

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292175

研究課題名(和文)新規アディポサイトカインによる動脈硬化症の病態制御機構の全体像を解明する

研究課題名(英文) Exploring the whole mechanisms of adipocytokine regulation of atherosclerosis

研究代表者

山脇 英之 (Yamawaki, Hideyuki)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：60399607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では内臓肥満による動脈硬化発症・進展リスク上昇の因果関係を説明する新たな液性因子として捉えられている脂肪組織由来サイトカイン(アディポサイトカイン)の作用機序を解明することを目的とし検討を行った。その結果、いくつかのアディポサイトカインの新たな心血管作用を明らかにし、これらのアディポサイトカインを動脈硬化促進的に働くものと抑制的に働くものに分類することができた。本研究成果と今後さらなる研究によりアディポサイトカインが動脈硬化症をはじめとする心血管疾患の診断、予防、治療に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to explore the mechanisms of actions of adipocyte-derived cytokine (adipocytokine), which is recognized as one of the possible mediators responsible for the visceral obesity-induced cardiovascular diseases including atherosclerosis. We have clarified the novel cardiovascular effects and mechanisms exerted by adipocytokines. We also succeeded in classifying adipocytokines into good and bad type. Based on the present findings and further investigations, it is expected that adipocytokines might be applicable to the diagnosis, prevention and treatment for metabolic cardiovascular diseases.

研究分野：循環薬理学

キーワード：循環器 病態

1. 研究開始当初の背景

大血管の動脈硬化症を原因とする虚血性心血管疾患(心筋梗塞、脳梗塞)は我が国の死亡原因の中で上位に位置する。この動脈硬化症の主要なリスク因子として、内臓脂肪蓄積型の肥満症と、高脂血症、高血糖、高血圧症が挙げられる。これらの複数を併発した状態はメタボリック・シンドロームと呼ばれ、動脈硬化発症リスクが飛躍的に上昇する。中でも肥満症は他のリスク因子の基盤となる大変重要な病態である。この肥満症すなわち蓄積内臓脂肪と動脈硬化発症リスク上昇との因果関係を説明する新たな液性因子として脂肪組織から分泌されるサイトカイン(アディポサイトカイン)が極めて重要である。肥満による脂肪細胞の肥大化と組織の炎症に伴い、アディポサイトカインの分泌は亢進または減弱する。代表者はアディポサイトカインには善玉(アディポネクチン等)と悪玉(TNF- α , IL-6等)があり、それらの量的バランス(‘アディポサイトカイン・バランス’)が血管系に影響して、動脈硬化症の進展或いは予防に関わるのではないかとの説を提唱してきた。一方、近年 visfatin, vaspin, omentin, chemerin, lipocalin-2, nesfatin-1, progranulin といった新規のアディポサイトカインが次々と同定された。しかしながら、続く研究には偏りがみられ、それらの血中濃度と疾病率との相関関係を調べた臨床疫学的研究が大部分を占め、血管系に対する病態生理的あるいは生理的役割まで踏み込んだ基礎的検討はほとんどされてこなかった。代表者はこれまで、この点に着目して、新規アディポサイトカインが病態生理的側面から血管の初期炎症性障害(動脈硬化症を始め種々の血管系疾患における初期病変)にどの様に関与するか、そして2)生理的側面からアディポサイトカインはどの様な血管作用(収縮・弛緩作用)を持つかの検討を独自に進めてきた。動脈硬化症は、血管炎症性障害と血管収縮性以外にも様々な病態機序(プロセス)が関与する複雑な慢性疾患であり、未解決の病態プロセスに対するアディポサイトカインの作用機序を明らかにすることが重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、アディポサイトカインが動脈硬化症の病態機序に及ぼす影響の全体像を解明することを目的とする。このために(アディポサイトカインが、動脈硬化の発症において鍵となるプロセスに及ぼす影響を細胞、組織、生体レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

