

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 4月 9日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592303

研究課題名（和文）PPARガンマKOマウスを用いた敗血症モデル毛細血管内皮細胞の果たす役割の検討

研究課題名（英文）A role of capillary endothelial cells in pathophysiology of sepsis; basic study by using endothelial-specific PPAR γ knockout mice

研究代表者

國元 文生 (KUNIMOTO FUMIO)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：70125847

研究成果の概要（和文）：

敗血症の際のインスリン抵抗性や代謝不全は、毛細血管機能不全が一因を担うと考えた。代謝制御因子 PPAR γ は毛細血管内皮細胞に豊富に発現し、標的遺伝子である FABP4・FAT/CD36 を誘導する。PPAR γ の血管内皮特異的ノックアウトマウスを用いた敗血症モデルでは、野生型と比較して生命予後に差異を認めなかった。FABP4/5 ダブルノックアウトマウスを用いた敗血症モデルでは、野生型と比較して生命予後が改善した。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that insulin-resistance and metabolic failure under sepsis could be attributable to capillary-endothelial failure. We found that PPAR γ , a nuclear receptor for metabolic regulation, is abundantly expressed in capillary endothelial cells and induces its target genes such as FABP4 and FAT/CD36. However, there was no significant difference regarding survival rate between wild type and PPAR γ -endothelial knockout mice after LPS treatment, or sepsis model. In contrast, survival rate of FABP4/5 double knockout mice was higher than wild type after LPS treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：集中治療医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症、毛細血管内皮細胞、脂肪酸代謝、糖代謝、心機能、PPAR γ 、FABP4、FABP5

1. 研究開始当初の背景

敗血症や大手術後患者などの大侵襲患者に強いインスリン抵抗性が惹起される。近年、重症患者の有病率や予後を改善するとの考えのもとにインスリン療法が施行される。し

かし集中治療部には大量のインスリン投与を必要とする患者が少なからず存在し、このような患者では、血糖値の日内変動が大きくなるばかりか、低血糖の危険が増す。PPAR γ 活性化には血糖値安定化作用があり、インス

リン使用量を減少させることができてだけでなく、抗炎症作用、血管内皮細胞保護作用、微小循環改善作用などにより重症患者の予後を改善する可能性がある。申請者は当時、PPAR γ が毛細血管内皮細胞にも豊富に発現している事実をつきとめ、その標的遺伝子として知られる輸送蛋白 FABP4 (fatty acid binding protein4), FAT/CD36 (fatty acid translocase), や FABP4 の類似タンパクである FABP5 も毛細血管内皮細胞に豊富に発現していることを見出した。毛細血管内皮細胞の大きな役割は、筋細胞や脂肪細胞にエネルギー基質を供給することにある。以上より、敗血症の際に毛細血管内皮の機能不全が生じ、それにより臓器のエネルギー代謝不全を起し、臓器不全の一端を担うのではないかと考えた。また、PPAR γ の活性化により、毛細血管内皮の機能不全や臓器のエネルギー代謝不全を改善しうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 毛細血管に発現する FABP4, FAT/CD36 が in vivo において PPAR γ の標的因子か否かを PPAR γ の血管内皮特異的ノックアウトマウス (PG-E null マウス) を用いて検討する。

(2) 毛細血管内皮細胞に発現する PPAR γ が、いかに重症敗血症の進展に関与するかを PG-E null マウスを用いて検討する。

(3) 毛細血管内皮細胞に発現する FABP4 と FABP5 が、いかに重症敗血症の進展に関与するかを FABP4/5 ダブルノックアウトマウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) PG-E null マウスと野生型マウスに合成 PPAR γ リガンドのピオグリタゾン (25 mg/kg/day) を 2 週間投与した。また、PPAR γ は俊約遺伝子として絶食時に活性化することが知られているため、24 時間、48 時間絶食負荷を行った。これらのマウスの心臓毛細血管における FABP4, FAT/CD36 の発現を RT-PCR 法と免疫染色にて評価した。

