

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790845

研究課題名(和文) アディポサイトカインと心腎疾患

研究課題名(英文) Adipocytokines and cardio-renal diseases

研究代表者

柴田 玲 (Shibata, Rei)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：70343689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームを中心とした生活習慣病、循環器疾患の病態には、様々なアディポサイトカインの産生異常が関わっている。特にアディポネクチンは、抗糖尿病や抗動脈硬化作用を有し、心腎疾患の病態にも深く関与している。我々は、本研究の中で、アディポネクチンが抗アポトーシス作用を介し、心機能低下や腎機能低下状態に対して保護的効果を発揮することが明らかとなった。また、慢性腎臓病患者を対象とした検討から、アディポネクチン濃度の測定が、動脈硬化病変の進展評価に有用であることを見出した。以上から、アディポネクチンは心腎疾患への診断に有用であるのみならず、今後、治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue functions as an endocrine organ by secreting adipocytokines that can directly affect nearby or remote organs. Adiponectin is an adipocytokine whose concentration is down-regulated in subjects with obesity-related disorders. Low levels of circulating adiponectin appear to associate with the increased prevalence of obesity-linked diseases including cardiac and renal dysfunction. In our study, we have shown that adiponectin exerts beneficial effects on the cardio-renal system by directly acting on the component cells in the heart and kidney. The cardiovascular protection by adiponectin is mediated through its ability to attenuate apoptotic activity in the target organs. Thus, adiponectin could represent a therapeutic target molecule for prevention or treatment of cardio-renal diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：脂肪細胞由来因子 アディポネクチン 心不全 腎不全

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームの患者の多くに重篤な心血管疾患や腎臓病が合併することは、よく知られていることではあるが、その発症機序は未だ十分に明らかではない。近年、脂肪細胞は数多くのホルモンを発現し分泌する内分泌臓器であるという概念が確立し、現在では、アディポネクチン、レプチン、TNF- α 、レジスチンをはじめとする数多くの脂肪細胞由来因子(アディポサイトカイン)と病態との関連が明らかとなりつつある。

(2) アディポネクチンの血中濃度は肥満症や糖尿病、冠動脈疾患の患者において低下しており、数多くの研究結果から、アディポネクチンは、抗糖尿病、抗動脈硬化作用を有するホルモンであることが示され、メタボリックシンドロームを中心とした生活習慣病の病態に深く関わっていることが明らかになりつつある。申請者らは特に心血管病/腎臓病におけるアディポネクチンの役割に注目し、世界に先駆けて、アディポネクチンが心臓肥大抑制作用や心筋梗塞縮小効果、腎保護作用、血管新生促進作用を有することを明らかにした。また、アディポネクチンがアポトーシス細胞のクリアランスを促進することにより、全身の炎症を抑制することを見だし、このアディポネクチンの作用が新規アディポネクチンレセプター「Calreticulin」を介していることを突き止めた。このように、アディポネクチンの分泌異常は、心腎血管疾患の発症に密接に関与していると考えられる。

(3) 「心疾患」、「腎疾患」、「脂肪細胞機能異常」の病態を合併する患者は非常に多く、それぞれが互いに悪影響を及ぼし合い、その病態や進展に密接に関連している可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

現在までの申請者らの基礎研究をベースに、「アディポネクチン」と近年我々が同定した新規アディポネクチンレセプターである「Calreticulin」の役割を中心におき、アディポネクチンの「心不全」、「腎不全」の病態における役割を詳細に解明する。

3. 研究の方法

以下の4点に留意しながら、検討を進めた。

(1) 心毒性のみならず、腎毒性も有するドキシソルビシン投与による心不全モデルを作成。

野生型(WT)マウス、アディポネクチン遺伝子欠損(APN-KO)マウス、各種アディポネクチンシグナル関連遺伝子改変マウスを用いて、アディポネクチンの心不全に関する役割検討を行う。