摘出血管の反応性(収縮・弛緩作用)はマグヌス法による等尺性収縮張力測定により、血管の炎症性反応はウエスタンブロット法による炎症マーカータンパク質発現とシグ

ナル分子の活性化解析により、活性酸素種(ROS)産生はROS感受性色素DCFDAによる蛍光染色により、細胞増殖はセルカウンティングアッセイとBrdU取り込みの測定により、細胞遊走はBoyden chamberアッセイにより、細胞死はTUNELアッセイにより検討を行った。組織形態学的解析は摘出血管組織の薄切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色及び免疫組織化学染色により行った。In vivoの実験では、新生内膜形成(平滑筋増殖・遊走による壁リモデリング)はマウス頸動脈ligationモデルにより、ラットの観血的及び非観血的血圧測定はそれぞれ頸動脈カニューレーション法とテイルカフ法により行った。なお、アディポサイトカイン及び中和抗体の頸動脈内局所投与は徐放剤メドジェルを使用した。また正常マウスと高血圧モデルラット(自然発症高血圧ラットSHR)に対するアディポサイトカインの腹腔内長期間投与を行なった。肺高血圧症モデルラットはモノクローリンの単回腹腔内投与により作製し、肺動脈圧はカニューレーション法により観血的に測定した。

4. 研究成果

以下の結果を学会発表した後、学術誌に公表した。

(Progranulin) Progranulin (PGRN)はアディポサイトカインの1つでその血中濃度はメタボリックシンドロームで上昇する。またPGRNは血管系において抗炎症作用を示すことが知られている。PGRNの摘出腸間膜動脈の反応性に及ぼす影響を検討した。PGRNはベスラインの収縮性には影響を及ぼさなかったが、アセチルコリン(ACh)による血管内皮依存性弛緩反応と一酸化窒素(NO)ドナー・ニトログリセリン(SNP)による弛緩反応を増強した。この機序を検討したところ、PGRNはSNPによるcGMP産生を増大することが明らかとなった。本研究結果はPGRNの摘出血管反応性に及ぼす影響を初めて明らかにしたもので、PGRNは高血圧、動脈硬化症の病態に対して保護作用を示す可能性が示唆された(Acta Physiol (Oxf) 2017)。

(FABP4) Fatty acid-binding protein 4 (FABP4)はマクロファージや脂肪組織に高発現するアディポサイトカインの1つである。その血中濃度は肥満やメタボリックシンドロームで上昇する。本研究ではFABP4またはその特異的阻害薬BMS309403が血管平滑筋の炎症、増殖、遊走、収縮性に及ぼす影響を検討した。FABP4は血管平滑筋細胞の炎症、増殖、遊走には影響を及ぼさなかった。一方、FABP4は摘出腸間膜動脈においてnoradrenaline (NA)による収縮反応を増強し、in vivoにおいてNA急性静脈内投与によるラット昇圧作用を増強した。BMS309403は細胞増殖因子PDGFによる平滑筋細胞の増殖・遊

走と炎症性サイトカイン TNF- α による炎症反応を抑制した。興味深い事に血管平滑筋細胞は FABP-4 タンパク質を発現していなかった。また in vivo において SHR に BMS309403 を長期間投与したところ、収縮期血圧上昇には影響を及ぼさなかったが、摘出腸間膜動脈における ACh による内皮依存性弛緩作用の減弱と左心室の肥大（高血圧合併症）を抑制した。本研究結果は FABP4 の新規血管作用とその阻害薬 BMS309403 の心血管疾患に対する新規保護作用を示したものである (Pflugers Archiv-Eur J Physiol 2017)。

(Chemerin) Chemerin は主に白色脂肪組織に発現するアディポサイトカインで肥満やメタボリックシンドロームでその血中濃度が上昇する。本研究では chemerin が in vitro 血管平滑筋細胞の増殖、遊走と in vivo 血管壁リモデリング（新生血管内膜形成）、血圧に及ぼす影響を検討した。Chemerin は CMKLR1 (chemerin 受容体) を介して ROS 依存性の ERK 及び Akt シグナルの活性化により血管平滑筋細胞の増殖と遊走を誘導した。また chemerin 中和抗体は新生血管内膜の形成を抑制し、chemerin 長期間投与はマウスにおいて昇圧作用を示した。本研究結果は chemerin の新規血管作用を示したもので、chemerin は高血圧、動脈硬化症に対して促進的に働く可能性が示唆された (Am J Physiol Heart Circ Physiol 2015)。

