

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15308

研究課題名(和文)新規アディポサイトカイン「CTRP1」の虚血性心疾患における役割の解明

研究課題名(英文)Role of C1q/TNF-related protein 1 in ischemic heart disease

研究代表者

大内 乗有 (OUCHI, NORIYUKI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：00595514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来血中蛋白であるC1q/TNF-related protein (CTRP)1の虚血性心疾患に対する作用を解析した結果、CTRP1は心筋虚血再灌流障害に防御的に作用することが明らかとなった。CTRP1欠損マウスは対照マウスと比べて、虚血再灌流後の心筋梗塞サイズが増加し、心筋組織での炎症反応とアポトーシスの増加を伴っていた。CTRP1の心筋保護機序は、心筋細胞におけるサイクリックAMPシグナル経路の活性化による炎症抑制とアポトーシス抑制を介していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We found that the adipokine C1q/TNF-related protein (CTRP) 1 is protective against acute cardiac injury following ischemia-reperfusion (I/R). CTRP1 knockout mice showed increased infarct size after I/R compared with control mice, which were accompanied by enhanced apoptosis and inflammatory response in ischemic heart. Administration of CTRP1 to wild-type mice led to reduction of myocardial infarct size following I/R. Furthermore, CTRP1 attenuated apoptosis and inflammatory reaction in cardiac myocytes by its ability to promote cyclic AMP-dependent pathway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子心臓病態学 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

我が国をはじめとする先進国では虚血性心疾患、特に急性心筋梗塞などの急性冠症候群の発症率や死亡率は高く、これらの病態解明と有効な治療法の開発は最重要課題である。肥満、特に内臓脂肪蓄積は、糖尿病、高脂血症、高血圧を高率に合併するメタボリックシンドロームやその終末像である虚血性心疾患の重要な発症基盤である。しかし、肥満による心血管病の発症・進展機序は分子レベルにおいて十分には解明されていない。

近年の研究により、脂肪組織はアディポサイトカイン（あるいはアディポカイン）と総称すべき生理活性物質を分泌する内分泌臓器であることが示された。そして、申請者や他の研究グループの研究成果により、肥満状態におけるアディポサイトカインの産生異常が肥満合併症の病態に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。

申請者らは、マウス脂肪組織の発現遺伝子解析の過程で、肥満によって発現が増加し脂肪に高発現しているアディポネクチンパラログ C1q/TNF-related protein (CTRP)1 を見いだした。CTRP1 は糖代謝改善作用や血小板凝集抑制作用を有するとの報告があるが、その機能については十分に解明されておらず、CTRP1 の心血管病に対する作用については全く不明である。

2. 研究の目的

我が国において、虚血性心疾患の病態解明と治療法の確立は最重要課題である。本研究では、CTRP1 による虚血性心疾患に対する作用と分子メカニズムを個体レベルと細胞レベルで明らかにすることにより、CTRP1 を標的分子とした心血管疾患の病態生理解明と治療応用へと展開することを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 心筋虚血障害に対する個体レベルでの評価

①心筋虚血再灌流モデル：マウスの左冠動脈前下行枝を 60 分間血流遮断後に再灌流し 24 時間後に心臓を摘出した。CTRP1 欠損マウスと対照である野生型マウスに対して心筋虚血再灌流モデルを作成し、心筋虚血障害における内因性 CTRP1 の役割を検討した。また、アデノウイルス発現系を用いて、CTRP1 ベクターとコントロールベクターを野生型マウスに全身投与し、血中 CTRP1 を持続的に増加させて CTRP1 の心筋虚血障害に対する効果を評価した。

②摘出心の形態学的、組織学的検討：Evans Blue/TTC 染色を行い、左室エリア、虚血エリア、梗塞エリアを同定し、心筋梗塞サイズの定量化を行った。

③メカニズム解析：心筋組織における炎症性サイトカイン (TNF, IL-6, IL-1 β) の発現を Real-time PCR 法にて定量評価した。アポトーシスへの影響を TUNEL 染色にて検討した。シグナル伝達系物質である cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化をウエスタンブロッティング法により評価した。

(2) 心筋細胞に対する細胞レベルでの評価

①心筋細胞培養：ラット胎児から採取した心筋細胞を培養した。リコンビナント CTRP1 蛋白を培養液中に添加して効果を検討した。また、adenylyl cyclase 阻害剤である SQ22536 や Sphingosine-1-phosphate receptor (S1PR) 1 と S1PR3 に対する拮抗剤である VPC23019 を前処理した。

②アポトーシスの解析：低酸素再酸素化状態でアポトーシスを誘導した。TUNEL 染色でアポトーシスを評価した。

③炎症性反応の解析：リポ多糖類 (LPS) 刺激後の炎症性サイトカイン (TNF, IL-6, IL-1 β) を Real-time PCR 法にて定量した。

④シグナル伝達経路の解析：NF- κ B のリン酸化をウエスタンブロッティング法により評価した。細胞内 cAMP を ELISA 法にて定量した。

4. 研究成果

(1) CTRP1 の急性心筋虚血障害に対する作用

CTRP1 欠損マウスと対照マウスに心筋虚血再灌流モデルを作成した。CTRP1 欠損マウスは対照マウスに比べ、心筋虚血再灌流後の心筋梗塞のサイズが有意に増加していた。従って、内因性 CTRP1 は急性心筋障害に対して保護的に作用することが明らかとなった (図 1)。

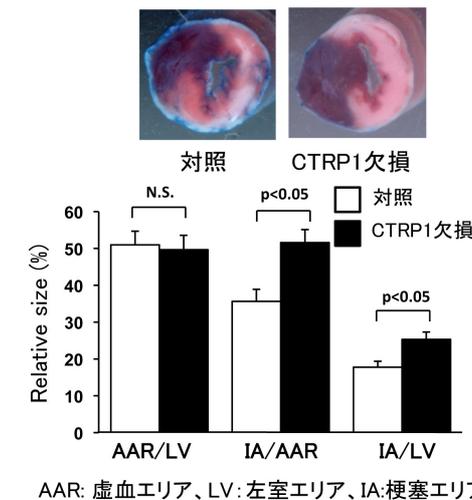
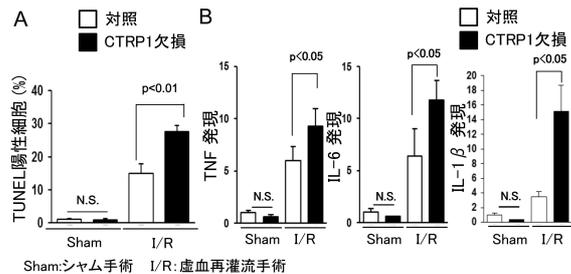


図1. マウス心筋虚血再灌流障害に対する内因性CTRP1の作用

心筋のアポトーシスは虚血再灌流障害の進展に重要であるため、CTRP1 のアポトーシスに対する作用を TUNEL 染色で検討した。CTRP1

欠損マウスは対照マウスに比べ、虚血心筋での TUNEL 陽性細胞数は有意に増加しており、CTRP1 は心筋アポトーシスに対して抑制的に作用していると考えられた (図 2A)。さらに、CTRP1 の心筋組織における炎症反応に対する作用を検討した。CTRP1 欠損マウスは対照マウスに比べ、虚血心筋における TNF、IL-6 と IL-1 β の発現が有意に増加していた (図 2B)。以上より、マウスにおいて内因性 CTRP1 は心筋組織でのアポトーシスと炎症に対して抑制的に働き、心筋虚血再灌流障害に防衛的に作用することが明らかとなった。



Sham: シャム手術 I/R: 虚血再灌流手術

図2. CTRP1のマウス心筋におけるアポトーシスと炎症性サイトカイン発現に対する作用

次に、CTRP1 投与のマウス心筋虚血再灌流障害に対する作用の検討のため、アデノウイルス発現系を用いて CTRP1 ベクターとコントロールベクターを野生型マウスに静脈内全身投与し、心筋虚血再灌流モデルを作成した。CTRP1 の全身投与はコントロールと比べて血中 CTRP1 濃度は約 5 倍上昇した。CTRP1 投与はコントロールに比し虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを著明に縮小させた。また、CTRP1 投与は虚血心筋における心筋細胞のアポトーシスを有意に抑制していた。さらに、CTRP1 投与は虚血再灌流後の心筋組織における TNF、IL-6 と IL-1 β の発現を有意に抑制していた。従って、血中 CTRP1 濃度の増加は心筋虚血再灌流障害保護につながると考えられた。

(2) 培養心筋細胞における CTRP1 の抗アポトーシス作用

CTRP1 が心筋細胞に直接作用し、アポトーシスを制御するかを検討するために、低酸素再酸素化 (H/R) 刺激によって培養心筋細胞のアポトーシスを誘導した。アポトーシスを TUNEL 染色にて検出すると、CTRP1 蛋白添加は心筋細胞のアポトーシスを濃度依存的に抑制していた (図 3A)。CTRP1 によるアポトーシス抑制作用の機序解明のため、抗アポトーシスシグナル分子である cAMP の関与を検討した。CTRP1 を心筋細胞に添加すると細胞内の cAMP の量が増加した。また、CTRP1 の全身投与により、マウス虚血心筋における CREB のリン酸化が増加していた。さらに、培養心筋細胞に adenylyl cyclase 阻害剤である SQ22536 を前処理すると CTRP1 によるアポトーシス抑制作用は解除された (図 3B)。従って、CTRP1 に

よる心筋細胞におけるアポトーシス抑制作用は cAMP シグナルを介していると示唆された。

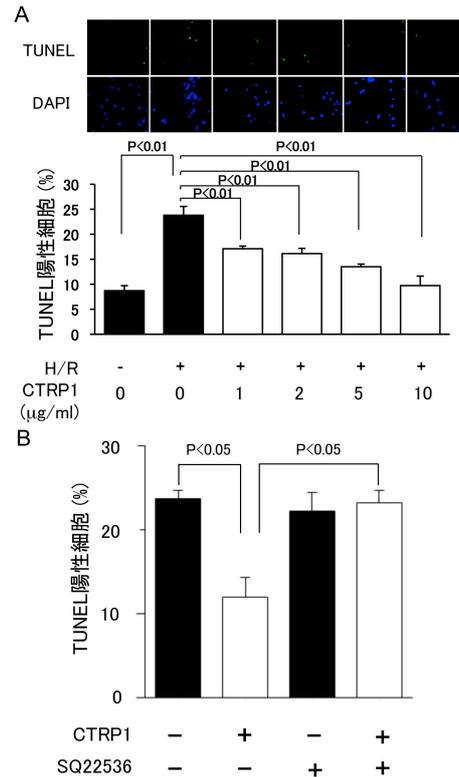


図3. CTRP1はcAMPを介して心筋細胞のアポトーシスを抑制する

(3) 培養心筋細胞における CTRP1 の抗炎症作用

CTRP1 が心筋細胞の炎症性変化を制御するかを検討するために、培養心筋細胞を CTRP1 前処理後に LPS 刺激を行った。LPS 刺激により TNF、IL-6 と IL-1 β の発現は著明に増加したが、CTRP1 蛋白の前処理により有意に抑制された (図 4A)。さらに、adenylyl cyclase 阻害剤 SQ22536 を心筋細胞に前処理すると CTRP1 による LPS 刺激後の TNF、IL-6 と IL-1 β の発現抑制作用が解除された (図 4B)。従って、CTRP1 は cAMP を介して心筋細胞の炎症反応を抑制することが明らかとなった。

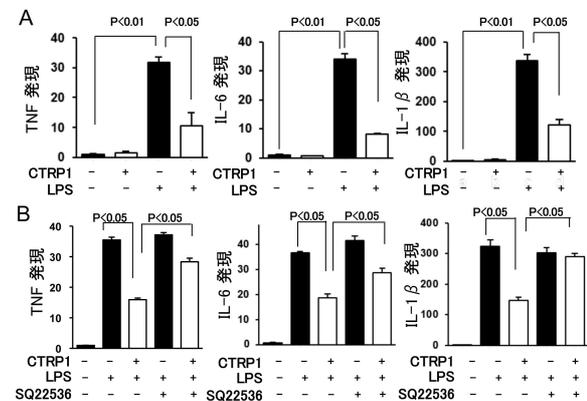


図4. CTRP1はcAMPを介して心筋細胞の炎症を抑制する
さらに、CTRP1によるcAMPを介した心筋保護作用機序の解明のために Sphingosine-1-phosphate (S1P) シグナルに

着目した。心筋細胞には S1P receptor (S1PR) 1 と S1PR3 が発現しているため、S1PR1 と S1PR3 に対する拮抗剤である VPC23019 を培養心筋細胞に前処理した。VPC23019 は CTRP1 によるアポトーシス抑制作用を解除した (図 5A)。また、VPC23019 は CTRP1 による LPS 存在下での TNF、IL-6 と IL-1 β の発現抑制作用を解除した。同様に VPC23019 は LPS により誘導される炎症に関与する転写因子 NF- κ B のリン酸化を抑制した (図 5B)。さらに、VPC23019 は CTRP1 による cAMP 増加作用を解除した。また、心筋細胞への CTRP1 添加は培養液中の S1P 濃度を増加させた。従って、CTRP1 は S1P の産生を増加させ、S1P シグナルを促進することにより cAMP を介した心筋細胞保護作用を示すと示唆された。

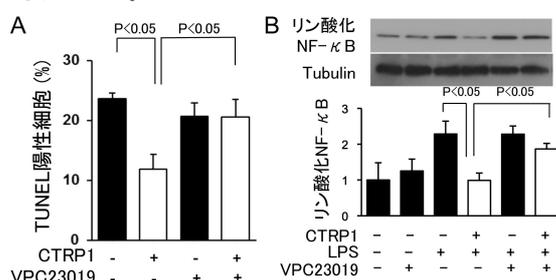


図5. CTRP1はS1Pシグナルを介して心筋細胞のアポトーシスとNF- κ Bの活性化を抑制する

以上より、CTRP1 は cAMP シグナルの活性化による心筋細胞のアポトーシスと炎症反応抑制を介した心筋保護作用を示すと考えられた。従って、CTRP1 は虚血性心疾患の病態生理解明に対する新しい標的分子になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ①. Hiramatsu-Ito M, Shibata R, Ohashi K, Uemura Y, Kanemura N, Kambara T, Enomoto T, Yuasa D, Matsuo K, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Otaka N, Kihara S, Murohara T, Ouchi N. Omentin attenuates atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. **Cardiovasc Res.** 2016;110:107-17. doi: 10.1093/cvr/cvv282. 査読有
- ②. Yuasa D, Ohashi K, Shibata R, Mizutani N, Kataoka Y, Kambara T, Uemura Y, Matsuo K, Kanemura N, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Ito M, Ogawa H, Murate T, Murohara T, Ouchi N. Clq/TNF-related protein-1 functions to protect against acute ischemic injury in the heart. **FASEB J.** 2016;30:1065-75. doi: 10.1096/fj.15-279885. 査読有

- ③. Kambara T, Shibata R, Ohashi K, Matsuo K, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Aprahamian T, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. Clq/TNF-related protein 9 protects against acute myocardial injury through an adiponectin-dependent mechanism. **Mol Cell Biol.** 2015;35:2173-85. doi: 10.1128/MCB.01518-14. 査読有
- ④. Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Ito M, Matsuo K, Kambara T, Uemura Y, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Kanemura N, Ogawa H, Daida H, Murohara T, Ouchi N. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. **Biochem Biophys Res Commun.** 2015;459:124-30. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.081. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ①. Ouchi N. Role of follistatin-like 1 as a myokine in cardiovascular disease. The 4th International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis Seoul, Korea 2015 年9月11日~12日
- ②. 大内乗有. A novel adipocytokine omentin and cardiovascular disease. 第47回日本動脈硬化学会総会学術集会 仙台国際センター (宮城県仙台市) 2015年7月9日~10日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大内 乗有 (OUCHI, Noriyuki)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号: 00595514

(2) 研究分担者

大橋 浩二 (OHASHI, Koji)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号: 10595515

柴田 玲 (SHIBATA, Rei)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号: 70343689

室原 豊明 (MUROHARA, Toyoaki)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 90299503