

令和元年5月29日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05294

研究課題名(和文)血管平滑筋細胞の脂肪酸組成と分化転換：糖尿病性動脈硬化の新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation by fatty acid composition

研究代表者

倉林 正彦 (Kurabayashi, Masahiko)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00215047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管平滑筋細胞内のエネルギー代謝の変化がどのような分子メカニズムで血管平滑筋細胞の形質変換を調節するのかを明らかにするとともに、血管傷害後の内膜増殖や増殖因子への反応性にどのような影響を及ぼすかを解析した。そして、脂肪酸組成の変化は、AMP-activated protein kinase (AMPK), KLF4, p53/p21, mTORなど細胞機能の調節に中心的な役割をもつ蛋白の発現に大きな影響を与えることを見出した。本研究の成果は、広く、細胞内エネルギー代謝が糖尿病を中心とする血管疾患の発症と進展の機序解明に貢献し得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、血管平滑筋細胞に留まらず、さまざまな細胞における脂肪酸代謝の変化が細胞の増殖や分化調節にどのような役割を持つかに関する研究と繋がり、再生医学やがん細胞の生物学にも波及しうる成果を提供しうると考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of elongation of long-chain fatty acid (LCFA) member 6 (Elovl6), a rate-limiting enzyme catalyzing the elongation of saturated and monounsaturated LCFA, in the regulation of phenotypic switching of VSMC. We demonstrate for the first time that dysregulation of Elovl6-driven LCFA metabolism induces phenotypic switching of VSMC via ROS production and AMPK/KLF4 signaling that leads to growth arrest and downregulation of VSMC marker expression. The modulation of Elovl6-mediated cellular processes may provide an intriguing approach for tackling atherosclerosis and post-angioplasty restenosis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 血管平滑筋 エネルギー代謝 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の発症と進展におけるコレステロール代謝の重要性については確立しているが、脂肪酸代謝の役割については不明の点が多い。n-6 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のアラキドン酸は、炎症惹起物質 (TAX₂ や PGE₂ など) の基質であると同時に抗炎症物質 (PGI₂ や lipoxin A₄ など) の基質でもある。血中アラキドン酸濃度は炎症性マーカーと正の相関を示す一方で、疫学研究では、n-6 の摂取量が冠動脈疾患の減少と関連することを示す報告も多い。長鎖飽和脂肪酸のパルミチン酸 (C16:0) は血管内皮細胞に対して炎症反応やアポトーシスの誘導を惹起するが、心不全発症頻度とは負の関係があるとする報告も少なくない。このように一見相反する報告となる理由として、脂肪酸がエネルギー基質、生体膜成分あるいはシグナル分子としての多彩な機能をもち、複雑な代謝を受けることその他、鎖長や飽和度の異なる脂肪酸の量比によって細胞機能に与える効果が異なることが推測される。肥満、糖尿病およびメタボリック症候群に合併する動脈硬化に脂肪酸代謝が重要な役割を持つことは基礎および臨床研究から明白である。しかし、その分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

鎖脂肪酸の鎖長伸長反応を触媒する Elovl6 の欠損マウスや欠損細胞を用いた研究から、脂肪酸組成の変化が血管平滑筋細胞の増殖および分化の調節に大きな役割をもつか否かを明らかにする。また、血管傷害後の内膜増殖や増殖因子への反応性にどのような影響を及ぼすかを解析し、血管平滑筋細胞における脂肪酸代謝を標的とする、血管疾患の新たな予防法と治療法の開発基盤とする。

3. 研究の方法

(1) Elovl6 欠損マウスを用いる実験

大腿動脈傷害モデルを作製し、新生内膜の免疫染色を行い Elovl6、平滑筋 アクチン、平滑筋ミオシン重鎖の発現を検討する。

ウエスタンブロットにて増殖に関わる各種の蛋白 (AMPK, p53, p21) の発現を検討する。

ウエスタンブロットにて平滑筋分化に関わる蛋白 (平滑筋 アクチン、平滑筋ミオシン重鎖、myocardin, SRF, KLF4, KLF5) の発現を検討する。

(2) ヒト大動脈由来平滑筋細胞 (HASMC) を用いる実験

Elovl6 に対する siRNA を導入する方法で HASMC における Elovl6 ノックダウン細胞 (siElovl6) を作成する。

siElovl6 細胞の増殖能を thymidine 取り込みにて検討する。遊走能は scratch 法で検討する。

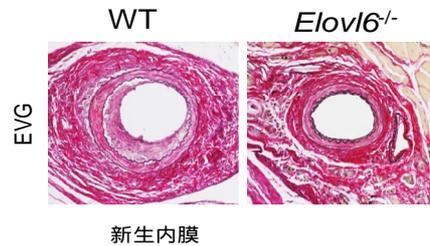
siElovl6 細胞の脂質分画をアッセイし siGFP 導入 HASMC と比較する。