(Vaspin) Vaspin (visceral adipose tissue-derived serine proteinase inhibitor) は肥満による 2 型糖尿病モデルラット (OLETF ラット) の内臓脂肪組織中で同定されたアディポサイトカインで、serpin (セリンプロテアーゼインヒビター) ファミリーに属するタンパク質でもある。Vaspin 血中濃度のピークは OLETF ラットの肥満とインスリン抵抗性のピークと一致する。本研究では vaspin の血管内皮細胞死と血管反応性、そして SHR の病態に及ぼす影響を検討した。(1) vaspin は血管内皮細胞において糖尿病性大血管障害の原因因子の 1 つと考えられる糖代謝産物 methylglyoxal による細胞死 (アポトーシス) を抗酸化作用により抑制することを初めて明らかにした (Acta Physiol (Oxf) 2013)、(2) vaspin は摘出腸間膜動脈において、アセチルコリンエステラーゼ活性を阻害することにより ACh による内皮 NO 依存性弛緩作用を増強することを初めて明らかにした (Acta Physiol (Oxf) 2016a)、(3) vaspin は抗酸化作用と抗血管壁リモデリング作用を介して SHR の収縮期血圧の上昇を部分的に抑制することを初めて明らかにした (Acta Physiol (Oxf) 2016b)。これらの研究結果は vaspin が高血圧、動脈硬化症に対して保護的に働く可能性を示唆するものである。

(Omentin) Omentin は特にヒト内臓脂肪組織中に高発現するアディポサイトカインで、その血中濃度は肥満とメタボリックシンドロームの有病率と負の相関を示す。本研究では、omentin が血管平滑筋細胞の増殖・遊走と血管壁リモデリング、肺動脈性肺高血圧症、そして制癌薬による心毒性に及ぼす影響を検討した。(1) omentin は抗酸化作用を介して血管平滑筋細胞の遊走を阻害することで (増殖には影響がなかった)、新生血管内膜の形成 (壁リモデリング) を抑制することを初めて明らかにした (Am J Physiol 2014)、(2) omentin は肺動脈壁リモデリングと摘出肺動脈の内皮依存性及び非依存性弛緩作用の減弱の改善を介してモノクロタリンラットの肺高血圧症の病態を抑制することを初めて明らかにした (Biochem Biophys Res Commun 2014)、(3) omentin は抗酸化作用を介して抗がん剤ドキソルビシンによる心筋芽細胞死を抑制することを初めて明らかにした (Biochem Biophys Res Commun 2015)。これらの研究結果は omentin が様々な心血管疾患に対して保護的に働く可能性を示唆するものである。Omentin はこれまでの研究結果とも併せて、アディポネクチンのように心血管疾患に対して保護作用のある新たなアディポサイトカインとして捉えられるようになりつつある。

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 10 件)

① Okamura Y, Otani K, Sekiguchi A, Kogane T, Kakuda C, Sakamoto Y, Kodama T, Okada M, and Yamawaki H. Vasculo-protective effect of BMS-309403 is independent of its specific inhibition of fatty acid-binding protein 4. Pflugers Archiv - Eur J Physiol, 2017. In Press. (査読有)
doi: 10.1007/s00424-017-1976-0.

② Kazama K, Hoshino K, Kodama T, Okada M, and Yamawaki H. Adipocytokine, progranulin augments acetylcholine-induced nitric oxide-mediated relaxation through the increases of cGMP production in rat isolated mesenteric artery. Acta Physiol (Oxf) 219: 781-789, 2017. (査読有)
doi: 10.1111/apha.12739.

③ Kameshima S, Sakamoto Y, Okada M, and Yamawaki H. Vaspin prevents elevation of blood pressure through inhibition of peripheral vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. Acta Physiol (Oxf) 217: 120-129, 2016. (査読有) doi: 10.1111/apha.12636.

④ Kameshima S, Yamada K, Morita T, Okada M, and Yamawaki H. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor augments acetylcholine-induced relaxation via the inhibition of acetylcholine esterase activity in rat isolated mesenteric artery. *Acta Physiol (Oxf)* 216: 203-210, 2016. (査読有) doi: 10.1111/apha.12563.

⑤ Kunimoto H, Kazama K, Takai M, Oda M, Okada M, and Yamawaki H. Chemerin promotes proliferation and migration of vascular smooth muscle and increases mouse blood pressure. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 309: H1017-H1028, 2015. (査読有) doi: 10.1152/ajpheart.00820.2014.

