

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590978

研究課題名（和文） アディポネクチン結合蛋白を介した血管代謝機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of adiponectin binding proteins on vascular metabolism.

研究代表者

木原 進士 (KIHARA SHINJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20332736

研究成果の概要（和文）：

アディポネクチンの結合蛋白質としてシスタチンCを同定した。またアディポネクチンがマクロファージにおいてVascular Endothelial Growth Factor-Cを制御していることを明らかにした。シスタチンCは、血管内皮細胞においてアディポネクチンによる抗炎症作用を阻害し、アディポネクチンの血中からのクリアランスを抑制した。腎不全例において血中アディポネクチン濃度は高値であるにもかかわらず動脈硬化が進行する機序として、腎不全で増加するシスタチンCがアディポネクチンと結合して血管代謝機構を障害することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Cystatin C was identified as an adiponectin binding protein. In macrophage, adiponectin regulated vascular endothelial growth factor-C. In vascular endothelial cell culture, cystatin C abrogated the anti-inflammatory effects of adiponectin. The clearance rate of adiponectin was decreased by cystatin C in mouse model. Although adiponectin has anti-atherogenic properties, hyper-adiponectinemia in renal failure is associated with increased risk of atherosclerosis. The present findings suggest that the high cystatin C level of renal failure impaired vascular metabolism through the direct binding with adiponectin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：(1) 内科 (2) 脂質 (3) 蛋白質 (4) 細胞・組織 (5) 生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは内臓脂肪過剰蓄積による心血管疾患発症の基盤となる病態である。研究代表者らのグループはCT スキャンによる内臓脂肪評価法を確立し、ヒト内臓脂肪組織発現遺伝子解析からアディポネクチンを発見した。

研究代表者は世界に先駆けてアディポネクチン血中濃度測定法を開発し、肥満により血中濃度が低下すること、アディポネクチンが動脈硬化防御因子として作用することを発見した。そして、アディポネクチンが血管壁を構成する内皮細胞・平滑筋細胞・マクロファージに対して炎症抑制作用を有すること、低アディポネクチン血症が糖尿病・高血圧・冠動脈疾患の独立した危険因子であること、アディポネクチン遺伝子変異が肥満と関係なくメタボリックシンドロームの表現型を取ることを明らかにした。さらに科学研究費特定領域アディポミクスの計画班として、アディポネクチン欠損と補充による病態解析を行った。欠損マウスに高食塩・高血圧・心筋虚血・アンジオテンシン投与・コリン欠乏・糸球体過剰濾過の負荷をかけることでそれぞれ、高血圧・心肥大・心筋梗塞巣拡大・心線維化・脂肪肝炎・アルブミン尿増加の表現型を呈し、これらの異常はアディポネクチン補充により全て正常化した。

従って、低アディポネクチン血症はメタボリックシンドロームに関連する様々な病態の原因となり、アディポネクチンの制御機構の解明が治療につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

研究代表者らはアディポネクチンが動脈硬化抑制作用を有し、内臓脂肪蓄積によって血中濃度が低下し、アディポネクチンが傷害組織に集積して臓器保護に働くことを明らかにしてきた。また、既にアディポネクチンの結合蛋白としてカルレティキュリンを同定し、アディポネクチンとカルレティキュリンの複合体がアポトーシス細胞除去に関与することを報告した。アディポネクチンの受容体として AdipoR1、AdipoR2、T-カドヘリンなどが知られているが、動脈硬化に対する作用は十分には解明されておらず、未知の結合蛋白質や受容体を介する可能性が考えられる。

本研究では、アディポネクチンの新規結合蛋白を同定し、血管代謝を介した新たな動脈硬化抑制機構、臓器の異常リモデリング抑制機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) リコンビナントアディポネクチン作成：  
アディポネクチン cDNA のシグナル配列を Ig $\kappa$  のシグナル配列に置換して組み込んだバキュロウイルスベクターを expressSF+細胞に導入した培養上清から、多量体アディポネクチンを認識するモノクローナル抗体結合させたカラムを用いて、生物活性を有する高純度のアディポネクチンを精製した。バイオアッセイと共に FITC 標識したものをリガンドとしても用いた。

(2) ウェストウエスタンブロット：  
アディポネクチンが集積することが確認されているマクロファージ系の泡沫細胞、糸球体過剰濾過状態である5/6腎摘マウスモデルの腎組織を作成した。これらの組織と対照より作成した膜分画、および血清を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、FITC標識アディポネクチンをリガンドとしたブロットを行った。対照との間にFITC標識アディポネクチン結合に差を認めたバンド、および過剰のリコンビナント体添加でFITCシグナルが消失したバンドを、同じ条件で泳動した蛋白染色ゲルから切り出し、アミノ酸シーケンスを行った。

(3) アディポネクチンのバイオアッセイ：  
培養細胞系にアディポネクチンリコンビナント体を添加し、Scavenger receptor type A (SR-A) の低下や ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の増加、Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  存在下での単球接着分子 Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)、E-selectin 発現低下を活性の指標にアッセイを行った。

## 4. 研究成果

アディポネクチン cDNA を組み込んだバキュロウイルスベクターの培養上清から精製したリコンビナントアディポネクチンは、電気泳動により血清中と同様に、3量体、6量体、多量体を形成していることが確認された。また、血中濃度に相当する 10  $\mu$ g/ml の濃度でバイ

