

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01734

研究課題名(和文) 臓器結合型アディポネクチンによる心疾患抑制機構と治療的効果に関する研究

研究課題名(英文) Studies on heart-bound adiponectin for heart disease suppression and therapeutic effect

研究代表者

井上 敬夫 (INOUE, Takao)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：00441006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでのアディポネクチン研究では、主に血中アディポネクチンと疾患との関連に関する研究がなされてきた。抗生活習慣病ホルモンであるアディポネクチンは疾患との間に負の相関性があることが報告されている。我々は新規のアディポネクチンとして臓器結合型の存在を明らかにしており、心筋結合型アディポネクチンと高血圧及び心肥大との関連性を検討した。その結果、血中アディポネクチンではなく、心筋結合型アディポネクチンに心肥大との負の相関性が強く示されたが、血圧との関連性はみられなかった。心筋における遺伝子発現解析から、心筋結合型アディポネクチンを介して高血圧や心肥大にに関連していると考えられる遺伝子が見出された。

研究成果の概要(英文)：Researches on adiponectin have been focused on the relationship between adiponectin in blood and diseases. These researches show that adiponectin in blood and diseases have inverse correlation because adiponectin is anti-metabolic syndrome hormone. Recently, we discovered organ-bound adiponectin as a novel adiponectin. We assessed the relationship between heart-bound adiponectin and hypertension or cardiac hypertrophy. The result showed that heart-bound adiponectin, but not serum adiponectin, inversely correlated with cardiac hypertrophy. Further analysis of gene expression in heart showed that there are genes might be involved in hypertension and cardiac hypertrophy via heart-bound adiponectin.

研究分野：生活習慣病

キーワード：臓器結合型アディポネクチン 心肥大 高血圧

1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪細胞から分泌されるアディポカインの1種であるアディポネクチンの分泌異常が生活習慣病をはじめとする様々な疾患と関連していることが報告されている。生体内に存在するアディポネクチンには3量体、6量体、12~18量体(高分子多量体、HMW)があり、多量体が高分子になるほど生活習慣病に対する抑制効果が高くなる。アディポネクチン受容体としては、AdipoR1、AdipoR2、T-cadherinの3種類が報告されている。中でもT-cadherinは6量体以上のアディポネクチン多量体とのみ結合することが知られているが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。

我々は、T-cadherinを含めた細胞接着分子と生活習慣病の関係について研究を行っており、細胞接着分子の発現異常や構造変化が生活習慣病と関係していることを明らかにしてきた。中でも我々が見出した高アディポネクチン血症ラットを解析したところ、高アディポネクチン血症状態は骨格筋におけるT-cadherinの発現低下により、骨格筋に結合できなかったアディポネクチンが血中濃度を上昇させた結果であった。更に、この現象が生活習慣病の発症を引き起こすこともわかった。これによりアディポネクチンには臓器に結合し続けることで機能を発揮する臓器結合型アディポネクチンが存在することが明らかとなった。

我々は最近、自然発症の高血圧により脳卒中を発症するラット(SHRSP)の高血圧発症に伴う脂肪組織の萎縮がアディポネクチンの分泌低下を引き起こすことを報告した。更に研究を進めた結果、SHRSPラットの肥大した心臓において、T-cadherinの発現減少とそれに伴う臓器結合型アディポネクチンの低下が観察された。これは、分泌異常と受容体の発現低下により心筋細胞に対するアディポネクチン作用不足が生じていることを意味している。アディポネクチンが心肥大の抑制効果を有することは報告されているが、6量体以上の臓器結合型アディポネクチンによる作用機序は明らかとなっていない。

本研究では、これまで研究対象とされなかった臓器結合型アディポネクチンに焦点を当てることで、これまでのアディポネクチン研究からの新たな展開や治療への利用といった応用へ向けての足掛かりとしていきたい。

2. 研究の目的

アディポネクチンの分泌異常が生活習慣病をはじめとする様々な疾患と関連していることが報告されてきた。そのような中、我々は新規に見出した高アディポネクチン血症ラットについて解析し、臓器に結合し