⑥ Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. Adipocytokine, omentin inhibits doxorubicin-induced H9c2 cardiomyoblasts apoptosis through the inhibition of mitochondrial reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 457: 602-607, 2015. (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.032.

⑦ Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. (Review) Is novel adipocytokine, omentin, a therapeutic target for obesity-related hypertension? *Folia Pharmacol Jpn* 145: 65-69, 2015. (査読有) doi: 10.1254/fpj.145.65.

⑧ Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. A novel adipocytokine, omentin, inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 452: 142-146, 2014. (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.070.

⑨ Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. A novel adipocytokine, omentin, inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration through anti-oxidative mechanism. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 306: H1714-H1719, 2014. (査読有) doi: 10.1152/ajpheart.00048.2014.

⑩ Phalitakul S, Okada M, Hara Y, and Yamawaki H. Vaspin prevents methylglyoxal-induced apoptosis in human vascular endothelial cells by inhibiting reactive oxygen species generation. *Acta Physiol (Oxf)* 209: 212-219, 2013. (査読有) doi: 10.1111/apha.12139.

[学会発表] (計 31 件)

① Yamawaki H. Exploring novel pharmaco-therapeutic targets against pulmonary arterial hypertension and right heart failure. (Symposium) The 90th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2017/03/15, Nagasaki Astopia (Nagasaki prefecture/Nagasaki city).

② Okamura Y, Sekiguchi A, Kogane T, Kakuda C, Sakamoto Y, Okada M, and Yamawaki H. A Fatty-Acid Binding Protein 4 Inhibitor Prevents Proliferation, Migration and Inflammatory Responses in Vascular Smooth Muscle Cells. *AHA Scientific Sessions 2016*. 2016/11/13, New Orleans (USA).

③ 角田千春, 風間恭輔, 岡田宗善, 山脇英之. アディポサイトカイン chemerin のラット摘出肺動脈における収縮作用の機序. 第 29 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2016/08/05, 北里大学白金キャンパス (東京都・港区).

④ 坂本雄三郎, 亀島聡, 角田千春, 岡村勇汰, 岡田宗善, 山脇英之. アディポサイトカイン vaspin によるモノクロタリン誘発肺高血圧症の病態抑制の機序. 第 29 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2016/08/05, 北里大学白金キャンパス (東京都・港区).

⑤ 岡村勇汰 坂本雄三郎, 角田千春, 兒玉朋子, 風間恭輔, 岡田宗善 山脇英之. 脂肪酸結合タンパク質 4 阻害薬が自然発症高血圧ラットの病態に及ぼす影響. 第 29 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2016/08/05, 北里大学白金キャンパス (東京都・港区).

⑥ Kakuda C, Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. Effects of chemerin, an adipocytokine, on contractility of rat isolated pulmonary artery. The 89th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2016/03/11, Pacifico Yokohama (Kanagawa prefecture/Yokohama city).

⑦ Okamura Y, Sekiguchi A, Sakamoto Y, Kodama T, Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. An FABP4 inhibitor suppresses inflammatory response of vascular smooth muscle cells. The 89th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2016/03/11, Pacifico Yokohama (Kanagawa prefecture/Yokohama city).

⑧ Sakamoto Y, Kameshima S, Okada M, and Yamawaki H. Effect of vaspin, an adipocytokine, on the progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. The 89th Annual Meeting of

The Japanese Pharmacological Society. 2016/03/11, Pacifico Yokohama (Kanagawa prefecture/Yokohama city).

⑨ 亀島聡、坂本雄三郎、岡田宗善、山脇英之。アディポサイトカイン vaspin は抗酸化及び抗炎症作用を介して自然発症高血圧ラットにおける血圧上昇を抑制する。第25回日本循環薬理学会。2015/12/04, 東大寺総合文化センター (奈良県・奈良市)。

⑩ Kameshima S, Sakamoto Y, Okada M, and Yamawaki H. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor prevents the development of hypertension through the inhibition of vascular remodeling via anti-oxidative mechanisms in spontaneously hypertensive rats. AHA Council on Hypertension 2015 Scientific Sessions. 2015/09/16, Washington D.C. (USA).

