

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04762

研究課題名(和文) アディポカイン結合蛋白を標的にした動脈硬化診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method for atherosclerosis targeting adipokine binding proteins

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：E-selectin ligand (ESL)-1とMac2 Binding Protein (M2BP)を新規アディポネクチン(APN)結合蛋白として同定し、ESL-1を介した新たな抗動脈硬化機序、APN - M2BP複合体が冠動脈疾患で著明に高値でありM2BPがアディポネクチンの作用を阻害すること、さらにAPN -シスタチンC複合体が冠動脈プラークの不安定性と関連することを明らかにした。

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 E-selectin ligand (ESL)-1 and Mac2 Binding Protein (M2BP) as novel adiponectin binding proteins. We investigated that adiponectin has anti-atherosclerotic function through the inhibition of monocyte adhesion on endothelium via direct association between adiponectin and ESL-1 on monocyte. In addition, we found that serum adiponectin-M2BP complex levels were markedly higher in patients with coronary artery disease (CAD) than in healthy subjects, and M2BP abrogated the anti-atherogenic effects of adiponectin on cultured endothelial cells. Moreover, we elucidated that serum adiponectin-cystatin C complex levels associated with coronary plaque vulnerability evaluated by intravascular ultrasound in CAD patients.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：蛋白質 医療・福祉 分析科学 細胞・組織 生体分子

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、アディポネクチン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-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を報告した。また、別のアディポネクチン結合蛋白として腎臓病で増加するシスタチンCを同定し、アディポネクチンの抗動脈硬化作用を阻害することを明らかにした。

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、脂肪細胞が分泌するアディポネクチンやオメンチンなどのアディポカインが、動脈硬化や代謝異常を防御する機構を研究し、アディポカイン結合蛋白(AKBP)として同定したカルレティキュリンやシスタチンCが動脈硬化における意義を明らかにしてきた。さらに、冠動脈疾患で血中濃度が増加するアディポネクチン-AKBP複合体を見出した(未発表データ)。

本研究は、新規AKBP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AKBP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とコントロールのあるバンドを質量分析し、AKBP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AKBPとした。

(2) アディポネクチン-AKBP複合体測定：
抗アディポネクチンモノクローナル抗体(ANOC9121)をカップリングした磁気ビーズで血清を免疫沈降し、抗AKBP抗体でウエスタンプロットを行う。解析にはimage Jを用い、プール血清を内部標準とした。

(3) AKBPを介した抗動脈硬化作用の解析
AKBP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AKBP融合蛋白を精製する。精製したAKBP融合蛋白とリコンビナントアディポネクチンを、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AKBPの作用を解析した。また、この培養細胞系において、AKBPの発現を抑制し、アディポカインの作用を検討した。

4. 研究成果

(1) E-selectin ligand-1同定と機能解析：
ANOC9121抗体あるいはコントロールIgGで免疫沈降したHepG2細胞溶解液を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接着に重要な細胞膜蛋白であるE-selectin ligand-1(ESL-1)が同定された。

HEK293細胞に過剰発現させたアディポネクチン(APN)とタグ融合ESL-1を作成後、これら過剰発現蛋白質と抗APN抗体、もしくは対照IgGと免疫沈降し、この免疫沈降サンプルを用いてウエスタンプロットを行い、APNとESL-1の結合を確認した。また、APNとESL-1各々にタグを融合させた発現蛋白質を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を用いたウエスタ

ンプロットによる結合の確認も行った。次に、ヒト単球細胞と血管内皮細胞を用いて、単球上に存在する ESL-1 に対する APN の影響を検討した。TNF- 刺激した血管内皮細胞への単球接着は増加し、APN 前処理により減少した。単球に存在する ESL-1 をノックダウンすると、APN の効果を認めなかった。この結果から、APN が ESL-1 と結合することにより、単球の血管内皮細胞への接着を阻害すること示唆された。さらに、APN と ESL-1 の結合部位を検討した。ESL-1 のシグナル配列から 5 アミノ酸を欠損させても APN との結合を認めたと、10 アミノ酸以上欠損させると、APN の結合を認められなかったことから、APN との結合には ESL-1 のシグナル配列より 6-10 アミノ酸が重要であることが考えられた。