(2) 毛細血管内皮細胞に発現する PPAR γ が、いかに重症敗血症の進展に関与するか否かを PG-E null マウスと野生型マウスにリポポリサッカライド (LPS) を腹腔内投与し検討した。異なる 6 つの濃度で LPS を腹腔内に投与し (range: 100 - 1600 \cdot g/animal)、各群でのマウス死亡率を比較した。

(3) 毛細血管内皮細胞に発現する FABP4 と FABP5 が、いかに重症敗血症の進展に関与するかを FABP4/5 ダブルノックアウトマウスと野生型マウスに LPS (14mg/kg) を腹腔内投与し検討した。

4. 研究成果

(1) 野性型マウスではピオグリタゾン投与により毛細血管内皮細胞の FABP4 が増加したが、PG-E null マウスでは増加がみられなかった。絶食負荷でも FABP4, FAT/CD36 が増加したが PG-E null マウスでは増加が見られなにかあるいは微増だった。以上より、毛細血管内皮細胞に発現する FABP4, FAT/CD36 は、PPAR γ により転写調節を受け誘導されることが in vivo で明らかになった。

(2) 異なる 6 つの濃度の LPS 投与により作製した敗血症モデルでは、野生型と内皮特異的 PPAR γ ノックアウトマウスで、生存率に有意差を認めなかった。これは、内皮特異的 PPAR γ ノックアウトマウスにおいて、糖代謝・脂質代謝が野生型のマウスと、ほぼ同等であるためと考えた。

(3) 次の可能性として、心臓での糖代謝が劇的に増加し脂質代謝が減少する FABP4/5 ダブルノックアウトマウスを用いて、内皮細胞を介するエネルギー代謝の変化が、敗血症の生命予後や心機能に影響を及ぼすかどうか検討した。LPS 投与後の生存率は、FABP4/5 ダブルノックアウトマウスにおいて野生型より明らかに良好で、心機能の低下も抑制された。NO 産生や炎症性サイトカインのレベルの違いを認めなかったため、心筋の糖代謝が優位になったことが心機能の低下が軽減した理由のひとつであると考えている。これらの結果から、心筋のエネルギー基質を脂肪酸より糖有意にすることが敗血症時の心機能の維持に有効である可能性があることと、敗血症時にインスリン療法が有効である理由のひとつに心臓での糖代謝改善作用がある可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Matsui H, Yokoyama T, Sekiguchi K, Iijima D, Sunaga H, Maniwa M, Ueno M, Iso T, Arai M, Kurabayashi M. Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) Augments Saturated Fatty Acid-Induced Lipid Accumulation and Inhibits Apoptosis in Cardiac Myocytes. PLoS One. 2012;7(3):e33283. 査読有

2. Nakajima T, Kaneko Y, Irie T, Takahashi R, Kato T, Iijima T, Iso T, Kurabayashi M. Compound and digenic heterozygosity in desmosome genes as a cause of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in Japanese patients. Circ J. 2012 Feb 24;76(3):737-43. 査読有