ウエスタンブロットにて増殖、蛋白合成、平滑筋分化に関わる蛋白の発現を検討する。

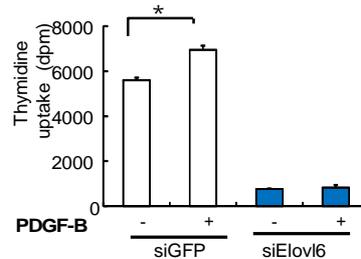
の実験で同定された蛋白が増殖、蛋白合成、平滑筋分化の調節に関してどのような役割をもつかを詳細に検討するために、その蛋白の過剰発現系およびノックダウンの系を作成する。

4. 研究成果

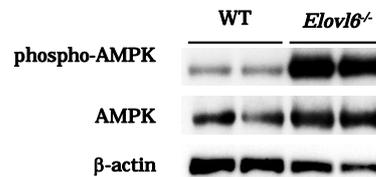
(1) 脂肪酸鎖長伸長酵素 Elovl6 欠損マウスでは血管傷害後の新生内膜形成が著明に抑制された。



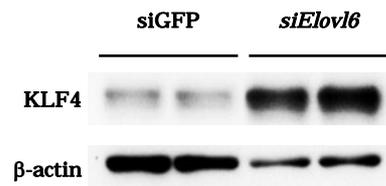
(2) 培養ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC) 中の Elovl6 発現をノックダウンさせると PDGF に対する反応性が消失した。また、Elovl6 をノックダウンしたヒト大動脈平滑筋細胞においては SMC マーカーの発現が低下した。



(3) 血管平滑筋細胞マーカーが抑制されること、エネルギーセンサーとして機能する AMPK が著明に活性化することを見出した。こうした発見は細胞内の脂肪酸代謝が血管平滑筋細胞の形質変換に大きな役割を持つことを示している。



(4) これまで血管平滑筋細胞は分化型 (収収型) と脱分化型 (増殖型) の2つの形質が注目されてきたが、Elovl6 ノックダウン細胞では、AMPK の活性化を介して細胞リプログラミング因子 KLF4 の増加が顕著に認められた。これは、分化型とも脱分化型とも異なる形質をもつことを示している。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Iso T, Haruyama H, Sunaga H, Matsui M, Matsui H, Tanaka R, Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Yokoyama T, Kurabayashi M.

Exercise endurance capacity is markedly reduced due to impaired energy homeostasis during prolonged fasting in FABP4/5 deficient mice.

BMC Physiol. 2019;19(1):1 査読有

2. Shrestha S, Sunaga H, Hanaoka H, Yamaguchi A, Kuwahara S, Umbarawan Y, Nakajima K, Machida T, Murakami M, Saito A, Tsushima Y, Kurabayashi M, Iso T. Circulating FABP4 is eliminated by the kidney via glomerular filtration followed by megalin-mediated reabsorption.

Sci Rep. 2018;8(1):16451. 査読有

3. Iso T, Haruyama H, Sunaga H, Matsui H, Matsui M, Tanaka R, Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Putri M, Yamaguchi A, Hanaoka H, Negishi K, Yokoyama T, Kurabayashi M. CD36 is indispensable for nutrient homeostasis and endurance exercise capacity during prolonged fasting.

Physiol Rep. 2018;6(19):e13884 査読有

4. Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Koitabashi N, Obinata H, Yamaguchi A, Hanaoka H, Hishiki T, Hayakawa N, Sano M, Sunaga H, Matsui H, Tsushima Y, Suematsu M, **Kurabayashi M**, **Iso T**. Myocardial fatty acid uptake through CD36 is indispensable for sufficient bioenergetic metabolism to prevent progression of pressure overload-induced heart failure.

Sci Rep. 2018 Aug 13;8(1):12035 査読有

5. Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Koitabashi N, Yamaguchi A, Hanaoka H, Hishiki T, Nagahata-Naito Y, Obinata H, Sano M, Sunaga H, Matsui H, Tsushima Y, Suematsu M, **Kurabayashi M**, **Iso T**. Glucose is preferentially utilized for biomass synthesis in pressure-overloaded hearts: Evidence from fatty acid binding protein-4 and -5 knockout mice.