続けて機能する臓器結合型アディポネクチンの重要性について明らかにした。これまでのアディポネクチン研究では臓器結合型という概念が存在しなかったため、生活習慣病をはじめとする疾患とアディポネクチンの関連性について調べた研究は血中のアディポネクチン濃度と多量体解析による評価が主流であった。従って、本研究により血中アディポネクチンと臓器結合型アディポネクチンに関するデータを合わせて評価する必要がある疾患が存在することを提案でき、これまでのアディポネクチン研究に更に有益な情報を提供することができる。

本研究により臓器結合型アディポネクチンの疾患との関連性だけでなく、その作用機構の解明に向けた新たなアディポネクチンの研究が展開できると考えている。

3. 研究の方法

(1) 高血圧モデルラット亜種間における血中アディポネクチンと心疾患の関連性

正常血圧ラット WKY、高血圧ラット SHR(C[血圧低め]、B2[血圧高め])及び脳卒中発症ラット SHRSPにおいて血圧差の少ない状態(6週齢)から高血圧状態(12週齢)、脳卒中発症状態(20週齢)の雄性ラット(n=8)に対して血圧及び血中アディポネクチン濃度の測定、心重量/体重や組織学的解析による心肥大の評価を行った。血中アディポネクチンに対する心重量/体重、顕微鏡的評価(心筋サイズ、左室壁厚、線維化面積)、血圧との関連を亜種間及び週齢間において統計的に評価した。

(2) 高血圧モデルラット亜種間における臓器結合型アディポネクチンと心疾患の関連性

上記(1)において採取した左心室壁抽出タンパク質をウェスタンブロットに供することにより臓器結合型アディポネクチン及び多量体組成の検出を行った。アディポネクチン量はGAPDHにより補正した。臓器結合型アディポネクチンに対する心重量/体重、顕微鏡的評価(心筋サイズ、左室壁厚、線維化面積)、血圧との関連を亜種間及び週齢間において統計的に評価した。

(3) 高血圧モデルラット亜種間における心筋の発現遺伝子解析

上記(1)において採取した左心室壁よりRNAを回収し、RNA 6000 nano assay(Agilent)によりRNAの品質を確認し、RIN値が ≥ 8.2 のものをマイクロアレイ解析した。マイクロアレイ解析には、Clariom S rat (Affumetrix)を用い、各群間において発現差(fold change ≥ 1.5 、 ≤ -1.5 、 $p < 0.05$)のみられる遺伝

子を選出した。これらの遺伝子に対して Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN) を用いて比較解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 血圧は、WKY、SHR C、SHR B2、SHRSP の順に上昇がみられた。6 週齢の SHR C と B2 間を除いては全ての週齢で全ての群間において有意に差がみられた。血圧とは対照的に体重は減少し、同週例における血圧と体重間には負の相関関係がみられた。この関係は、脂肪組織重量(精巢上体及び後腹膜脂肪組織)においてもみられた。心/体重比を算出した結果、全週齢において血圧との間に正の相関関係がみられた。血中アディポネクチンに関しては、6 週齢ではラット間における差はみられなかった。12 週齢では SHR B2、SHRSP が WKY、SHR C より有意に高かった。20 週齢では、SHRSP が他のラットより、SHR B2 が WKY より有意に高値を示した。これらの結果は、血中アディポネクチン量と高血圧や心肥大との間に必ずしも関連性がないことを示唆している。
- (2) 左室壁より抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析は、アディポネクチンが SHRSP でのみ有意に低下していた。また多量体アディポネクチンの受容体である T-cadherin についてもアディポネクチンと同様の結果が得られた(図1)。これらの結果は、左室壁における T-cadherin の発現低下が心筋へのアディポネクチンの結合低下を引き起こしていることを示唆している。