オッセイの系に添加することにより、マクロファージ培養系において SR-A を低下、ABCA1 を増加させ、血管内皮細胞培養系において TNF- $\alpha$  による ICAM-1、VCAM-1、E-Selectin を抑制したことから、生理活性を有することが確認された。

アディポネクチンの欠損が、食塩感受性高血圧の発症や創傷治癒の遅延につながる機序を明らかにするため、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C に着目して検討したところ、リコンビナントアディポネクチンはマクロファージ培養系において VEGF-C mRNA レベルおよび VEGF-C 蛋白分泌を増加させることが明らかとなった。そして VEGF-C 発現増加に関与するシグナル伝達経路として、非受容体型チロシンキナーゼ Syk が関与していることが明らかとなった。未だ Syk 上流のアディポネクチン結合蛋白質・受容体機構は明らかではないが、このシグナル伝達経路を検討することにより、新たな動脈硬化抑制機構や臓器の異常リモデリング抑制機構の解明につながると考えられる。

糸球体過剰濾過状態である 5/6 腎摘マウスモデルにおいて、アディポネクチン結合蛋白質の候補として、シスタチン C が同定した。しかし、腎不全症例と同様に 5/6 腎摘マウスにおいて血清シスタチン C が増加していたため、購入したリコンビナントシスタチン C を用いてウエストウエスタンブロットを行った。シスタチン C はアディポネクチンと特異的に結合することが明らかとなり、シスタチン C とアディポネクチンの複合体は、電気泳動上、アディポネクチン多量体の位置に存在した。

腎不全において血中アディポネクチン濃度が増加する機序を明らかにするため、アディポネクチン欠損マウス (KO) と野生型マウス (WT) に 5/6 腎摘モデルを作成した。5/6 腎摘 WT において、血清アディポネクチン濃度は増加したが、脂肪組織における発現には差を認めず、異化障害が示唆された。異化障害を検討するため、KO に WT マウス血漿を静注して経時的に血清アディポネクチン濃度を測定し半減期を求めた。対照 KO に対照 WT マウス血漿を静注した半減期に比し、5/6 腎摘 KO に WT マウス血漿を静注及び KO に 5/6 腎摘 WT マウス血漿を静注した半減期は、有意に延長した。WT マウス血漿をリコンビナントシスタチン C と共に KO に静注することでもアディポネクチンの半減期は有意に延長した。従って、腎不全における血中アディポネクチン濃度の増加は、尿毒性物質による異化障害に基づくものであり、少なくともその一部はシスタチン C によるものであることが明らかとなった。

シスタチン C 結合によるアディポネクチンの抗動脈作用への影響を検討するため、ヒト培養血管内皮細胞を用いたバイオッセイを行った。腎不全における血中濃度に対応する濃度のシスタチン C 単独では、TNF- $\alpha$  刺激下・非刺激下のいずれにおいても ICAM-1、VCAM-1、E-Selectin mRNA レベルに影響を与えなかった。しかし、血中濃度に相当する 10  $\mu$ g/ml のアディポネクチンと同時に前処置した後 TNF- $\alpha$  刺激することで、腎不全における血中濃度に対応する濃度のシスタチン C は濃度依存性に、アディポネクチンによる ICAM-1、VCAM-1、E-Selectin の mRNA レベル抑制作用を阻害した。従って、シスタチン C はアディポネクチンと結合することで、その抗動脈作用を阻害することが明らかとなった。

今回、明らかにしたアディポネクチン結合蛋白質シスタチン C による血管代謝障害機構は、「腎不全例において血中アディポネクチン濃度は高値であるにもかかわらず動脈硬化が進行する」という矛盾を解明し、「腎機能が正常な対象において低アディポネクチン血症は動脈硬化リスク因子であるが、腎機能低下症例が多く含まれた幾つかの臨床研究において有意な因子とならない場合がある」という臨床研究における問題点の原因を考える上で、有用であると考えられる。

## 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 2 件)

1. Hu D, Fukuhara A, Miyata Y, Yokoyama C, Otsuki M, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression in Macrophages via Syk-ERK Pathway. PLoS One. 2013;8(2):e56071 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0056071

2. Komura N, Kihara S, Sonoda M, Maeda N, Tochino Y, Funahashi T, Shimomura I. Increment and impairment of adiponectin in renal failure. Cardiovasc Res. 2010 86(3):471-477 査読有  
doi: 10.1093/cvr/cvp415

[学会発表] (計 2 件)

1. Shinji Kihara  
Molecular link between visceral fat and metabolic syndrome.  
International Symposium on Atherosclerosis  
is  
2012年3月24日ロイヤルパークホテル (東京)

2. Shinji Kihara

Adiponectin in metabolic syndrome and related disorders.

第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会

Asia-Pacific-Perspectives

2010年7月15日岐阜都ホテル（岐阜）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 進士 (KIHARA SHINJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20332736

(2) 研究分担者

船橋 徹 (FUNAHASHI TOHRU)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：60243234

(H23 まで分担者として参画)

前田 法一 (MAEDA NORIKAZU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30506308

(H23 まで分担者として参画)