

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02731

研究課題名(和文) アディポカイン制御因子の解明に基づく動脈硬化診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method for atherosclerosis based on adipokine regulatory factors

研究代表者

木原 進士 (Kihara, Shinji)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20332736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規アディポネクチン結合蛋白としてC-C motif chemokine 2 (CCL2)とFrizzled (FZD)を同定した。そして、冠動脈プラークの血管内腔に占める割合が、血清アディポネクチン濃度と有意な負の相関を示し、逆に血清CCL2濃度とは有意な正の相関を示すことと、CCL2によるMAPキナーゼ活性化を介した単球遊走能をアディポネクチンが直接阻害するという新たな動脈硬化制御機構を明らかにした。また、アディポネクチンはFZDと結合することでWntと競合して動脈硬化惹起性シグナルを減弱させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アディポネクチン結合蛋白として新たにC-C motif chemokine 2 (CCL2)を見出し、狭心症患者において血中CCL2濃度が冠動脈狭窄の程度と有意に相関することを報告した。CCL2は単球を血管に遊走させ動脈硬化を進展させる作用を持つ分子であり、この遊走促進作用をアディポネクチンが阻害するという、新しい動脈硬化抑制機構を明らかにした。またアディポネクチン結合蛋白としてFrizzled (FZD)も見出し、アディポネクチンはFZDと結合することで動脈硬化を抑制することが推察された。

研究成果の概要(英文)：Based on the combination of immunoprecipitation and mass spectrometry analysis of human serum and cultured human cells, we identified C-C motif chemokine 2 (CCL2) and Frizzled (FZD) as novel adiponectin binding proteins.

We found that the percentage of plaque in the coronary culprit lesions was negatively correlated with serum adiponectin levels and positively correlated with serum CCL2 levels, with significance, in male patients with stable angina. The anti-atherogenic property of adiponectin-CCL2 binding was functionally demonstrated by the inhibition of monocyte migration and MAP kinase phosphorylation, and these mechanisms could explain the clinical findings. In addition, we speculated that adiponectin can compete Wnt-mediated pro-atherogenic signals through the direct binding of FZD.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：蛋白質 生体分子 分析科学 細胞・組織 医療・福祉

1. 研究開始当初の背景

急速なスピードで高齢化が進む我が国では、動脈硬化性心血管疾患による死亡はがんと並んで大きな位置を占める。救命されても健康寿命は著しく損なわれる。しかし、心筋梗塞や脳卒中の多くは発症まで自覚症状がないため未然に防ぐことが困難である。従って新しい診断法の開発と、正確な診断に基づく予防と治療の確立が社会的に求められている。

申請者らは、脂肪細胞が分泌するアディポネクチンが動脈硬化防御作用を持つことを発見し、アディポネクチン血中濃度測定法を開発した。臨床研究では低アディポネクチン血症が、糖尿病・高血圧・冠動脈疾患それぞれの独立した危険因子であることを明らかにした。基礎研究ではアディポネクチンが血管壁細胞に対し抗炎症作用を有し、アディポネクチン欠損マウスが高食塩・高血圧・心筋虚血負荷により、それぞれ血圧上昇・心肥大・心筋梗塞巣拡大の表現型を呈すること、それらの表現型はアディポネクチン補充により正常化することを明らかにした。国内外の他のグループからも、低アディポネクチン血症が糖尿病と動脈硬化性疾患の危険因子であることを支持する基礎研究と疫学研究が多数報告されている。そして、内臓脂肪組織特異的な分泌蛋白オメンチンも、アディポネクチンと同様に冠動脈疾患で血中濃度が低下し、血管内皮細胞機能を改善させ、抗動脈硬化作用を有する可能性が高いことを報告した。

アディポネクチン受容体としては、糖代謝に関与する AdipoR1 と AdipoR2、心肥大に関与する T-cadherin が、国内外の他のグループから報告されている。

