

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790656
 研究課題名（和文） 生理活性ペプチドを用いた新規心血管神経脂肪保護再生療法の開発
 研究課題名（英文） Development of new regenerative therapy for cardiovascular, neural, and metabolic diseases using bioactive peptides
 研究代表者
 山原 研一（YAMAHARA KENICHI）
 国立循環器病センター研究所・再生医療部・室長
 研究者番号：50450888

研究成果の概要：

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に加え、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧といった動脈硬化危険因子をもつ病態であり、脂肪組織を含む全身の血管内皮機能が障害された状態と考えられる。一方、脂肪組織は多くの生理活性物質（アディポサイトカイン）を産生する内分泌器官であり、アディポサイトカイン産生調節機構の破綻がメタボリックシンドロームの発症に関与するとされている。そこで、メタボリックシンドロームにおける脂肪組織の血管内皮機能障害に着目し、血管内皮細胞と脂肪細胞の共培養系を確立し、脂肪における生理活性物質を含む液性因子を介した血管内皮細胞と脂肪細胞の相互作用に関し検討を行った。血管内皮と脂肪細胞の共培養の結果から、1)脂肪細胞における脂肪分解の促進、2)FFAによる血管内皮細胞の炎症性変化が認められ、共培養による脂肪分解に血管内皮細胞由来アディポサイトカインが関与する可能性が示唆された。

更に、我々がこれまで研究を蓄積してきた生理活性ホルモンに関し、未知の保護再生作用の検索を行った。マウスリンパ浮腫モデルを用いた検討から、アドレノメデュリン（AM）に既報の血管再生のみならずリンパ管新生作用を持つことを見いだした（*Cardiovasc Res.* 2008;80(3):339-45）。更に、培養ヒトリンパ管内皮細胞を用いた検討から、AMは濃度依存性にその細胞増殖および遊走を促進した。更には、AMは同細胞におけるVCAM-1やICAM-1の発現を著明に抑制した。このように我々は、当初血管拡張因子として同定されたAMにおいて、これまで知られていなかったリンパ管新生、炎症抑制という新たな生理活性作用を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：(1) 生理活性物質、(2)アディポサイトカイン、(3)メタボリックシンドローム、(4)脂肪、(5)血管内皮

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の約3分の2は、脳血管障害および虚血性心疾患により占められるが、これらの病態は、メタボリックシンドロームを背景にした、高血圧症、糖尿病、高脂血症などのいわゆる生活習慣病に基づく増殖性血管病変により生じる。これらの血管病変は、内皮細胞機能の破綻とそれに基づく血管平滑筋細胞の脱分化による遊走・増殖により発症する。近年、血管内皮細胞および平滑筋細胞は血管ストレスに反応し生理活性物質（血管ホルモン）を分泌し、自らの機能、構造を制御することが明らかとなり、血液を通すパイプとしてのみ考えられてきた血管が、新しい内分泌臓器であることが示されてきた。我々は、これまでに、新規血管ホルモンについての研究を推進し臨床応用に展開させるトランスレーショナルリサーチを実践してきた。すなわち利尿、ナトリウム利尿、血管弛緩作用を有するナトリウム利尿ペプチドファミリーのうち ANP、BNP が心臓ホルモンとして作用し、一方 CNP が血管内皮細胞から分泌されることを明らかにし、自ら開発した種々の遺伝子改変動物を用い、ナトリウム利尿ペプチドが血管再生を促進することを見だし、糖尿病等生活習慣病による閉塞性動脈硬化症患者に ANP を投与し極めて良好な治療効果を得ている (Yamahara K, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003)。また、ナトリウム利尿ペプチド同様血管拡張作用を有するアドレノメデュリンにおいても、自ら開発したアドレノメデュリントランスジェニックマウスを用い、血管および神経再生作用を有することを証明している (Miyashita K, et al, Endocrinology 2006)。

メタボリックシンドロームはその病態基盤として肥満、特に内臓脂肪の蓄積とそれに伴う脂肪細胞自身の形質転換およびアディポサイトカインの分泌異常の重要性が指摘されてきた。最近、我々は、自ら開発した BNP トランスジェニックマウス、及び、ナトリウム利尿ペプチドのセカンドメッセンジャーである cGMP 依存性プロテインキナーゼトランスジェニックマウス (Yamahara K, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003) において、肥満抑制作用が認められ、心血管ホルモンとされてきたナトリウム利尿ペプチドが、脂肪細胞の形質転換、あるいはアディポサイトカインの分泌調節を介して、メタボリックシンドロームの病態に関わっている可能性を見いだしている。

2. 研究の目的

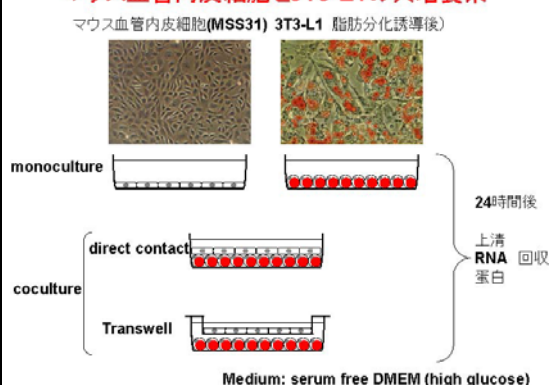
上記背景を元に、メタボリックシンドロームとその合併症を、我々がこれまで蓄積してきた生理活性ホルモンに関する研究業績の上に、その分子機構を解析し、新たなメタボリックシンドロームに対する包括的治療法の開発を目指した研究を行った。即ち、生理活性ホルモンの心筋、血管、神経、脂肪の保護再生を含む新たな生理活性作用の検索を行い、メタボリックシンドロームに伴う病態に相応しい、新規心血管神経脂肪保護再生療法の確立をその目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 生理活性ペプチドの代謝制御因子としての意義の検討

既知および未知生理活性物質の代謝制御因子としての作用を検討するため、以下の検討をおこなった。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に加え、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧といった動脈硬化危険因子をもつ病態であり、脂肪組織を含む全身の血管内皮機能が障害された状態と考えられる。一方、脂肪組織は多くの生理活性物質（アディポサイトカイン）を産生する内分泌器官であり、アディポサイトカイン産生調節機構の破綻がメタボリックシンドロームの発症に関与するとされている。そこで、メタボリックシンドロームにおける脂肪組織の血管内皮機能障害に着目し、血管内皮細胞と脂肪細胞の共培養系を確立し、脂肪における生理活性物質を含む液性因子を介した血管内皮細胞と脂肪細胞の相互作用に関し検討を行った。

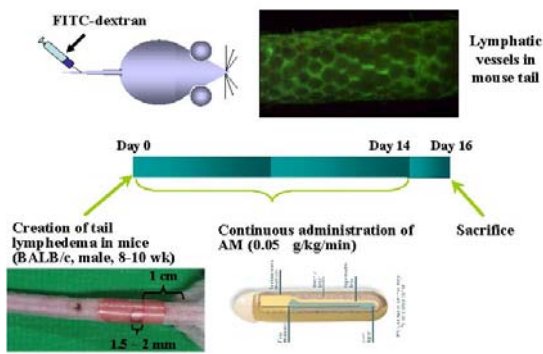
マウス血管内皮細胞と3T3-L1の共培養系



(2) 生理活性ペプチドの心血管神経脂肪組織保護再生因子としての意義の検討

我々がこれまで研究を蓄積してきた生理活性ホルモンであるアドレノメデュリンに関し、未知保護再生作用の検索を新規動物モデルを用い行った。

マウスリンパ浮腫モデル

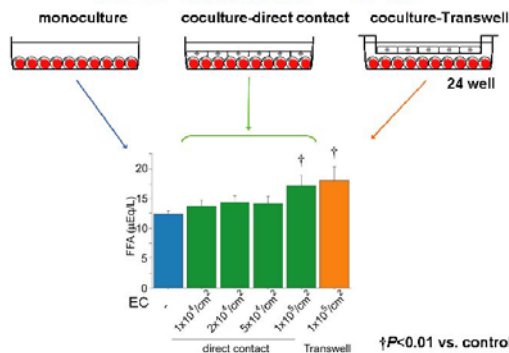


4. 研究成果

(1) 生理活性ペプチドの代謝制御因子としての意義の検討

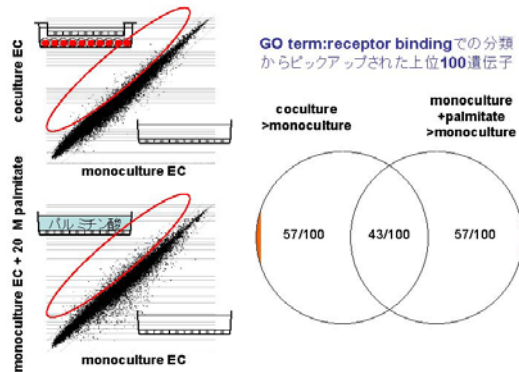
トランスウェル法により 3T3-L1 脂肪細胞と MSS31 血管内皮細胞を共培養したところ、血管内皮細胞数に比例して培養上清中の遊離脂肪酸 (FFA) 濃度は有意に増加した ($P < 0.01$)。

血管内皮細胞と脂肪細胞の共培養による培養上清中遊離脂肪酸(FFA)の増加



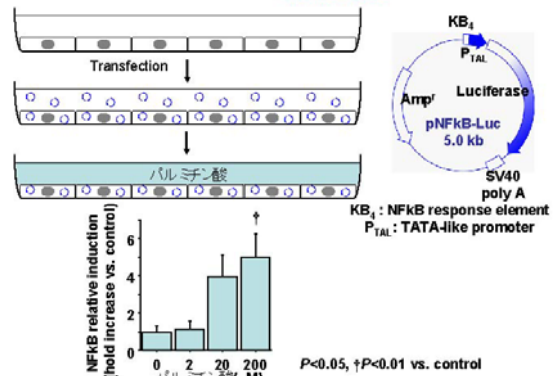
DNA チップを用いた共培養及び飽和脂肪酸であるパルミチン酸添加による MSS31 の遺伝子発現解析では、多くのサイトカイン・ケモカインを含む受容体結合蛋白・ペプチド遺伝子 (共培養 68 個、パルミチン酸 51 個) が単独培養と比較し強発現 (>1.5 倍) していた。

共培養による血管内皮細胞における遺伝子発現の変化



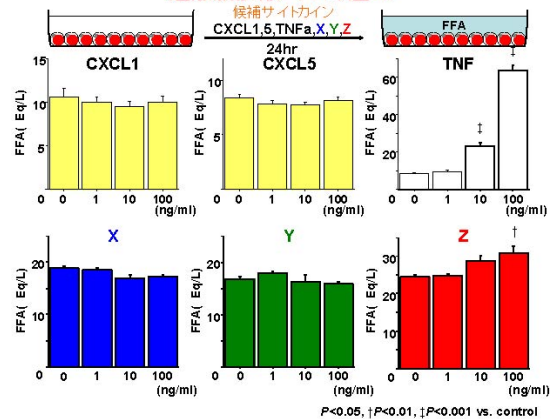
レポーターアッセイによる解析から、共培養及びパルミチン酸添加は血管内皮細胞における NFkB 活性を有意に増加させた ($P < 0.05$)。

培養血管内皮細胞におけるパルミチン酸によるNFkBの活性亢進



共培養、パルミチン酸添加共に遺伝子発現が増強していた候補アディポサイトカインを 3T3L1 に添加したところ、培養上清中の FFA 濃度は濃度依存性に増加した ($P < 0.001$)。

候補サイトカイン添加による3T3L1からの遊離脂肪酸 (FFA) 産生

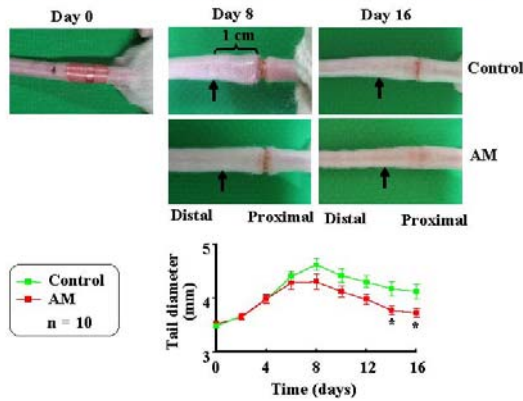


血管内皮と脂肪細胞の共培養により、1)脂肪細胞における脂肪分解の促進、2)FFA による血管内皮細胞の炎症性変化が認められた。また、共培養による脂肪分解に血管内皮細胞由来アディポサイトカインが関与する可能性が示唆された。

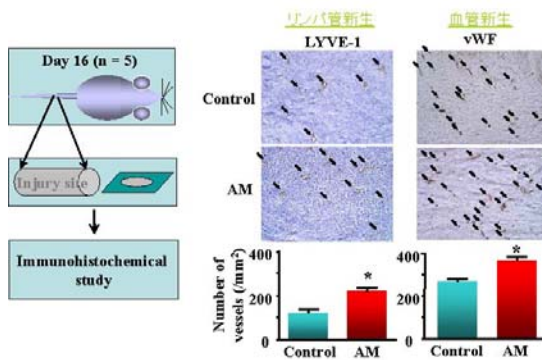
(2) 生理活性ペプチドの心血管神経脂肪組織保護再生因子としての意義の検討

マウスリンパ浮腫モデルを用いた検討から、アドレノメデュリン (AM) に既報の血管再生のみならずリンパ管新生作用を持つことを見いだした (Cardiovasc Res. 2008;80(3):339-45)。即ち、同モデルにおいて、AM の持続投与により著明な浮腫改善ならびに病巣部における血管・リンパ管新生を認めた。

アドレノメデュリンによるリンパ浮腫改善作用

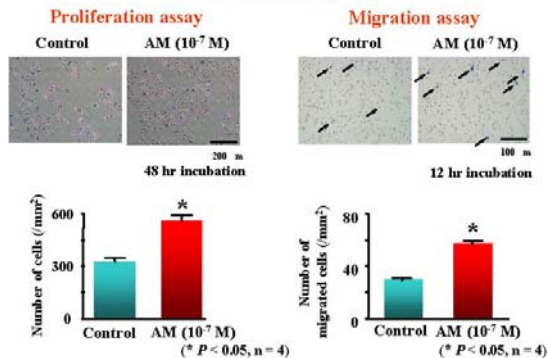


アドレノメデュリンによる血管・リンパ管新生作用



更に、AM によるリンパ管内皮に対する生理作用およびそのメカニズム解析を *in vitro* において行った。培養ヒトリンパ管内皮細胞において、AM は濃度依存性にその細胞増殖および遊走を促進した。これらの促進は AM のセカンドメッセンジャーである cAMP、更にはその下流にある Erk1/2 依存性の作用であることを cAMP アナログおよび MEK 阻害剤、リン酸化 Erk1/2 の発現検討により証明した。

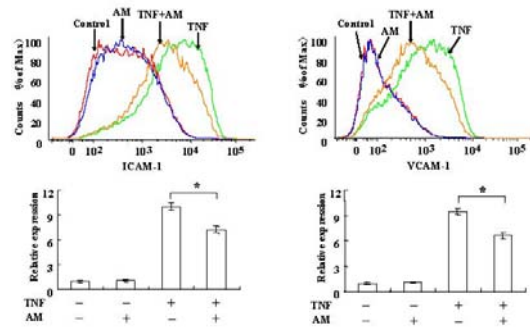
アドレノメデュリンによるリンパ管内皮細胞の増殖遊走促進作用



更に、AM は培養リンパ管内皮細胞における VCAM-1 や ICAM-1 の発現を著明に抑制したことから、AM はリンパ管内皮における炎症関連接着因子の発現抑制を介し、リンパ球