(2) Mac-2 binding protein 同定と機能解析： 健常者血清を抗 APN 抗体あるいは対照 IgG を用いて免疫沈降し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後に銀染色を行った。抗 APN 抗体での免疫沈降検体に特異的に認められたバンドの質量分析より Mac-2 binding protein (M2BP) を同定した。APN と M2BP 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、電気泳動後の M2BP を転写した膜とラベルした APN と反応させるファウエスタン法を用いて、APN と M2BP の直接結合を確認した。次に、臨床検体における血中 APN 濃度、血中 M2BP 濃度および M2BP-APN 複合体量を検討した。対象は冠動脈疾患 (CAD) 患者 21 名と年齢を調整した健常対照者 21 名とした。CAD 患者では健常対照者に比べ、血中 APN 濃度は有意に低下、血中 M2BP 濃度は増加傾向を示した。血中 M2BP-APN 複合体量は血中 APN、M2BP 濃度変化に比し、著明な増加を認めた。さらに、APN の抗動脈硬化作用に対する M2BP の影響を培養血管内皮細胞において検討した。TNF- 刺激により増加した血管内皮細胞の単球接着分子 mRNA 量は、APN の前処理により抑制された。この APN による抑制は、M2BP との共培養により消失した。従って、M2BP は APN の抗動脈硬化作用を阻害することが示唆された。

(3) シスタチン C 複合体の臨床的意義の解析： 男性安定狭心症患者 43 名の血清を ANOC9121 カップリング磁気ビーズで免疫沈降し、抗シスタチン C (CysC) 抗体でウエスタンプロットを行って CysC-APN 複合体量を測定した。冠動脈プラークの形態や組織性状の評価は iMap®-IVUS にて行い、この結果と血清 CysC-APN 複合体量および各種血清パラメータとの関連を Spearman の順位相関係数および重回帰分析にて検討した。男性安定狭心症患者において、血清 CysC-

APN 複合体量はプラークの線維性成分と有意な負の相関、壊死性成分および脂肪成分と壊死性成分の和と有意な正の相関を認めた。重回帰分析において、CysC-APN 複合体濃度はプラークの線維性成分、壊死性成分、脂肪成分と壊死性成分の和と最も強く関連する因子であることが明らかとなった。従って、血清 CysC-APN 複合体量は冠動脈プラークの不安定性を予測する有用なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Matsumoto A, Yamamoto H, Matsuoka T, Kayama K, Onishi S, Matsuo N, Kihara S. Cystatin C-Adiponectin Complex in Plasma Associates with Coronary Plaque Instability. *J Atheroscler Thromb*. 2017 Sep 1; 24(9): 970-979

2. Niinaga R, Yamamoto H, Yoshii M, Uekita H, Yamane N, Kochi I, Matsumoto A, Matsuoka T, Kihara S. Marked elevation of serum M2BP-adiponectin complex in men with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2016 Oct; 253: 70-74

3. Yamamoto H, Kuroda N, Uekita H, Kochi I, Matsumoto A, Niinaga R, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S. E-selectin ligand-1 (ESL-1) is a novel adiponectin binding protein on cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Feb 5; 470(2): 425-430

[学会発表](計 3 件)

1. Matsuoka T, Yamamoto H, Matsumoto A, Matsuo N, Mizukami Y, Fukuda K, Makino Y, Kihara S. Serum Cystatin C-Adiponectin Complex Levels Predict the Prognosis of Male Patients with Coronary Artery Disease. 第 67 回米国心臓病学会 2018 年 3 月 10 日 Orange County Convention Center 米国

2. 山本浩靖、船橋徹、下村伊一郎、木原進士 E-selectin ligand-1 は新規アディポネクチン結合分子である 第 90 回日本内分泌学会 2017 年 4 月 20 日 みやこめっせ 京都

3. 二位永竜 山本浩靖 松岡哲郎 木原進士

アディポネクチン結合蛋白質 Mac2 Binding Protein の同定と血中複合体の臨床的意義
第 56 回日本臨床化学会年次学術集会
2016 年 12 月 3 日
くまもと県民交流館 熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

山本 浩靖 (YAMAMOTO, Hiroyasu)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00631201

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()