申請者らは、アディポカイン制御因子 (AKRF) として、カルレティキュリン、シスタチン C、E-selectin Ligand-1 (ESL-1) および Mac2 Binding Protein (M2BP) を同定し、アディポネクチン-カルレティキュリン複合体がマクロファージや血管内皮細胞の炎症反応を調節すること、腎臓病で増加するシスタチン C がアディポネクチンの抗動脈硬化作用を阻害すること、アディポネクチンが ESL-1 を介して動脈硬化を抑制すること、免疫沈抗とウエスタンブロット法により検出したアディポネクチン-M2BP 複合体血中濃度が冠動脈疾患で著明に増加すること、アディポネクチン-シスタチン C 複合体血中濃度が冠動脈プラークの脆弱性と相関することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

健康寿命を延ばすため、動脈硬化性心血管疾患に対する診断法の確立が、社会的に求められている。申請者は、アディポカインが、動脈硬化や代謝異常を防御する機構を一貫して研究し、様々な AKRF を同定して動脈硬化における意義を明らかにしてきた。

本研究は、新規 AKRF を同定し、アディポカインとの複合体測定と動脈硬化発症機序の解明を通して、その臨床的意義を明らかにし、動脈硬化性心血管疾患の新たな診断法開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法による AKRF の探索：

血清あるいはヒト血管壁構成培養細胞の膜分画を、抗アディポカイン抗体を結合させた磁気ビーズを用いて免疫沈降し電気泳動と銀染色を行う。コントロール IgG とコントラストのあるバンドを質量分析し、AKRF 候補とする。候補蛋白の cDNA をタグ付き発現ベクターに挿入し、アディポカイン発現ベクターと共に HEK293 細胞に導入し、抗アディポカイン抗体で免疫沈降し、抗タグ抗体でプロットし結合を確認したものを AKRF とした。

(2) アディポネクチン-AKRF 複合体測定：

複合体の立体構造を認識するモノクローナル抗体を作製する。抗アディポネクチンモノクローナル抗体 (ANOC9121) を固相化抗体として用い、新たに作製したモノクローナル抗体を検出抗体として用いた ELISA を構築し、免疫沈抗とウエスタンブロット法により検出した複合体血中濃度を再現できる ELISA 系を確立する。

(3) AKRF および AKRF-アディポカイン複合体の臨床的意義の検討：

安定狭心症 100 例を目標としてカテーテル検査時に血管内超音波検査を行い、プラークの血管内腔における割合や不安定性を評価し、AKRF および AKRF-アディポカイン複合体との相関を検討する。

(4) AKRF を介した抗動脈硬化作用の解析：

AKRF とタグの融合蛋白を発現するベクターを HEK293 細胞に導入し、培養上清からタグを用いて AKRF 融合蛋白を精製する。精製した AKRF 融合蛋白とリコンビナントアディポカイン

を、炎症性サイトカインの刺激下に培養細胞系に添加し、炎症性シグナルに対するアディポカインと AKRF の作用を解析した。また、この培養細胞系において、AKRF の発現を抑制し、アディポカインの作用を検討する。

4. 研究成果

(1) C-C motif chemokine 2 の同定と機能解析：

血清を ANOC9121 抗体あるいはコントロール IgG で免疫沈降したポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開し、銀染色を行った。ANOC9121 抗体で特異的に免疫沈降されるバンドの質量分析より、単球の血管内皮細胞への遊走に重要な分泌蛋白質である C-C motif chemokine 2 (CCL2) が同定された。

HEK293 細胞にアディポネクチン (APN) と CCL2 各々にタグをつけた融合蛋白を発現させ、一方のタグに対する抗体で免疫沈降し他方のタグに対する抗体で検出する系を用い、両者の結合を確認した。

安定型狭心症男性患者 111 名の血清 APN と CCL2 濃度を測定し、冠動脈プラークの各種指標との関連を検討した。冠動脈プラークの血管内腔に占める割合は、血清アディポネクチン濃度と有意な負の相関を示し、逆に血清 CCL2 濃度とは有意な正の相関を示すことが明らかとなった。

また、ポイデンチャンバーを用いた CCL2 誘導性の単球系細胞の遊走は、APN の存在により有意に減少した。単球系細胞における CCL2 誘導性の MAP キナーゼのリン酸化は、APN の前処理により有意に抑制された。以上より、CCL2 による単球遊走能を APN が直接阻害するという新たな動脈硬化制御機構を明らかにした。

