

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19192

研究課題名（和文）アディポネクチンの動脈硬化抑制機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the anti-atherogenic mechanism of adiponectin

研究代表者

垣野 明美（Kakino, Akemi）

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教（特定雇用）

研究者番号：00534637

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：アディポネクチンは抗動脈硬化作用をもつと言われているが、そのメカニズムは十分に解明されていない。アディポネクチンがどのように動脈硬化作用を発揮するかを明らかにするため、アディポネクチンと酸化変性LDLとの相互作用について解析を行った。アディポネクチンは酸化LDLに結合し、内皮細胞およびマクロファージへの酸化LDL取り込みを阻害した。また、アディポネクチンは酸化LDLによって引き起こされる細胞応答を抑制した。以上より、アディポネクチンの酸化LDL阻害作用が、アディポネクチンの抗動脈硬化作用に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アディポネクチンが酸化LDLに結合し、酸化LDL依存性の細胞障害に対して抑制的に働くことをin vitroの解析により明らかにした。また、ヒト血漿から向動脈硬化性LDLを抽出し、このLDL亜分画にアディポネクチンが濃縮して存在していることがわかり、生体内でもアディポネクチンが（酸化）変性LDLブロッカーとして機能し得ることを示した。このようなアディポネクチンの新たな抗動脈硬化作用機構が明らかになったことは、動脈硬化性疾患への新しい対処法につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Adiponectin exhibits anti-atherogenic properties, but the underlying mechanisms are not well understood. To determine how adiponectin exerts its anti-atherogenic action and how pro-atherogenic conditions affect adiponectin action, we studied the interactions of adiponectin and oxidized low-density lipoprotein (oxLDL). Adiponectin selectively bound oxLDL and inhibited oxLDL uptake into endothelial cells and macrophages. Adiponectin also suppressed oxLDL-induced cellular responses. Thus, we propose that the direct inhibitory action of adiponectin against atherogenic LDL might be crucial for the anti-atherogenic property of adiponectin.

研究分野：薬理学

キーワード：変性LDL アディポネクチン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

アディポネクチンの受容体として、AdipoR1 や AdipoR2 が同定されており、これらの受容体と耐糖能との関係は研究されているが、動脈硬化との関係は明らかではない。しかし、アディポネクチン自体は、マウスモデルで、動脈硬化を抑制し、ヒトにおいても血中アディポネクチン低値は、虚血性心疾患発症リスクである。すなわち、アディポネクチンには未解明の抗動脈硬化メカニズムがあると考えられる。

そのような中、我々は、予備実験により、アディポネクチンが動脈硬化の原因分子である酸化 LDL に結合し、酸化 LDL 受容体への結合を抑制することを見出した。

酸化 LDL は動脈硬化の原因分子として知られ、その受容体もマクロファージで機能する SR-A、CD36、血管内皮で機能する LOX-1 などが知られている。そして、酸化 LDL 作用を抑制する試みとしては、LDL の酸化を抑制する抗酸化剤などが取りざたされてきたものの、既に生成した酸化 LDL の作用を直接抑制する分子の存在というのは想定されてこなかった。

しかし我々は、これまでの研究により初めて酸化 LDL 阻害分子を見出し、その作用機構を明らかにした。このような背景から、アディポネクチンもまた酸化 LDL 阻害分子として働くのではないかという着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、アディポネクチンがどのように酸化 LDL の受容体への結合を阻害し、シグナル伝達を阻害することによって、動脈硬化抑制性の変化を血管に及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酸化 LDL へのアディポネクチンの結合を ELISA により評価した。また、蛍光標識酸化 LDL を用いて、酸化 LDL の細胞への取り込みに対するアディポネクチンの影響を検討した。

(2) 酸化 LDL が引き起こす細胞反応に、アディポネクチンがどのように影響するのかを調べるため、LOX-1 安定発現細胞株や培養内皮細胞を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイやウェスタンブロット法、qRT-PCR 法などにより解析した。

(3) 逆に、アディポネクチンの生理作用に対して、酸化 LDL が影響を及ぼす可能性について、アディポネクチン受容体 AdipoR を一過性発現させた細胞や培養内皮細胞を用いて解析した。