3. Nakajima T, Kaneko Y, Fukuda N, Irie T, Iso T, Kurabayashi M. Marked lipomatous hypertrophy of the right ventricular wall: a distinct clinicopathological entity from arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy? *Int J Cardiol.* 2012 Feb 9;154(3):379-80. 査読有
4. Runx2/Smad3 complex negatively regulates TGF- β -induced connective tissue growth factor gene expression in vascular smooth muscle cells. Ohyama Y, Tanaka T, Shimizu T, Matsui H, Sato H, Koitabashi N, Doi H, Iso T, Arai M, Kurabayashi M. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(1):23-35. 査読有
5. 磯達也、倉林正彦、筋型毛細血管内皮細胞を介する脂肪酸代謝のメカニズム、医学のあゆみ 2011; 238; 198-199. 査読無
6. 磯達也、倉林正彦、筋型毛細血管内皮細胞を介する脂肪酸代謝のメカニズム Therapeutic Research 2011; 32; 739-743. 査読無
7. Aoyagi-Ikeda K, Maeno T, Matsui H, Ueno M, Hara K, Aoki Y, Aoki F, Shimizu T, Doi H, Kawai-Kowase K, Iso T, Suga T, Arai M, Kurabayashi M. Notch Induces Myofibroblast Differentiation of Alveolar Epithelial Cells via TGF β /Smad3 Pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 Jul;45(1):136-44. 査読有
8. Suga T, Iso T, Shimizu T, Tanaka T, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Kurabayashi M. Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.* 2011 Aug 24;18(8):670-83. 査読有
9. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Matsui H, Ooyama Y, Kawai-Kowase K, Arai M, Kurabayashi M. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2011 May 27;286(21):19138-48. 査読有
10. Nakajima T, Kaneko Y, Saito A, Irie T, Tange S, Iso T, Kurabayashi M. Identification of Six Novel SCN5A Mutations in Japanese Patients with Brugada Syndrome. *Int Heart J.* 2011;52(1):27-31. 査読有
11. Nakajima T, Kaneko Y, Saito A, Irie T, Kato T, Iso T, Kurabayashi M. Post myocardial ischemia-associated torsades de pointes in a patient carrying a KCNQ1 G643S variant. *Intern Med.* 2010;49(23):2587-91. Epub 2010 Dec 1. 査読有
12. Yoshiaki Ohyama, Tatsuya Iso, Adriana Carolina Vargas Nino, Masaru Obokata, Rieko Takahashi, Wataru Okumura, Akihiko Nakano, Masao Amano, Isao Naito, Masamitsu Takatama, Masahiko Kurabayashi. Multiple Spontaneous Coronary Artery Ruptures and Cardiac Tamponade in Vascular Ehlers-Danlos Syndrome. *Journal of Cardiology Cases* 2010; 3: e29-e32. 査読有. *Journal of Cardiology Case Report Award* 2011
13. Nakajima T, Kaneko Y, Manita M, Iso T, Kurabayashi M. Aborted cardiac arrest in a patient carrying KCNE1 D85N variant during the postpartum period. *Intern Med.* 2010;49(17):1875-8. 査読有
14. Nakahara T, Sato H, Shimizu T, Tanaka T, Matsui H, Kawai-Kowase K, Sato M, Iso T, Arai M, Kurabayashi M. Fibroblast Growth Factor 2 Induces Osteogenic Differentiation through a Runx2 Activation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(2):243-8. 査読有
15. Wada M, Iso T, Asztalos BF, Takama N, Nakajima T, Seta Y, Kaneko K, Taniguchi Y, Kobayashi H, Nakajima K, Schaefer EJ, Kurabayashi M. Marked high density lipoprotein deficiency due to apolipoprotein A-I Tomioka (codon 138 deletion). *Atherosclerosis.* 2009; 207(1): 157-161. 査読有
16. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Doi H, Sato H, Kawai-Kowase K, Arai M, Kurabayashi M. Notch signaling induces osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells: role of Msx2 gene induction via Notch-RBP-Jk signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; Jul;29(7):1104-11. 査読有
17. Doi H, Iso T, Shiba Y, Sato H, Yamazaki M, Oyama Y, Akiyama H, Tanaka T, Tomita T,

Arai M, Takahashi M, Ikeda U, Kurabayashi M. Notch signaling regulates the differentiation of bone marrow-derived cells into smooth muscle-like cells during arterial lesion formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 381: 654-659. 査読有

[学会発表] (計 2 3 件)

1. Takehiro Nakahara, Nogiku Niwamae, Norimichi Koitabashi, Ryoutarou Seki, Tadashi Nakajima, Tatsuya Iso, Yuichiro Saitoh, Yoshiaki Kaneko, Masashi Arai, Yoshito Tsushima, Masahiko Kurabayashi. "Replacement Injection" Methods can Reliably Visualize the Right Heart. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2012. 3. 18.

2. Kosaku Goto, Tatsuya Iso, Hirofumi Hanaoka, Aiko Yamaguchi, Toshihiro Suga, Hiroki Matsui, Masashi Arai, Keigo Endo, Frank Gonzalez, Masahiko Kurabayashi. PPAR γ Expressed in Capillary Endothelial Cells Regulates Trans-endothelial Fatty Acid Transport in the Heart via an Induction of FABP4. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2012. 3. 17.