⑪ 風間恭輔、岡田宗善、山脇英之。新規アディポサイトカイン omentin の心血管病に対する作用メカニズムに関する研究。第158回日本獣医学会学術集会(獣医学奨励賞受賞講演)。2015/09/08, 北里大学十和田キャンパス (青森県・十和田市)。

⑫ 富野里櫻子、篠原健大、岡田宗善、山脇英之。Progranulin が血管内皮細胞における炎症性反応に及ぼす影響。第28回北里大学バイオサイエンスフォーラム。2015/08/07, 北里大学相模原キャンパス (神奈川県・相模原市)。

⑬ 風間恭輔、加藤亮、岡田宗善、山脇英之。新規アディポサイトカイン omentin は糖代謝産物 methylglyoxal による血管内皮細胞死を抑制する。第28回北里大学バイオサイエンスフォーラム。2015/08/07, 北里大学相模原キャンパス (神奈川県・相模原市)。

⑭ 星野和真、岡田宗善、山脇英之。Progranulin はラット摘出腸間膜動脈において内皮依存性弛緩反応を増強する。第28回北里大学バイオサイエンスフォーラム。2015/08/07, 北里大学相模原キャンパス (神奈川県・相模原市)。

⑮ 岡村勇次、関口晃弘、岡田宗善、山脇英之。脂肪酸結合タンパク質4が血管平滑筋細胞における炎症反応に及ぼす影響。第28回北里大学バイオサイエンスフォーラム。2015/08/07, 北里大学相模原キャンパス (神奈川県・相模原市)。

⑯ Hoshino K, Yamada K, Okada M, and Yamawaki H. Effects of progranulin, an adipocytokine on contractility of rat

isolated mesenteric artery. The 88th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2015/03/18, Nagoya Congress Center (Aichi prefecture/Nagoya city).

⑰ Kazama K, Okada M, Yamawaki H. A novel adipocytokine, omentin, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. AHA High Blood Pressure Research (HBPR) 2014 Scientific Sessions. 2014/09/11, San Francisco (USA).

⑱ 國本秀瑞垂、高井瑞穂、岡田宗善、山脇英之。アディポサイトカイン chemerin は血管平滑筋細胞の増殖及び遊走の促進を介して昇圧をおこす。第157回日本獣医学会学術集会。2014/09/11, 北海道大学 (北海道・札幌市)。

⑲ 風間恭輔、岡田宗善、山脇英之。新規アディポサイトカイン omentin は doxorubicin による心毒性を抑制する。第27回北里大学バイオサイエンスフォーラム。2014/08/21, 北里大学相模原キャンパス (神奈川県・相模原市)。

⑳ Yamawaki H. Vascular effects of novel adipocytokines: implication for pathogenesis of obesity-related hypertension. (Symposium) The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2014/03/21, Sendai International Center (Miyagi prefecture, Sendai city).

㉑ Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. Omentin prevents early inflammatory responses in aorta of high fat-fed mice. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2014/03/21, Sendai International Center (Miyagi prefecture, Sendai city).

㉒ Sekiguchi A, Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. Effects of fatty acid-binding protein (FABP)4 on proliferation of vascular smooth muscle cell. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2014/03/19, Sendai International Center (Miyagi prefecture, Sendai city).

㉓ Yamada K, Morita T, Okada M, and Yamawaki H. Effects of vaspin, an adipocytokine on contractility of rat isolated mesenteric artery. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. 2014/03/19, Sendai International Center (Miyagi

prefecture, Sendai city).

②4 國本秀瑞垂、高井瑞穂、岡田宗善、山脇英之。アディポサイトカイン chemerin は血管平滑筋細胞の増殖及び遊走を促進する。第 23 回日本循環薬理学会。2013/12/06, 福岡大学 (福岡県・福岡市)。

②5 Kazama K, Okada M, and Yamawaki H. A Novel Adipocytokine, Omentin Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Migration By Inhibiting O2-/p38/HSP27 Pathway. AHA High Blood Pressure Research (HBPR) 2013 Scientific Sessions. 2013/09/11, New Orleans (USA).

[その他]

ホームページ等

北里大学獣医薬理学研究室ホームページ
<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山脇 英之 (Yamawaki Hideyuki)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：60399607