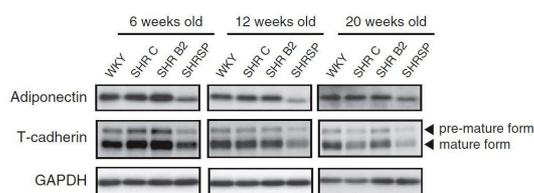


図 1. 左室壁より抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析

更に心筋結合アディポネクチンの多量体解析を行った結果、12~18 量体 (HMW) に関しては SHRSP のみ有意な低下がみられたが、6 量体では 12 週齢のみ SHRSP は他のラットに対して有意な低下がみられたが、6 及び 20 週齢では SHRSP は SHR C に対してのみ有意に低下していた(図 2)。

心筋におけるアディポネクチンの発現が報告されていることから、左室壁におけるアディポネクチン遺伝子発現を調べた。その結果、全週齢及び全群間にお

いて差がみられなかった。また、検出された発現量は血中及び心筋結合型アディポネクチンに影響を及ぼす量ではないこと、またアディポネクチン分泌臓器である脂肪組織においてみられる単量体ダブレットが確認されないことから、これまでに報告されている心筋におけるアディポネクチンの発現は明確に否定された。

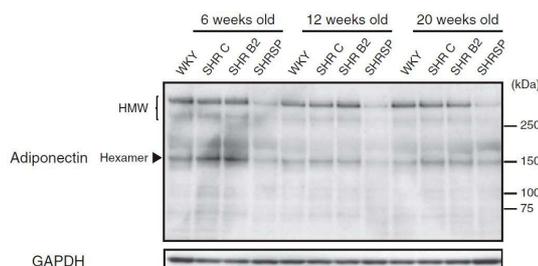


図 2. 左室壁タンパク質のアディポネクチン多量体解析

心筋結合型アディポネクチンの作用機序を調べるために、アディポネクチンの一般的なシグナル経路として知られている AMP-activated kinase 及び Acetyl-CoA carboxylase についてリン酸化の定量を行ったが、ラット間において有意な差がみられなかった。これは臓器結合型アディポネクチンがこれまで考えられていた経路でシグナルが伝達されるのではなく、新規の経路を利用していることを示唆している。

心筋薄切標本に対して HE 染色、マツソントリクローム (MT) 染色及びシリウスレッド (SR) 染色を行い、心筋の組織学的解析を行った(図 3)。

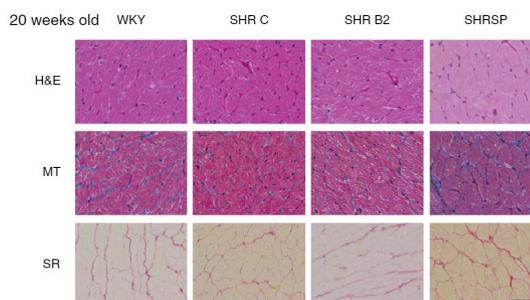


図 3. 心筋の組織学的解析 (20 週齢)
Bar 50µm

心筋断面積は、すべての週齢において SHRSP が他のラットより有意に大きかった。SHRSP 以外のラット間では有意な差はみられなかった。心筋における線維の占める割合(線維化率)は、6 週齢では WKY が他のラットに対して有意に低く、12 週齢では全てのラット間で差はみられな

った。20 週齢では SHRSP が SHR B2 に対してのみ有意に高かった。

心筋断面積、左室壁厚及び線維化率に対して心筋アディポネクチン(単量体、6 量体および HMW)との相関関係を調べた(表 1)。

表 1 心筋結合型アディポネクチンと組織学低解析との相関関係

	6W	12W	20W
心筋断面積			
単量体	-	Negative	Negative
6 量体	Negative	Negative	Negative
HMW	Negative	Negative	Negative
左室壁厚			
単量体	-	Negative	Negative
6 量体	-	Negative	Negative
HMW	-	Negative	Negative
線維化率			
単量体	-	-	Negative
6 量体	-	-	Negative
HMW	-	-	-