(4) 実際に生体内でアディポネクチンと酸化変性 LDL の相互作用が起こるのか、陰イオン交換クロマトグラフィーによりヒト血漿 LDL から向動脈硬化性亜分画である L5 を分

離し、調べた。

4. 研究成果

(1) 酸化 LDL へのアディポネクチンの結合を評価した結果、アディポネクチンは容量依存的に酸化 LDL に結合した。

アディポネクチンは N 末端側の collagen-like domain と C 末端側の globular domain から成る。そこで globular form の結合を確認したところ、full-length form と同様に酸化 LDL への結合が認められたことから、この結合は globular domain を介していることがわかった。(図 1)

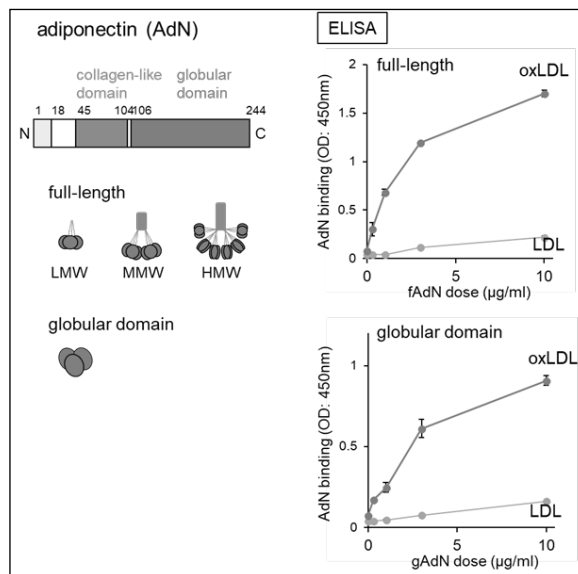


図 1. アディポネクチンと酸化 LDL の結合

次に、酸化 LDL の細胞への取り込みに対する影響を調べると、アディポネクチンは酸化 LDL 受容体 LOX-1 を介した酸化 LDL の取り込みを抑制した。一方、LDLR を介した LDL の取り込みには影響を与えなかった。このことから、アディポネクチンは酸化 LDL に特異的に作用することが示唆された。

また、酸化 LDL 受容体を内在性に発現する培養血管内皮細胞や、マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞への酸化 LDL の取り込みに対しても、アディポネクチンが抑制的に働くことがわかった。

(2) 次に、酸化 LDL によって起こる細胞応答にアディポネクチンがどのような影響を与えるのかについて、培養細胞を用いた in vitro の系で検討した。

LOX-1 安定発現細胞株を用いた実験で、アディポネクチンは、酸化 LDL-LOX-1 によって起こる ERK リン酸化、NF-κB 活性化を抑制した。また、培養血管内皮細胞では、酸化 LDL 依存的な ERK リン酸化や、接着因子 ICAM-1、MCP-1 の発現亢進、エンドセリン-1 分泌亢進が、アディポネクチンを添加することにより抑制された。

以上のことから、アディポネクチンが酸化 LDL に直接作用し、酸化 LDL の炎症誘発性の反応を阻害することが示唆された。

ここまで、アディポネクチンが酸化 LDL に対して阻害的に働くことを示したが、競合するのであれば、その逆もありうるのではないかと考え、(3)の検討を行った。

(3) アディポネクチンは受容体 AdipoR を活性化し、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) を活性化することが知られている。そこでこの反応に対して酸化 LDL がどのように影響するのかを、アディポネクチン受容体 AdipoR を一過性発現させた細胞や培養内皮細胞を用いて検討した。結果、アディポネクチン依存的な AMPK リン酸化は、酸化 LDL を同時に添加することによって抑制されることがわかった。

これにより、酸化 LDL とアディポネクチンは互いに競合的に作用していることが示唆された。

(4) ヒト血漿 LDL 中の向動脈硬化性亜分画である L5 を、抗アディポネクチン抗体を用いたウェスタンブロットで解析すると、対照である正常 LDL 分画 L1 に比べ、L5 中にアディポネクチンが濃縮して存在することがわかった。(図 2) すなわち、生体内でも上記のような反応が起きている可能性が示唆された。