3. Tadashi Nakajima, Yoshiaki Kaneko, Tadanobu Irie, Rieko Takahashi, Toshimitsu Kato, Takafumi Iijima, Tatsuya Iso, Masahiko Kurabayashi. Compound and Digenic Heterozygosity in Desmosome Genes as a Cause of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in Japanese Patients. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2012. 3. 17.

4. Tatsuya Iso, Naoto Yajima, Kyosuke Takeshita, Hiroki Matsui, Kosaku Goto, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi. Fatty Acid Binding Protein 4 is induced by Notch Signaling via Induction of PPAR γ in Capillary Endothelial Cells in Heart. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2012. 3. 17.

5. Kosaku Goto, Tatsuya Iso, Akinari Hattori, Naoto Yajima, Hiroki Matsui, Tomoyuki Yokoyama, Masashi Arai, Masahiko

Kurabayashi. Fatty Acid Translocase (FAT/CD36) is Transcriptionally Regulated by PPAR γ in Capillary Endothelial Cells in Heart. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2012. 3. 17.

6. Hiroaki Sunaga, Hiroki Matsui, Tatsuya Iso, Masahiko Kurabayashi, Tomoyuki Yokoyama. Long-Chain Fatty Acid Elongase, Elovl6, is Crucial for Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Underlying Neointimal Hyperplasia. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2012. 3. 16.

7. Tatsuya Iso, Kazuhisa Maeda, Kosaku Goto, Hiroki Matsui, Masashi Arai, Gökhan S. Hotamisligil, Masahiko Kurabayashi. Physiological cardiac hypertrophy is evoked by markedly increased glucose consumption and insulin signaling in mice lacking both fatty acid binding protein 4 and -5. Annual meeting of American Heart Association, Orland, USA, 2011. 11. 14

8. Tatsuya Iso, Yasunori Irie, Yuji Shinagawa, Hiroki Matsui, Kosaku Goto, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi. Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Alpha (PPAR α) Regulates Trans-endothelial Fatty Acid Transport in Capillary Endothelial Cells; Functional Similarity between PPAR α and PPAR γ . Annual meeting of American Heart Association, Orland, USA, 2011. 11. 14

9. Kosaku Goto, Tatsuya Iso, Hirofumi Hanaoka, Toshihiro Suga, Hiroki Matsui, Masashi Arai, Keigo Endo, Frank J Gonzalez, Masahiko Kurabayashi. Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Regulates Trans-endothelial Fatty Acid Transport via Induction of Fatty Acid Binding Protein 4 and Fatty Acid Translocase in Capillary Endothelial Cells in Heart and Adipose Tissue. Annual meeting of American Heart Association, Chicago, USA, 2010. 11. 17

10. Shimizu T., Tanaka T., Iso T., Kurabayashi M. Notch signaling enhances BMP2-induced osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells and vascular calcification. XXth World Congress International Society for Heart Research (ISHR), Kyoto, 2010. 5. 16