(2) APN-M2BP 複合体測定系の開発：

APN-M2BP 複合体を認識するモノクローナル抗体の作製が困難であった。免疫沈降とウエスタンブロットで半定量する系を用いると、APN-M2BP 複合体は冠動脈疾患 (CAD) 患者において健常人に比し有意に高値であった。しかし、作製したモノクローナル抗体を検出抗体として構築した ELISA 系では、いずれのモノクローナル抗体でも、この変化を検出することが出来なかった。APN と M2BP は、共に高分子多量体を形成することが知られており、動脈硬化の進展に伴って特異的な APN と M2BP の多量体複合体が出現すると推測される。様々なエピトープを認識するモノクローナル抗体を検討したが、この多量体複合体を認識する抗体を得ることが出来なかった。

しかし、この研究を行う過程で、健常人と CAD 患者において血清 M2BP 濃度と各種臨床パラメータとの相関を検討し、健常人では体格指数および収縮期血圧と有意な正相関を、HDL-C 濃度とは有意な負の相関を示すこと、CAD 患者では HDL-C 濃度とのみ有意な負の相関を示すことが明らかになった。

血清 Mac-2BP と HDL-C 濃度が逆相関する機序を、培養肝細胞モデルである HepG2 細胞を用いて検討した。HepG2 細胞に IFN- γ を刺激すると、M2BP の mRNA 量と蛋白量は有意に増加し、HDL の産生に重要な ApoA1 と ABCA1 の mRNA 量と蛋白量は有意に減少した。また、IFN- γ 刺激により PPAR α mRNA は変化しなかったが、PPAR α の下流分子および LXR とその下流分子の mRNA 量は有意に減少した。従って炎症により M2BP が増加し、PPAR と LXR を介して ApoA1 と ABCA1 が負に制御され HDL-C 濃度が減少したと考えられた。

(3) Frizzled (FZD) 同定と機能解析：

ESL-1 と M2BP の APN 結合領域に類似したアミノ酸配列を細胞外領域に持つ膜蛋白質として Frizzled-2 (FZD2) を見出した。APN と FZD2 各々にタグをつけた融合蛋白を共発現させ、一方のタグに対する抗体で免疫沈降し他方のタグに対する抗体で検出する系を用い、両者の結合を確認した。さらに、FZD1-10 を発現させて同様の検討を行うと、FZD6, 8, 9 は他の FZD よりもバンドの強度は低かったが全ての FZD は APN と共沈した。さらに、Wnt の動脈硬化作用に対する APN の影響を培養細胞において検討したところ、Wnt3a および 5a により増加したレポーター活性は、APN により抑制された。従って、APN は FZD と結合して Wnt シグナルを阻害することが示唆された (論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujita Makoto, Yamamoto Hiroyasu, Yoshida Nao, Ono Runa, Matsuoka Tetsuro, Kihara Shinji	4. 巻 28
2. 論文標題 Atheroprotective Roles of Adiponectin via CCL2 Inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1204 ~ 1213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.58875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uekita Hiromi, Yamamoto Hiroyasu, Niinaga Ryu, Yamane Noriko, Yoshii Manami, Yamauchi-Takahara Keiko, Kihara Shinji	4. 巻 516
2. 論文標題 Reciprocal association of serum Mac-2 binding protein and HDL-cholesterol concentrations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 142 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2021.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinji Kihara
2. 発表標題 Adiponectin in metabolic syndrome and related disorders
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田まこと, 山本浩靖, 吉田奈央, 松岡哲郎, 木原進士
2. 発表標題 ケモカインCCL2とアディポネクチンの冠動脈プラークにおける意義
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田陽, 山本浩靖, 日野里衣子, 木原進士
2. 発表標題 アディポネクチンのWntシグナル抑制作用機序の検討
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木原進士
2. 発表標題 メタボリックシンドロームとアディポネクチン
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会 医学系学会との合同シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 鎌松由佳, 山本浩靖, 二位永竜, 松岡哲郎, 木原進士
2. 発表標題 冠動脈疾患とHDL代謝におけるMac-2BPの意義
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 浩靖 (Yamamoto Hiroyasu) (00631201)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------