(2) 腎微小循環をリアルタイムに観察定量化するシステムを用いて、腎不全の責任血管である尿細管周囲毛細血管血流をイメージングの面から解析する。WTマウス、APN-KOマウス、各種アディポネクチンシグナル関連遺伝子改変マウスを用いて片腎摘出後45分再灌流傷害による腎不全モデルを作成、尿細管周囲毛細血管イメージングからのアプローチで腎不全におけるアディポネクチンの役割を検討する。

(3) 心不全や腎不全の病態におけるアディポネクチンレセプターの役割、レセプターを介したシグナル伝達経路を明らかにする。ラット胎児培養心筋細胞を利用した*in vitro*の系と各種アディポネクチンシグナル関連遺伝子改変マウスを利用した*in vivo*の系で検討する。

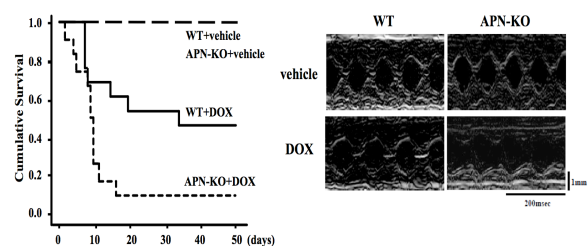
(4) 心不全、腎不全患者で経時的にアディポネクチン濃度を測定する。

4. 研究成果

(1) ドキシソルビシン心筋症におけるアディポネクチンの役割検討

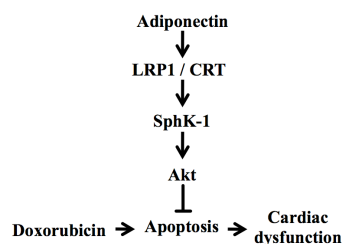
ドキシソルビシン(DOX)は広く用いられている抗癌剤であるが、重篤な副作用として心腎毒性があるために、使用を制限せざるをえないケースがある。興味深いことに、がん患者を対象にDOXをベースとした化学療法を施行した臨床研究では、肥満患者で生存率の低下が報告されている。そこで、本研究では、DOX心筋症におけるアディポネクチンの関与を検討した。

WTマウスおよびAPN-KOマウスに対して、DOXを腹腔内へ単回投与しDOX心筋症モデルを作成した。APN-KOマウスでは、WTマウスと比較し、DOX投与後の生存率(左下図)や心収縮能(右下図)の有意な低下を認めた。



また、APN-KO マウスでは、DOX 投与後の心筋細胞のアポトーシスが増加していた。アデノウイルスベクターを用いてアディポネクチンの投与を行ったところ、WT マウス及び APN-KO マウスのいずれにおいても、DOX 投与に伴う心収縮能低下が予防され、アポトーシス増加も抑制された。また、APN-KO マウスでは DOX 投与により、心筋での Akt のリン酸化が低下していた。Akt1 遺伝子欠損マウスにアディポネクチン投与を行ったところ、DOX 投与に伴う心収縮能低下やアポトーシス増加の改善効果は認められなかった。ラット胎児培養心筋細胞を用いた検討では、アディポネクチン添加にて Akt のリン酸化が時間依存的に認められ、DOX 刺激に伴う心筋細胞のアポトーシスが抑制された。この効果は、PI3K 阻害剤 LY294002 の前処理や Sphingosine kinase 1 の抑制により解除された。近年、我々は、新規アディポネクチンレセプターとして「カルレティキュリン (CRT)」を同定した。フローサイトメトリーを用いた検討では、CRT が心筋細胞表面に存在することが確認され、抗 CRT 中和抗体の前処置にて、アディポネクチンの心筋表面への結合が阻害された。アディポネクチンの Akt 活性化作用や、DOX 添加に伴うアポトーシスの抑制効果は、抗 CRT 中和抗体や siRNA を用いた CRT のノックダウンで解除された。

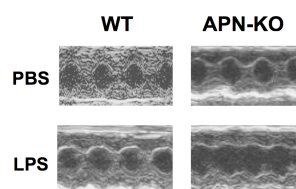
アディポネクチンは、DOX 心筋症に対して保護的作用を有していた。そのメカニズムとして、心筋表面のカルレティキュリンをレセプターとし、細胞内の Sphingosine kinase 1 を介した、Akt の活性化にともなう、アポトーシス抑制が考えられた (下図)。



