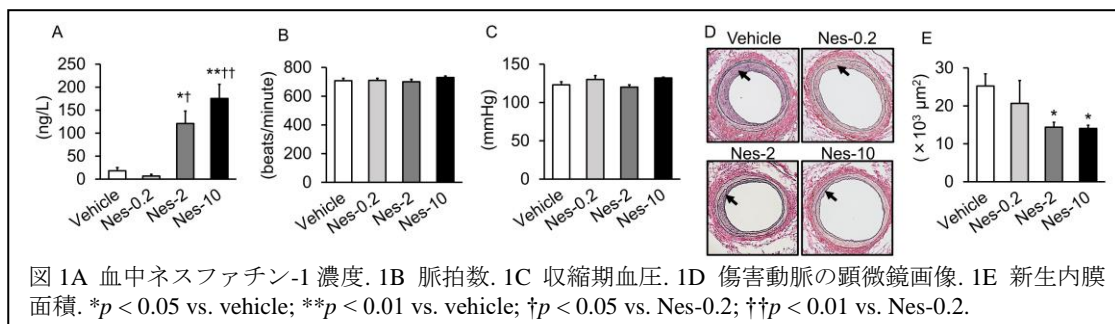


図 1A 血中ネスファチン-1 濃度. 1B 脈拍数. 1C 収縮期血圧. 1D 傷害動脈の顕微鏡画像. 1E 新生内膜面積. * $p < 0.05$ vs. vehicle; ** $p < 0.01$ vs. vehicle; † $p < 0.05$ vs. Nes-0.2; †† $p < 0.01$ vs. Nes-0.2.

(2) NUCB2-Tg マウスにおける血圧と動脈リモデリングの変化

NUCB2-Tg マウスではコントロールマウスと比較して血圧が上昇していたが(図 2A)、傷害動脈における新生内膜過形成の抑制が認められた(図 2B, 2C)。さらに NUCB2-Tg マウスの傷害動脈では細胞増殖の指標である ki-67 陽性細胞が減少しており、ki-67 陽性細胞数と新生内膜面積に負の相関関係が認められた ($r = 0.46, p = 0.03$)。

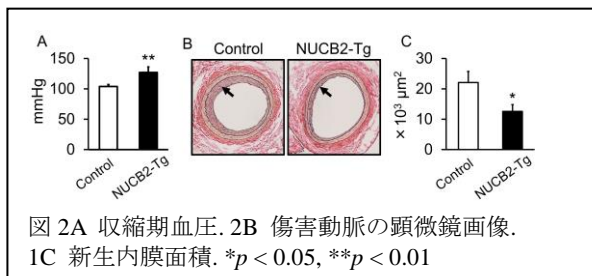


図 2A 収縮期血圧. 2B 傷害動脈の顕微鏡画像. 2C 新生内膜面積. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

(3) ネスファチン-1 のヒト血管内皮細胞への作用

HUVEC をネスファチン-1 で刺激すると濃度依存的な NO 産生の増加が認められた(図 3A)。一方で、ネスファチン-1 は HUVEC の細胞増殖に影響を及ぼさなかった(図 3B)。さらにネスファチン-1 100nM による刺激はリン酸化 AMPK(Thr172)を増加させ、その効果は LKB1 のノックダウンによって消失した(図 3C, 3D)。一方で、ネスファチン-1 は Akt(Thr308)と p42/p44(Thr202/Tyr204)のリン酸化には影響を及ぼさなかった。