Negative, 負の相関; -, 相関性なし

心筋断面積は、6 量体および HMW において全週齢で、単量体では 12 及び 20 週齢で負の相関関係がみられた。左室壁圧は 12 及び 20 週齢においてどのタイプのアディポネクチンでも負の相関関係が確認された。しかしながら、線維化率は 20 週齢の単量体及び 6 量体でのみ負の相関性がみられ、HMW ではみられなかった。これらの結果は、心筋断面積の肥大の抑制には、6 量体と HMW の心筋結合型アディポネクチンの両方が関与しているが、線維化の抑制には 6 量体のみが関与していることが示唆された。

(3)WKY, SHR B2 及び SHRSP の左室壁より抽出した RNA に対してマイクロアレイ解析を行ったところ、表 2 に示すような発現遺伝子の増減がみられた(fold change ≥ 1.5 、 ≤ -1.5 、 $p < 0.05$)。

表 2 . 遺伝子発現解析(左室壁)

	WKY	SHR B2	SHRSP
WKY (発現増加)	-	377	627
SHR B2 (発現増加)	375	-	378
SHRSP (発現増加)	580	398	-

Ingenuity Pathway Analysis による解析 WKY vs SHR B2, WKY vs SHRSP, SHR B2 vs SHRSP 間での比較解析を行った(図 4)。

アディポネクチンの心筋への作用状態を鑑みると、WKY vs SHRSP 及び SHR B2 vs SHRSP で共通にみられる 257 の遺伝子(図 4、四角で囲まれた部分)の中に、アディポネクチン関連遺伝子が存在する可能性が考えられた。

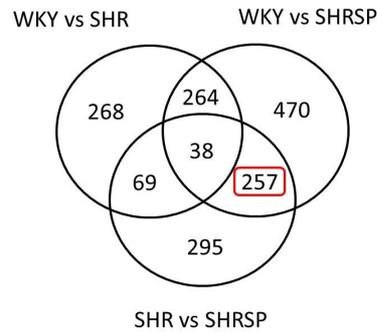


図 4 . 高血圧ラット間における心筋発現遺伝子の比較解析

この 257 の遺伝子の中から、更に SHRSP においてのみ発現が有意に増減するものを選び出した。心筋結合型アディポネクチンに関連した遺伝子として最終的に 13 個の遺伝子にまで絞り込むことができた。

これまで血中アディポネクチン濃度と疾患との間に負の相関関係があるとの考えが、一般化している現状において、本研究は心筋結合型アディポネクチンが血中アディポネクチン濃度よりも心肥大との関連性が高いことを示した。更に、この心筋結合アディポネクチンと心肥大に関連する候補遺伝子を選び出した。今後は候補遺伝子について心肥大との関連性及びアディポネクチンの心筋保護作用について詳細に検討していく予定である。

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 6 件)

1. Inoue, T. (責任著者), Takemori, K., Mizuguchi, N., Kimura, M., Chikugo, T., Hagiya, M., Yoneshige, A., Mori, T., Maenishi, O., Kometani, T., Itoh, T., Satou, T., Ito, A. (2017) Heart-bound adiponectin, not serum adiponectin, inversely correlates with cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Exp. Physiol.* 102, 1435-1447. 査読有
2. Hagiya, M., Yabuta N, Okuzaki D, Inoue T. Takashima Y, Kimura R, Ri A, Ito A. (2017) Modest static pressure