低アディポネクチン血症は、肥満症で見られるがん患者における化学療法の治療成績低下に関与している可能性が示唆された。

(2) マウス敗血症モデルにおけるアディポネクチンの心保護効果の検討

WT マウスおよび APN-KO マウスに、LPS (10mg/kg) を単回腹腔内注射し、急性の心機能低下モデルを作成した。LPS 投与 6 時間後の心エコーによる心機能評価では、WT マウスに比較して APN-KO マウスで左室腔の拡大と心機能低下を認めた。現在その機序等を詳細に検討している。



(3) 急性腎障害におけるアディポネクチンの役割検討

WT マウスおよび APN-KO マウスに対して、片腎摘出後 45 分再灌流傷害による急性腎不全モデルを作成。尿細管周囲毛細血管イメージングを用いて、尿細管周囲毛細血管血流速度の定量解析を行った。APN-KO マウスは、AKI モデル作成 24 時間後の尿細管周囲毛細血管血流速度が低下しており、著しい腎微小循環障害を呈していた。また、APN-KO マウスではモデル作成後の腎組織で、Akt のリン酸化が低下しており、また、尿細管細胞を用いた検討で、アディポネクチン添加にて Akt のリン酸化が時間依存的に認められたことより、Akt の関与が示唆された。現在更に詳細な検討を押し進めている。

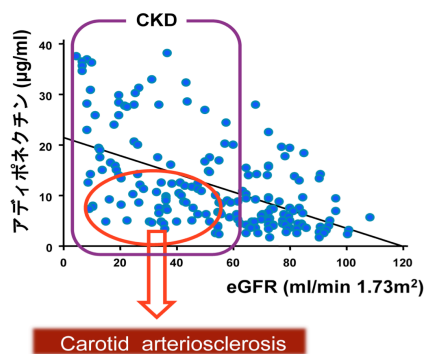
(4) 心腎疾患とアディポネクチンの臨床的検討

慢性腎臓病 (CKD) 患者における血中アディポネクチン濃度の測定や頸動脈エコーによる Carotid atherosclerosis の評価を行うことにより、アディポネクチンと心血管疾患、腎疾患の関わりを検討した。

95 名の CKD 患者 (eGFR<60ml/min/1.73m²) と 84 名の nonCKD 患者で、一般血液生化学検査や estimated glomerular filtration rate (eGFR) の測定を行った。ラテックス法を用いて、血清アディポネクチン濃度を測定した。また、頸動脈エコーを行い、内中膜複合体 (IMT) やプラークスコアを測定した。Carotid atherosclerosis (+) は、IMT>1.2mm もしくは、プラークスコア>5mm で判定した。

性差や BMI、喫煙歴、脂質異常症に関しては CKD 患者群と nonCKD 患者群で差異はなかった。年齢や HbA1c、Ht 値、アルブミン値、高感度 CRP 値、高血圧症は CKD 患者群で有為に多かった。アディポネクチン濃度は CKD 患者群で有為に高値を示し、eGFR 値と負の相関を示した。また、CKD 患者群では、Carotid atherosclerosis の合併症例が多かった。次に、CKD 患者群における、Carotid atherosclerosis とアディポネクチン濃度との関係を検討した。ROC 解析にてアディポネクチン値のカットオフ値を求め (12.3ug/ml)、高アディポネクチン群と低アディポネクチン群に 2 分割し検討を行った。eGFR 値は、低アディポネクチン群で有為の高値を示した。Carotid atherosclerosis 合併症例も、低ア

ディポネクチン群で、有為に多かった。また、CKD 患者における Carotid atherosclerosis の関連因子を検討するため、多変量解析を行ったところ、低アディポネクチン血症と糖尿病が、Carotid atherosclerosis の有為な関連因子であった。以上から、CKD 患者群で、かつ、低アディポネクチン血症を有するケースでは、Carotid atherosclerosis が有為に進展していた（下図）。