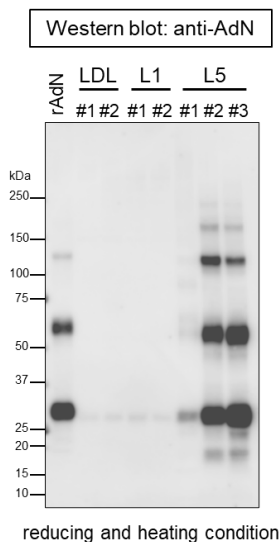


図 2. 向動脈硬化性 LDL(L5)中のアディポネクチン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- Nakano, A., Kawashima, H., Miyake, Y., Zeniya, T., Yamamoto, A., Koshino, K., Temma, T., Fukuda, T., Fujita, Y., Kakino, A., Kanaya, S., Sawamura, T. and Iida, H.: ¹²⁵I-labeled oxLDL is widely distributed throughout the whole body in mice. *Nucl Med Mol Imaging*, 52:144-153, 2018. 査読有

- Sawamura, T., Fujita, Y., Horiuchi, S., Kakino, A.: LOX-1 in Ischemic Stroke. *J Atheroscler Thromb*, 24:566-568, 2017. 査読無
- Sawamura, T., Fujita, Y., Horiuchi, S., Kakino, A.: L5: An LDL fraction in which pathogenic activity of LDL is concentrated. *Trends Cardiovasc Med.*, 27:247-248, 2017. 査読無
- Kakino, A., Fujita, Y., Nakano, A., Horiuchi, S. and Sawamura, T.: Developmental endothelial locus-1 (Del-1) inhibits oxidized low-density lipoprotein activity by direct binding, and its overexpression attenuates atherogenesis in mice. *Circ J*, 80:2541-2549, 2016. 査読有
- Yokoyama, C., Aoyama, T., Ido, T., Kakino, A., Shiraki, T., Tanaka, T., Nishigaki, K., Hasegawa, A., Fujita, Y., Sawamura, T. and Minatoguchi, S.: Deletion of LOX-1 protects against heart failure induced by doxorubicin. *PLoS One*, 11:e0154994, 2016. 査読有
- Yokota, C., Sawamura, T., Watanabe, M., Kokubo, Y., Fujita, Y., Kakino, A., Nakai, M., Toyoda, K., Miyamoto, Y. and Minematsu, K.: High levels of soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in acute stroke: an age- and sex-matched cross-sectional study. *J Atheroscler Thromb*, 23:1222-1226, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

- 垣野明美, 藤田佳子, 堀内清香, 沢村達也: アディポネクチン系と酸化 LDL 系の相互拮抗作用、第 27 回日本循環薬理学会、名古屋、2017 年 12 月 1 日
- 垣野明美, 藤田佳子, 堀内清香, 沢村達也: アディポネクチンの抗動脈硬化作用の検討、第 64 回中部日本生理学会、山梨、2017 年 10 月 6-7 日
- Aoyama, T., Yokoyama, C., Ido, T., Kakino, A., Shiraki, T., Tanaka, T., Sawamura, T., Minatoguchi, S.: Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) in cardiomyocytes (CMs) is involved in the pathogenesis of doxorubicin (DOX)-induced cardiomyopathy, European Society of Cardiology Congress 2017, Barcelona, 2017 年 8 月 26-30 日
- 沢村達也, 岡村智教, 藤田佳子, 堀内清香, 垣野明美: 受容体結合活性で測定する変性 LDL : LAB、第 49 回日本動脈硬化学会、広島、2017 年 7 月 6-7 日
- Sawamura, T., Fujita, Y., Horiuchi, S., Kakino, A.: Understanding LOX-1 to Unlock Cardiovascular Diseases. 第 81 回日本循環器学会、金沢、2017 年 3 月 18 日

6. Kakino, A., Fujita, Y., Sawamura, T.:
Oxidized LDL and adiponectin interact and regulate the other's respective functions.
American Heart Association's Scientific Sessions 2016, New Orleans, Louisiana, 2016年11月12日-16日
7. Kakino, A., Fujita, Y., Sawamura, T.:
Adiponectin as a blocker of oxidized LDL.
The 84th European Atherosclerosis Society Congress, Innsbruck, Austria, 2016年5月29日-6月2日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣野 明美 (KAKINO, Akemi)
信州大学・先鋭領域融合研究群
バイオメディカル研究所・助教 (特定雇用)
研究者番号 : 00534637