- suppresses columnar epithelial cell proliferation in association with cell shape and cytoskeletal modifications. *Front Physiol.* 2017 Dec 5;8:997. doi: 10.3389/fphys.2017.00997. eCollection 2017. 査読有
3. Takashima, Y., Murakami, T., **Inoue, T.**, Hagiyaama, M., Yoneshige, A., Nishimura, S., Akagi, M., and Ito, A. (2017) Manifestation of osteoblastic phenotypes in the sarcomatous component of epithelial carcinoma and sarcomatoid carcinoma. *Tumor Biol.* 39: 1010428317704365. 査読有
 4. Yoneshige, A., Hagiyaama, M., **Inoue, T.**, Tanaka, T., Ri, A., Ito, A. (2017) Modest Static Pressure Can Cause Enteric Nerve Degeneration Through Ectodomain Shedding of Cell Adhesion Molecule 1. *Mol. Neurol.* 54, 6378-6390. 査読有
 5. Hagiyaama, M., Yoneshige, A., **Inoue, T.**, Sato, Y., Mimae, T., Okada, M., Ito, A. (2015) The intracellular domain of cell adhesion molecule 1 is present in emphysematous lungs and induces lung epithelial cell apoptosis. *J Biomed Sci.* 22:67. 査読有
 6. Yoneshige, A., Hagiyaama, M., **Inoue, T.**, Mimae, T., Kato, T., Okada, M., Enoki, E., Ito, A. (2015) Increased ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1 as a cause of type II alveolar epithelial cell apoptosis in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Respir. Res.* 16, 90. 査読有
- [学会発表](計 10件)
1. **井上敬夫**, 萩山満、水口信行、木村竜一朗、前西修、筑後孝章、木村雅友、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦 (2018.3) 脳卒中ラット SHRSP において発育低下がみられる骨格筋の遺伝子発現解析 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋)
 2. 大田美香、細川陽一郎、波多野直哉、菅野亜紀、**井上敬夫**、鈴木高史、伊藤彰彦、高岡 裕 (2017.12) 鍼治療としてのフェムト秒レーザー照射 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (神戸)
 3. **井上敬夫**、竹森久美子、水口信行、木村雅友、筑後孝章、萩山満、米重あづさ、森樹史、前西修、米谷俊、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦(2017.5) アディポネクチン高分子多量体の心筋結合量は心筋細胞肥大と負の相関関係にある 第 71 回 日本栄養・食糧学会大会 (沖縄)
 4. **井上敬夫**、竹森久美子、水口信行、木村雅友、筑後孝章、萩山満、米重あづさ、森樹史、前西修、米谷俊、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦(2017.3) 心筋結合型アディポネクチンは血圧ではなく、心肥大と相関する 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都)
 5. **Inoue, T.**, **Takemori, K.**, Mizuguchi, N., Kimura, M., Chikugo, T., Hagiyaama, M., Yoneshige, A. Mori, T., Kometani, T., Itoh, T., Satou, T., and Ito, A. (2016.9) Heart-bound adiponectin, not serum adiponectin, correlates with cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Seoul, Korea.
 6. 米重あづさ、村上哲平、**井上敬夫**、西村俊司、伊藤彰彦 (2016.5) 悪性上皮性腫瘍内の肉腫様成分における骨芽

細胞分化マーカーの発現 第 105 回
日本病理学会 (仙台)

7. 萩山 満、米重あづさ、**井上敬夫**、伊藤彰彦 (2016.5) 接着分子 cell adhesion molecule 1 の細胞内断片による肺胞上皮アポトーシス誘導：肺気腫発症への関与 第 105 回 日本病理学会 (仙台)
8. **井上敬夫**、萩山満、米重あづさ、榎木英介、前西修、筑後孝章、木村雅友、佐藤隆夫、伊藤彰彦(2015.4) 2 型糖尿病患者の脾臓における接着分子 CADM1 は細胞外ドメインの切断が亢進している 第 104 回 日本病理学会総会 (名古屋)
9. 萩山満、**井上敬夫**、米重あづさ、伊藤彰彦(2015.5) アクチン結合性アダプター蛋白 α -parvin は偽足突起に局在し、小葉乳癌のリンパ節転移に関与する 第 104 回 日本病理学会総会 (名古屋) 口頭発表
10. 米重あづさ、**井上敬夫**、萩山満、伊藤彰彦(2015.5) 特発性間質性肺炎における肺上皮接着分子 CADM1 の発現異常 第 104 回 日本病理学会総会 (名古屋)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 敬夫 (INOUE, Takao)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：00441006

(2)研究分担者

竹森 久美子 (TAKEMORI, Kumiko)
近畿大学・農学部・准教授
研究者番号：00288888