このように、相対的な低アディポネクチン血症は、腎障害を有する患者においても、心血管イベントリスクや動脈硬化のリスクとなりうる可能性がある。アディポネクチン濃度測定は、CKD 患者における動脈硬化病変の進展評価に有用であると考えられた。

(5) アディポネクチン パラログ: CTRP9 の心血管保護作用の検討

アディポネクチンの心血管保護作用を検討する中で、アディポネクチン パラログ、C1q/TNF-related protein (CTRP)9 を同定した。そこで CTRP9 の心血管病に対する作用を検討した。CTRP9 は cAMP の増加により平滑筋での ERK の活性を抑制し、細胞増殖抑制効果を発揮した。その結果、マウスにおける CTRP9 過剰発現は血管傷害に伴う血管リモデリングを抑制し得た。アディポネクチン欠損マウスに対して CTRP9 を投与しても血管傷害後の内膜肥厚は抑制されることから、CTRP9 は、アディポネクチンと独立した血管リモデリング抑制作用を有すると考えられた。また、CTRP9 の過剰発現は心筋細胞にて抗アポトーシス作用を発揮し、マウス虚血再灌流障害後の梗塞サイズを縮小した。虚血性心疾患においても CTRP9 は保護的に働くことが明らかとなった。

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 15 件) (すべて査読有)

1. Uemura Y, Shibata R, Ohashi K, Enomoto T, Kambara T, Yamamoto T, Ogura Y, Yuasa D, Joki Y, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T and Ouchi N. Adipose-derived factor CTRP9 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *FASEB*

journal. 2013;27:25-33.

2. Shimizu Y, Shibata R, Ishii M, Ohashi K, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Kataoka Y, Kihara S, Murohara T and Ouchi N. Adiponectin-mediated modulation of lymphatic vessel formation and lymphedema. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2:e000438.

3. Shibata R, Murohara T and Ouchi N. Protective role of adiponectin in cardiovascular disease. *Current medicinal chemistry*. 2012;19:5459-66.

15. Ogura Y, Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, Kito T, Maruyama S, Yuasa D, Matsuo K, Enomoto T, Uemura Y, Miyabe M, Ishii M, Yamamoto T, Shimizu Y, Walsh K and Murohara T. Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. *Circulation*. 2012;126:1728-38.

4. Maruyama S, Shibata R, Kikuchi R, Izumiya Y, Rokutanda T, Araki S, Kataoka Y, Ohashi K, Daida H, Kihara S, Ogawa H, Murohara T and Ouchi N. Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287:408-17.

5. Kito T, Shibata R, Kondo M, Yamamoto T, Suzuki H, Ishii M and Murohara T. Nifedipine ameliorates ischemia-induced revascularization in diet-induced obese mice. *American journal of hypertension*. 2012;25:401-6.

6. Kambara T, Ohashi K, Shibata R, Ogura Y, Maruyama S, Enomoto T, Uemura Y, Shimizu Y, Yuasa D, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T and Ouchi N. CTRP9 protein protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287:18965-73.

7. Enomoto T, Shibata R, Ohashi K, Kambara T, Kataoka Y, Uemura Y, Yuasa D, Murohara T and Ouchi N. Regulation of adiponectin/CTRP12 cleavage by obesity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;428:155-9.

8. Tanimura D, Shibata R, Izawa H, Hirashiki A, Asano H, Murase Y, Miyata S, Nakatochi M, Ouchi N, Ichihara S, Yasui K, Yoshida T, Naruse K, Matsubara T and Yokota M. Relation of a common variant of the adiponectin gene to serum adiponectin concentration and metabolic traits in an aged Japanese population. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011;19:262-9.

9. Shibata R, Takahashi R, Kataoka Y, Ohashi K, Ikeda N, Kihara S, Murohara T and Ouchi N. Association of a fat-derived plasma protein omentin with carotid artery intima-media thickness in apparently healthy men. *Hypertension research*. 2011;34:1309-12.