11. Matsui H., Yokoyama T., Iijima D., Maniwa M., Iso T., Arai M., Kurabayashi M. Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in obese and diabetic heart plays a protective role against fatty acid-induced cardiac dysfunction. XXth World Congress International Society for Heart Research (ISHR), Kyoto, 2010.5.16
12. Goto K., Iso T., Suga T., Matsui H., Arai M., Kurabayashi M. Notch-peroxisome proliferator activated receptor-gamma2 pathway regulates transendothelial fatty acid transport in capillary endothelial cells in heart. XXth World Congress International Society for Heart Research (ISHR), Kyoto, 2010.5.16
13. Haque A., Iso T., Kunimoto F., Saito S., Kurabayashi M. A possible role of transendothelial glycerol transport through aquaporin 7 regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma. XXth World Congress International Society for Heart Research (ISHR), Kyoto, 2010.5.16
14. Iso T., Maeda K., Hanaoka H., Suga T., Matsui H., Goto K., Arai M., Endo K., Gokhan H., Kurabayashi M. Muscle-type capillary endothelial cells actively transport fatty acids via intracellular fatty acid binding protein-4 and -5. XXth World Congress International Society for Heart Research (ISHR), Kyoto, 2010.5.14
15. Nakahara T., Shimizu T., Tanaka T., Kowase K., Iso T., Arai M., Kurabayashi M. Runx2 suppresses atrial and B-type natriuretic peptide gene expression in rat cardiac myocytes. XXth World Congress International Society for Heart Research (ISHR), Kyoto, 2010.5.13
16. Matsui H., Yokoyama T., Gotoh Y., Iso T., Arai M., Kurabayashi M. Stearoyl-CoA desaturase-1 has a protective effect against saturated fatty acids-induced osteogenic differentiation and apoptosis in vascular smooth muscle cells. XXth World Congress International Society for Heart Research (ISHR), Kyoto, 2010.5.13
17. Yoshiaki Oyama, Toru Tanaka, Takehisa Shimizu, Hiroko Sato, Norimichi Koitabashi, Hiroshi Doi, Tatsuya Iso, Masashi Arai, Masahiko Kurabayashi. Runx2 Inhibits TGF β -induced Connective Tissue Growth Factor Gene Expression Through Physical Association with Smad3 in Vascular Smooth Muscle Cells. Annual meeting of American Heart Association, Orland, USA, 2009.11.18
18. Kosaku Goto, Tatsuya Iso, Toshihiro Suga, Hiroki Matsui, Masashi Arai, Frank J Gonzalez, Masahiko Kurabayashi. Notch-Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma2 Pathway Regulates Transendothelial Fatty Acid Transport via Induction of Fatty Acid Binding Protein 4 and Fatty Acid Translocase in Capillary Endothelial Cells in Heart. Annual meeting of American Heart Association, Orland, USA, 2009.11.17
19. Takehisa Shimizu, Toru Tanaka, Tatsuya Iso, Keiko Kawai-Kowase, Masahiko Kurabayashi. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) and BMP-7 Act as Instructive Factors to Specify Notch Signaling Controlling Smooth Muscle Cell Phenotype. Annual meeting of American Heart Association, Orland, USA, 2009.11.17
20. Tatsuya Iso, Kazuhisa Maeda, Hirofumi Hanaoka, Toshihiro Suga, Hiroki Matsui, Kosaku Goto, Masashi Arai, Keigo Endo, Gokhan Hotamisligil, Masahiko Kurabayashi. Muscle-Type Capillary Endothelial Cells Actively Transport Fatty Acids via Intracellular Fatty Acid Binding Protein-4 and -5. Annual meeting of American Heart Association, Orland, USA, 2009.11.16
21. Hiroki Matsui, Tomoyuki Yokoyama, Daisuke Iijima, Kenichi Sekiguchi, Tatsuya Iso, Masahi Arai, Masahiko Kurabayashi. Increased Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression in Obese and Diabetic Heart Plays a Protective Role Against Fatty Acid-Induced Cardiac Dysfunction. Annual meeting of American Heart Association, Orland, USA, 2009.11.16
22. Toshihiro Suga, Tatsuya Iso, Takehisa Shimizu, Toru Tanaka, Sho-ichi Yamagishi, Masashi Arai, Tsutomu Imaizumi, Masahiko Kurabayashi. Serum RAGE ligands induce osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells via RAGE-Notch-Msx2 pathway. 10th international symposium on mechanism of vasodilatation, Matsushima, Japan, 2009.6.1

23. Tatsuya Iso, Hiroki Matsui, Toshihiro Suga, Toru Tanaka, Masashi Arai, Masahiko Kurabayashi. Capillary-Specific Expression of FABP4 and FABP5 (Fatty Acid Binding Proteins): A Possible Role of Fatty Acid Transport through Capillary Endothelium. 10th international symposium on mechanism of vasodilatation, Matsushima, Japan, 2009. 6. 1

〔図書〕（計2件）

1. 磯達也、第4章 シグナル伝達「Notchシグナル」、血管生物医学事典（朝倉書店）、2011；266-268

2. 磯達也、第5章 転写因子「Hey」、血管生物医学事典（朝倉書店）、2011；399-400

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國元 文生 (KUNIMOTO FUMIO)
群馬大学・医学部・准教授
研究者番号：70125847

(2) 研究分担者

磯 達也 (TATSUYA ISO)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：10400756