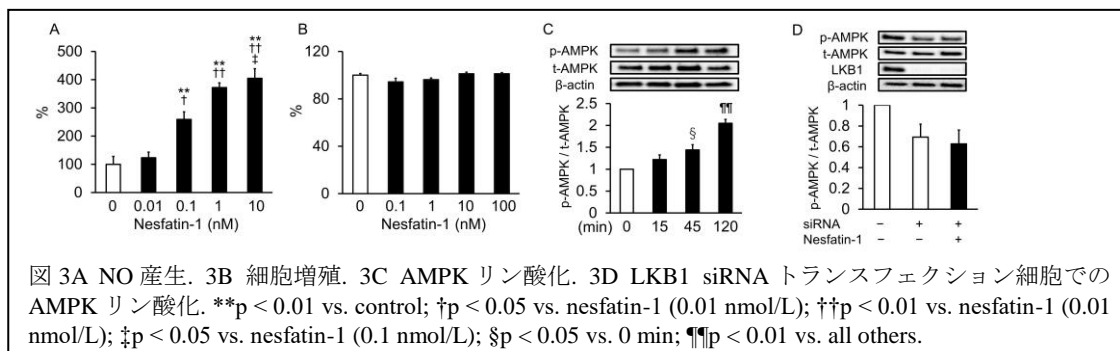


図 3A NO 産生. 3B 細胞増殖. 3C AMPK リン酸化. 3D LKB1 siRNA トランスフェクション細胞での AMPK リン酸化. ** $p < 0.01$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. nesfatin-1 (0.01 nmol/L); †† $p < 0.01$ vs. nesfatin-1 (0.01 nmol/L); ††† $p < 0.05$ vs. nesfatin-1 (0.1 nmol/L); § $p < 0.05$ vs. 0 min; ¶¶ $p < 0.01$ vs. all others.

(4) ネスファチン-1 のヒト血管平滑筋細胞への作用

ネスファチン-1 は細胞増殖因子 PDGF-BB 添加の有無に関わらず HASMC の細胞増殖に影響を及ぼさなかった(図 4A, 4B)。ネスファチン-1 100nM による刺激は HASMC においてもリン酸化 AMPK を増加させたが、Akt と p42/44 のリン酸化には影響を及ぼさなかった(図 4C)。

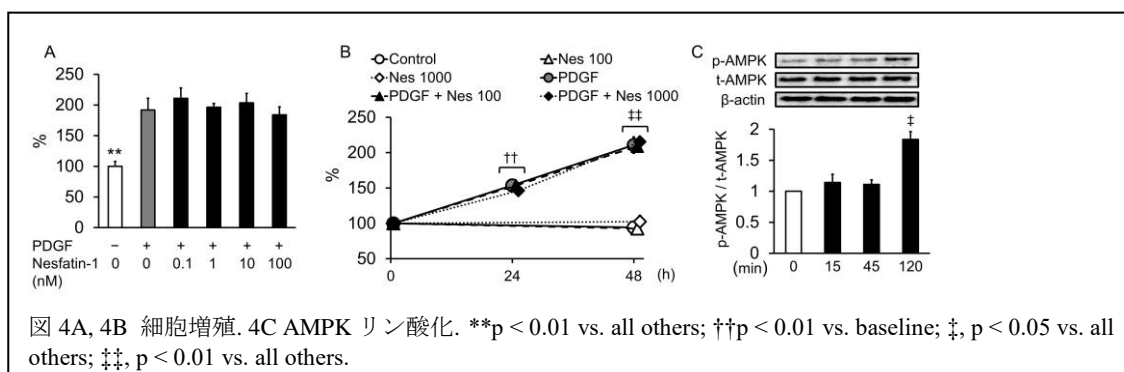


図 4A, 4B 細胞増殖. 4C AMPK リン酸化. **p < 0.01 vs. all others; ††p < 0.01 vs. baseline; ‡, p < 0.05 vs. all others; ‡‡, p < 0.01 vs. all others.

本研究から、適切な投与量を選択することでネスファチン-1 は血圧を上昇させることなく動脈保護作用を示すことが明らかになった。さらにネスファチン-1 の動脈保護作用には、血管内皮細胞における NO 産生促進作用、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞における AMPK の活性化が関与していると考えられた。本研究の結果は、ネスファチン-1 が心血管疾患の新たな治療薬を開発するための手がかりとなる可能性を示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Mori Y, Shimizu H, Kushima H, Saito T, Hiromura M, Terasaki M, Koshibu M, Ohtaki H, Hirano T. Nesfatin-1 suppresses peripheral arterial remodeling without elevating blood pressure in mice. *Endocr Connect.* 2019 May; 8(5): 536–546.

[学会発表] (計 2 件)

1. Mori Y, Shimizu H, Kushima H, Terasaki M, Hiromura M, Koshibu M, Kohashi K, Hirano T. Anorexic Peptide Nesfatin-1 Exerts Vasoprotective Effects in Injured Arteries of Mice. *American Diabetes Association's 78th Scientific Sessions.* 2018 年.
2. 森 雄作, 清水 弘行, 九島 秀樹, 寺崎 道重, 広村 宗範, 小橋 京子, 小澁 正和, 平野 勉. 摂食抑制ペプチドのネスファチン-1 の動脈保護作用—マウスモデルを用いた検討. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018 年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：清水 弘行

ローマ字氏名：Shimizu Hiroyuki

※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。