Cardiovasc Res. 2018;114(8):1132-1144 査読有

6. Obokata M, **Iso T**, Ohyama Y, Sunaga H, Kawaguchi T, Matsui H, Iizuka T, Fukuda N, Takamatsu H, Koitabashi N, Funada R, Takama N, Kasama S, Kaneko Y, Yokoyama T, Murakami M, **Kurabayashi M**. Early increase in serum fatty acid binding protein 4 levels in patients with acute myocardial infarction.

Eur Heart J Acute Cardiovasc Care. 2018;7(6):561-569. 査読有

7. Obokata M, Negishi K, Sunaga H, Ishida H, Ito K, Ogawa T, **Iso T**, Ando Y, **Kurabayashi M**. Association Between Circulating Ketone Bodies and Worse Outcomes in Hemodialysis Patients.

J Am Heart Assoc. 2017;6(10). pii: e006885. 査読有

8. Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Obinata H, Yamaguchi A, Sunaga H, Matsui H, Hishiki T, Matsuura T, Koitabashi N, Obokata M, Hanaoka H, Haque A, Kunitomo F, Tsushima Y, Suematsu M, **Kurabayashi M**, **Iso T**. Robust suppression of cardiac energy catabolism with marked accumulation of energy substrates during lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in mice.

Metabolism. 2017;77:47-57. 査読有

9. Sunaga H, Matsui H, Anjo S, Syamsunarno MR, Koitabashi N, **Iso T**, Matsuzaka T, Shimano H, Yokoyama T, **Kurabayashi M**. Elongation of Long-Chain Fatty Acid Family Member 6 (Elovl6)-Driven Fatty Acid Metabolism Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Through AMP-Activated Protein Kinase/Krüppel-Like Factor 4 Signaling.

J Am Heart Assoc. 2016;5(12). e004014. 査読有

10. Nakahara T, Kawai-Kowase K, Matsui H, Sunaga H, Utsugi T, **Iso T**, Arai M, Tomono S, **Kurabayashi M**. Fibroblast growth factor 23 inhibits osteoblastic gene expression and induces osteoprotegerin in vascular smooth muscle cells.

Atherosclerosis. 2016;253:102-110. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1 須永浩章、小保方 優、根岸一明、小川哲也、磯 達也、小板橋紀通、倉林正彦
Circulating Ketone Body as a Novel biomarker for Worse Clinical Outcomes in Hemodialysis Patients. 第 82 回日本循環器学会学術集会 2018.3.23-25 (大阪)

2. Yogi Umbarawan, Mas Rizky AA Syamsunarno, Koitabashi N, **Kurabayashi M**, **Iso T**.
Glucose is Preferably Utilized for Biomass Synthesis Rather than ATP Production in Pressure-overloaded CD36 Deficient Heart. 第 82 回日本循環器学会学術集会 2018.3.23-25 (大阪)

3. Koitabashi N, Sunaga H, Matsui H, **Iso T**, **Kurabayashi M**

Identificaion and Molecular Mechanisms of Fibroblast Growth Factor 21 as a Novel Biomarker for Metabolic Stress in Acute Myocardial Infarction. 第 82 回日本循環器学会学術集会 2018.3.23-25 (大阪)

4. Sunaga H., Koitabashi N., Matsui H., Iso T., Yokoyama T., Kurabayashi M.

Elevation of Serum Fibroblast Growth Factor 21 in Patients With Acute Myocardial Infarction: A Potential Role of Ampk Activation Following Sympathetic Overdrive. American Heart Association Scientific Meeting 2018.11.10-12 (シカゴ)

5. 須永浩章、松井弘樹、磯 達也、小坂橋紀通、倉林正彦

Serum Free Fatty Acid Composition as a Critical Regulator for Cardiac FGF21 Production in Patients with Acute Myocardial Infarction. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.29-3.31(横浜)

6. 須永浩章、松井弘樹、磯 達也、小坂橋紀通、倉林正彦

Activation of Cardiac AMPK-FGF21 Pathway during Acute Myocardial Infarction. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.29-3.31(横浜)

7. 磯 達也、松井弘樹、小坂橋紀通、倉林正彦

Fatty Acids as Central Fuels for Overloaded Hearts: Estimation of Catabolism and Anabolism in vivo Pressure-overloaded Hearts 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.29-3.31(横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：磯 達也

ローマ字氏名： (ISO, tatsuya)

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：特任准教授

研究者番号 (8 桁): 10400756

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。