10. Shibata R, Ouchi N, Kikuchi R, Takahashi R, Takeshita K, Kataoka Y, Ohashi K, Ikeda N, Kihara S and Murohara T. Circulating omentin is associated with coronary artery disease in men.

Atherosclerosis. 2011;219:811-4.

11. Maruyama S, Shibata R, Ohashi K, Ohashi T, Daida H, Walsh K, Murohara T and Ouchi N. Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:32790-800.

12. Enomoto T, Ohashi K, Shibata R, Higuchi A, Maruyama S, Izumiya Y, Walsh K, Murohara T and Ouchi N. Adipolin/C1qdc2/CTRPI2 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:34552-8.

13. Essick EE, Ouchi N, Wilson RM, Ohashi K, Ghobrial J, Shibata R, Pimentel DR and Sam F. Adiponectin mediates cardioprotection in oxidative stress-induced cardiac myocyte remodeling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301:H984-93.

14. Hayashi M, Shibata R, Takahashi H, Ishii H, Aoyama T, Kasuga H, Yamada S, Ohashi K, Maruyama S, Matsuo S, Ouchi N, Murohara T and Toriyama T. Association of adiponectin with carotid arteriosclerosis in predialysis chronic kidney disease. *American journal of nephrology*. 2011;34:249-55.

15. Kitamura K, Shibata R, Tsuji Y, Shimano M, Inden Y and Murohara T. Eicosapentaenoic acid prevents atrial fibrillation associated with heart failure in a rabbit model. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;300:H1814-21.

〔学会発表〕(計 5 件)

海外招待講演等

1. Shibata R, Ouchi N, Kikuchi R, Takahashi R, Takeshita K, Kataoka Y, Ohashi K, Ikeda N, Murohara T. Association of a fat-derived hormone “omentin” with coronary artery disease in men. The 84th Scientific Sessions of American Heart Association, November 14th, 2011 (Orland, USA)

2. Shibata R: Adiponectin and ischemic heart disease, The 41th Annual Convention and Scientific Session, Taiwan Society of Cardiology, May 14th, 2011 (Taipei, Taiwan)

国内招待講演

1. 柴田玲 大内乗有、室原豊明：エイジングとアディポサイトカイン：脳心血管抗加齢研究会 2013：2013 年 12 月 14 日 大阪市 梅田スカイビル

2. 柴田玲 大内乗有、室原豊明：血管障害とアンチエイジング：第 35 回日本高血圧学会総会：2012 年 9 月 20 日 名古屋市 名古屋キャッスルホテル

3. 柴田玲 大内乗有、室原豊明：アディポサイトカインと血管新生：第 85 回日本内分泌学会学術総会：2012 年 4 月 19 日 名古屋市 名古屋市国際会議場

〔図書〕(計 2 件)

1. 柴田玲、大内乗有、室原豊明：脂肪組織と循環器疾患，カラー版 循環器病学 アップデート版 I, 6(19-24), 2013.

2. 柴田玲、室原豊明：アディポサイトカインと再生医療，循環器再生医学の現状と展望（室原豊明編），6(195-200), 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 5 件)

1. 名称：新規生理活性ペプチド及びその用途
発明者：室原豊明、大内乗有、柴田玲、大橋浩二、関真美、土肥武

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2014-028657 (JP)

出願年月日：2014 年 2 月 18 日

国内外の別：国内

2. 名称：アディポネクチン蛋白の冠動脈内投与法による心筋梗塞治療の開発

発明者：柴田玲、室原豊明

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：13/793,931 (US)

出願年月日：2013 年 3 月 11 日

国内外の別：国外

3. 名称：生体組織を活性化する方法及びその装置

発明者：山本徳則、柴田玲、淵真吾、竹田美和、鈴木哲、室原豊明、後藤百万、石井正和

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2011-274984 (JP)

出願年月日：2011 年 12 月 15 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等(抜粋)

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/junnai/junnai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 玲 (SHIBATA REI)

名古屋大学・医学系研究科・

特任講師

研究者番号：70343689

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし