

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17083

研究課題名（和文）動脈硬化に関するレジスチン様分子の役割の解析

研究課題名（英文）Role of Resistin-like Molecule in atherosclerosis

研究代表者

岸本 真治（Kishimoto, Shinji）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：30820667

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マクロファージにおいて飽和脂肪酸負荷や炎症刺激にて、RELM の発現が増加すること、脂肪細胞の泡沫細胞化、炎症惹起や血管増殖等によって動脈硬化を発症・進展させることが明らかになっているが、今回の我々の研究結果からRELM は、AMPKの発現低下、AMPKのリン酸化、Hsp90の発現低下により、eNOSのセリン117でのリン酸化を抑制し、内皮細胞でのNO産生を減少させた。RELM は、内皮機能障害を介して動脈硬化に寄与している可能性がある。RELM は、心血管疾患の治療ターゲットとなりうる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージにおいて飽和脂肪酸負荷や炎症刺激にて、RELM の発現が増加すること、脂肪細胞の泡沫細胞化、炎症惹起や血管増殖等によって動脈硬化を発症・進展させることが明らかになっているが、RELM と血管内皮機能の関係は明らかではなかった。本研究で、RELM が血管内皮機能を介した動脈硬化に関与していることが明らかになった。血管内皮機能障害は動脈硬化の第一段階と言われており、血中RELM 濃度が動脈硬化の早期発見につながる可能性や、治療ターゲットになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：RELM suppressed phosphorylation of eNOS on serine 117 by decreased expression of AMPK and phosphorylation of AMPK and decreased expression of Hsp90, and reduced production of NO in endothelial cells. RELM may contribute to atherosclerosis via endothelial dysfunction. RELM may be potential therapeutic targets for cardiovascular diseases.

研究分野：循環器内科

キーワード：レジスチン様分子 血管内皮機能

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞、脳血管障害などの心血管疾患は、日本人の死因の約 25%を占め、その罹患人口は増加している。心血管疾患は一度発症すると、生命予後を悪くするばかりでなく、ADL を著しく損ねる。そのため、心血管疾患の早期発見と早期からの予防は非常に重要である。血管内皮機能障害は動脈硬化の第一段階であり、その発症・維持進展に重要な役割を果たしている。これまでも、薬物療法、生活習慣の改善や補充療法などの適切なインターベンションにより血管内皮機能が改善可能であることが確認されている。そのため、血管内皮機能にかかわる pathway や血中バイオマーカーの探索は早期発見、治療の側面から非常に重要である。

レジスチンはインスリン抵抗性を来す脂肪細胞由来の物質として発見され、2 型糖尿病、うっ血性心不全、冠動脈疾患と関連している。レジスチンの関連タンパクとして resistin-like molecule (RELM) 、 、 がマウスで発見され、そのうち RELM のみが人で存在することが確認されており、動物実験モデルにおいてインスリン抵抗性に関連することも知られている (Rajala MW, et al. J Clin Invest. 111: 225-230, 2003)。我々は共同研究グループとともに、マクロファージにおいて飽和脂肪酸負荷や炎症刺激にて、RELM の発現が増加すること、脂肪細胞の泡沫細胞化、炎症惹起や血管増殖等によって動脈硬化を発症・進展させることを明らかにした (Akifumi Kushiya, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 33(8):1986-1993, 2013)。さらに、preliminary 研究において、健常マウスに RELM を投与することで、あるいは RELM 過剰発現マウスでは血管抵抗が上昇し、血管収縮性が強まることを確認した。血管内皮機能障害は動脈硬化の第一段階とされているが、RELM が動脈硬化を進展させるメカニズムの一つとして血管内皮機能障害を惹起させるか否かは明らかでない。

2. 研究の目的

RELM が動脈硬化を惹起するメカニズムとして、動脈硬化の発症・維持・進展に重要な役割をはたしている血管内皮機能との関連は明らかでない。本研究では、RELM が血管内皮細胞、特に eNOS/NO pathway に及ぼす影響に関して検討する。RELM の役割を解明することで、動脈硬化発症の一端を明らかにする。合わせて、血中 RELM 濃度測定が血管内皮機能のバイオマーカー、心血管イベントの予測因子となり得る可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 内皮細胞における eNOS/NO pathway の検討

RELM が、eNOS リン酸化の抑制に関与しているかどうかを検討する。HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) 及び EOMA cell (マウス血管内皮由来細胞系列) に RELM を添加し、インスリンの存在下、非存在下で NO の産生量の定量を行う。HUVEC を 10cm dish に播種し、サブコンフルエントにした後に、RELM を添加後、経時的な eNOS 及び P-eNOS さらに、各タンパクの発現量を Western blot 法を用いて検討する。RELM を添加することで、経時的に NO の産生が低下、eNOS、P-eNOS の低下が予想される。

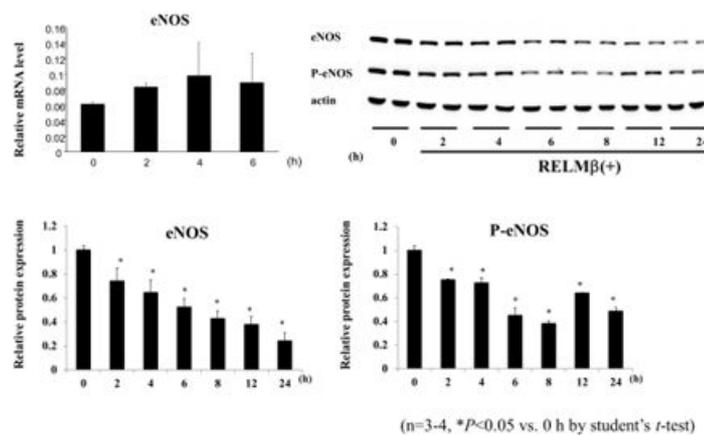
(2) マウス大動脈の NO 依存性内皮弛緩反応の観察

大動脈リング (大動脈輪状標本) のアセチルコリンに対する弛緩反応を観察することで、血管内皮機能を評価する。8~12 週齢のマウス胸部大動脈を単離し、野生型マウスと RELM ノックアウト

トマウスそれぞれから大動脈リングを作成する。混合ガスを通気した Krebs-Henseleit 液で満たした organ bath に大動脈リングを懸垂する。張力を調整後、phenylephrine で収縮させ、アセチルコリンの段階的投与を行い張力の変化を記録することで血管内皮機能を評価する。野生型マウス大動脈リング、RELM ノックアウトマウス大動脈リング、compound C で前処置した RELM ノックアウトマウス大動脈リング、L-NAME (NOS 阻害剤) で前処置した RELM ノックアウトマウス大動脈リングそれぞれのアセチルコリンに対する張力変化を比較検討する。また、血管内皮非依存性反応に差がないことを確認する目的で、野生型マウス大動脈リング、RELM ノックアウトマウス大動脈リングで、sodium nitroprusside に対する張力変化も測定する。

4. 研究成果

RELM が、eNOS リン酸化の抑制に関与しているか検討した。HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) 及び EOMA cell (マウス血管内皮由来細胞系列) に RELM を添加し、インスリンの存在下、非存在下で NO の産生量の定量測定を行った。HUVEC および EOMA cell で RELM の與良依存的に NO の低下が認められた。HUVEC を 10cm dish に播種し、サブコンフルエントにした後に、RELM を添加後、経時的な eNOS 及び P-eNOS さらに、各タンパクの発現量を Westan blot 法を用いて検討した。RELM を添加することで、経時的に NO の産生が低下、eNOS、P-eNOS の低下が認められた。RELM は、AMPK の発現低下、AMPK のリン酸化、Hsp90 の発現低下により、eNOS のセリン 117 でのリン酸化を抑制し、内皮細胞での NO 産生を減少させた。RELM は、内皮機能障害を介して動脈硬化に寄与している可能性がある。



マウス大動脈の NO 依存性内皮弛緩反応に関しては、RELM ノックアウトマウスの数の確保に時間がかかり、現在実験継続中である、上記結果とともに論文投稿予定である。

マクロファージにおいて飽和脂肪酸負荷や炎症刺激にて、RELM の発現が増加すること、脂肪細胞の泡沫細胞化、炎症惹起や血管増殖等によって動脈硬化を発症・進展させることが明らかになっているが、今回の我々の研究結果から、RELM が eNOS/NO pathway を介した血管内皮機能の低下をきたしていることを示せた。血管内皮機能障害は動脈硬化の第一段階と言われているが、RELM が動脈硬化を進展させるメカニズムの一つとして考えられ、心血管イベントの予測因子になる可能性がある。そのため、現在血中 RELM 濃度測定が血管内皮機能のバイオマーカー、心血管イベントの予測因子になりえるか引き続き解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kishimoto Shinji, Oda Nozomu, Maruhashi Tatsuya, Tanigawa Shunsuke, Mizobuchi Aya, Yusoff Farina Mohamad, Fujita Asuka, Uchiki Toshio, Kajikawa Masato, Yoshimura Kenichi, Yamaji Takayuki, Harada Takahiro, Hashimoto Yu, Nakano Yukiko, Hirota Seiko, Yoshinaga Shinji, Goto Chikara, Nakashima Ayumu, Higashi Yukihito | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Effect of exposure to radiation caused by an atomic bomb on endothelial function in atomic bomb survivors | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine | 6. 最初と最後の頁 1122794 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2023.1122794 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Maruhashi Tatsuya, Kajikawa Masato, Kishimoto Shinji, Yamaji Takayuki, Harada Takahiro, Hashimoto Yu, Mizobuchi Aya, Tanigawa Shunsuke, Yusoff Farina Mohamad, Nakano Yukiko, Chayama Kazuaki, Nakashima Ayumu, Goto Chikara, Yoshimura Kenichi, Higashi Yukihito | 4. 巻 360 |
| 2. 論文標題 The prevalence of cardiovascular disease is higher in patients with bilateral low ankle-brachial index than in patients with unilateral low ankle-brachial index | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Atherosclerosis | 6. 最初と最後の頁 8~14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2022.09.012 | 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 Yamaji Takayuki, Harada Takahiro, Hashimoto Yu, Nakano Yukiko, Kajikawa Masato, Yoshimura Kenichi, Goto Chikara, Mizobuchi Aya, Tanigawa Shunsuke, Yusoff Farina Mohamad, Kishimoto Shinji, Maruhashi Tatsuya, Nakashima Ayumu, Higashi Yukihito | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Relationship of Daily Coffee Intake with Vascular Function in Patients with Hypertension | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nutrients | 6. 最初と最後の頁 2719~2719 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14132719 | 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 Kishimoto Shinji, Maruhashi Tatsuya, Kajikawa Masato, Harada Takahiro, Yamaji Takayuki, Han Yiming, Mizobuchi Aya, Hashimoto Yu, Yoshimura Kenichi, Nakano Yukiko, Chayama Kazuaki, Goto Chikara, Yusoff Farina Mohamad, Nakashima Ayumu, Higashi Yukihiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 White blood cell count is not associated with flow-mediated vasodilation or nitroglycerine-induced vasodilation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 8201 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12205-5 | 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 Yamaji Takayuki, Harada Takahiro, Hashimoto Yu, Nakano Yukiko, Kajikawa Masato, Yoshimura Kenichi, Chayama Kazuaki, Goto Chikara, Han Yiming, Mizobuchi Aya, Yusoff Farina Mohamad, Kishimoto Shinji, Maruhashi Tatsuya, Nakashima Ayumu, Higashi Yukihiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Self-reported total sitting time on a non-working day is associated with blunted flow-mediated vasodilation and blunted nitroglycerine-induced vasodilation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 6366 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10242-8 | 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 Yusoff Farina Mohamad, Nakashima Ayumu, Kawano Ki-ichiro, Kajikawa Masato, Kishimoto Shinji, Maruhashi Tatsuya, Ishiuchi Naoki, Abdul Wahid S. Fadilah S., Higashi Yukihiro | 4. 巻 2022 |
| 2. 論文標題 Implantation of Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell Advances Therapeutic Angiogenesis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells International | 6. 最初と最後の頁 1~14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2022/6795274 | 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 Kishimoto Shinji, Maruhashi Tatsuya, Kajikawa Masato, Harada Takahiro, Yamaji Takayuki, Han Yiming, Mizobuchi Aya, Hashimoto Yu, Yoshimura Kenichi, Nakano Yukiko, Chayama Kazuaki, Goto Chikara, Yusoff Farina Mohamad, Nakashima Ayumu, Higashi Yukihiro | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Vascular Dysfunction Predicts Future Deterioration of Left Ventricular Ejection Fraction in Patients with Heart Failure with Mildly Reduced Ejection Fraction | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine | 6. 最初と最後の頁 5980~5980 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10245980 | 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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shinji Kishimoto, Yukihiro Higashi, Yu Hashimoto, Takahiro Harada, Farina Mohamad Yusoff, Masato Kajikawa, Tatsuya Maruhashi, Yukiko Nakano |
| 2. 発表標題 Comparison of Adrenalectomy and Treatment with Eplerenone on Vascular Function in Patients with Aldosterone-producing Adenoma |
| 3. 学会等名 The 87th Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation Society : JCS 2023 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岸本真治, 丸橋達也, 梶川正人, 原田崇弘, 溝淵亜矢, 橋本悠, Farina Mohamad Yusoff, 中野由紀子, 東幸仁 |
| 2. 発表標題 血管機能はHFmrEFの心機能低下を予測しうる |
| 3. 学会等名 第70回日本心臓病学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shinji Kishimoto, Yukihiro Higashi, Yu Hashimoto, Takahiro Harada, Farina Mohamad Yusoff, Masato Kajikawa, Tatsuya Maruhashi, Yukiko Nakano |
| 2. 発表標題 A Comparison of the Effects of Adrenalectomy and Treatment with Eplerenone on Vascular Function in Patients with Aldosterone-producing Adenoma |
| 3. 学会等名 International Society of Hypertension 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岸本真治, 丸橋達也, 梶川正人, 原田崇弘, 溝淵亜矢, 橋本悠, Farina Mohamad Yusoff, 中野由紀子, 東幸仁 |
| 2. 発表標題 Hematocrit is Associated with Vascular Function and Vascular Structure in Men |
| 3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会、第21回日本NO学会 合同学術集会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|