浸潤抑制など炎症抑制作用を発揮するものと考えられた。

アドレノメデュリンによるリンパ管内皮細胞における ICAM-1/VCAM-1 発現調節



このように我々は、当初血管拡張因子として同定された AM において、これまで知られていなかったリンパ管新生、炎症抑制という新たな生理活性作用を明らかにした。

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 5 件、すべて査読有り)

1. Yamahara K, Min KD, Tomoike H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Pathological role of angiostatin in heart failure: an endogenous inhibitor of mesenchymal stem-cell activation. *Heart*. 95(4):283-9, 2009.
2. Takahashi K, Fukushima S, Yamahara K, Yashiro K, Shintani Y, Coppen SR, Salem HK, Brouillette SW, Yacoub MH, Suzuki K. Modulated inflammation by injection of high-mobility group box 1 recovers post-infarction chronically failing heart. *Circulation*. 118(14 Suppl):S106-14, 2008.
3. Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, Hagino I, Mori H, Sawa Y, Yagihara T, Kitamura S, Nagaya N. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 12;374(1):11-6, 2008.
4. Jin D, Harada K, Ohnishi S, Yamahara K, Kangawa K, Nagaya N. Adrenomedullin induces lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphoedema.

- Cardiovasc Res. 80(3):324-5, 2008.
5. Park K, Itoh H, Yamahara K, Sone M, Miyashita K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K.
Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases.
Endocrinology. 149(2):483-91, 2008.

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 金東浩、山原研一、原田和彦、大谷健太郎、永谷憲歳、寒川賢治
アドレノメデュリンによるリンパ管再生作用とそのリンパ浮腫治療効果
第 12 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、平成 20 年 11 月 29 日、熊本
2. 山原研一、永谷憲歳、北村惣一郎、寒川賢治
重症心不全患者における間葉系幹細胞活性化抑制因子の探索
第 12 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、平成 20 年 11 月 29 日、札幌
3. DongHao Jin, Kenichi Yamahara, Kazuhiko Harada, Shunsuke Ohnishi, Kenji Kangawa, and Noritoshi Nagaya
Adrenomedullin Induces Lymphangiogenesis and Ameriolates Secondary Lymphedema.
American Heart Association Scientific Session 2008、平成 20 年 11 月 8 日～12 日、ニューオリンズ、米国
4. 徳留健、岸本一郎、山原研一、堀尾武史、澤井一智、宮里幹也、河野雄平、佐田政隆、河野雅和、中尾一和、寒川賢治
内因性 ANP、BNP の血管新生、血管形成における役割
第 31 回日本高血圧学会総会、平成 20 年 10 月 9 日、札幌
5. 山原研一、永谷憲歳、寒川賢治
メタボリックシンドロームにおける脂肪細胞と血管内皮細胞の相互作用－アドレノメデュリンの役割
第 31 回日本高血圧学会総会、平成 20 年 10 月 11 日、札幌
6. 山原研一、大西俊介、永谷憲歳
メタボリックシンドロームにおける脂肪細胞血管内皮機能障害－共培養系における検討
第 11 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、平成 19 年 11 月 16 日、東京
7. 原田和彦、大西俊介、山原研一、池田智明、藤原道弘、北村惣一郎、寒川賢治、永谷憲歳
褥瘡に対するアドレノメデュリンの効果

- 第 11 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、平成 19 年 11 月 16 日、東京
8. 中西千明、山岸正和、山原研一、永谷憲歳
間葉系幹細胞の心臓内幹細胞に対するパラクライン効果の検討
第 11 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、平成 19 年 11 月 16 日、東京

〔図書〕（計 1 件）

山原研一、伊藤裕、真興交易(株)医書出版部
血管の再生－血管再生医学の夜明け：近づく実用化
2008 年、251 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山原 研一 (YAMAHARA KENICHI)

国立循環器病センター

研究所・再生医療部室長

研究者番号：50450888

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし