

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19390218  
 研究課題名（和文）アンジオポエチン様因子ファミリー解析による動脈硬化と肥満の共通分子病態基盤解明  
 研究課題名（英文）Identification of molecular mechanisms underlying the common pathogenesis of atherosclerosis and obesity  
 研究代表者  
 尾池 雄一（OIKE YUICHI）  
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授  
 研究者番号 90312321

## 研究成果の概要：

ANGPTL2 濃度は、健常人より糖尿病患者群で血中有意に高いこと、健常人及び糖尿病患者の両群で肥満（BMI もしくは内臓脂肪面積）の程度、炎症（血中 CRP 濃度）の程度、インスリン抵抗性の程度に比例して上昇することを見出し、ANGPTL2 と肥満、動脈硬化性疾患の連関の可能性を見出した。さらに ANGPTL2 遺伝子改変マウスを用いた研究で Angptl2 は、肥満病態でみられる脂肪組織の炎症、それに随伴する耐糖能異常、インスリン抵抗性の誘発因子であり、発現上昇抑制が治療標的になりうることを見出した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：循環器内科

科研費の分科・細目：7203

キーワード：動脈硬化、肥満、アンジオポエチン様因子

## 1. 研究開始当初の背景

血管では様々な外的・内的なストレスにตอบสนองした細胞活動の結果として血管組織の 3 次元の構築が再構築（リモデリング）され、その結果「動脈硬化」という病態が形成される。ストレス応答そのものは血管障害時に傷を治す機構として本来生体にとって有益なものとして獲得されたものである。しかし長期にわたるストレスへの応答が慢性的にリモデリングを進行させ、不可逆的な組織リモデリングが生じることが動脈硬化病態の本

質であり、このような組織リモデリングは動脈硬化に限らず慢性炎症を基盤とした様々な疾患において、臓器機能を傷害し生命予後に重大な影響を与えることが明らかとなってきた。飽食や運動不足など生活スタイルの変化によってもたらされる肥満、インスリン抵抗性、高血圧、高脂血症、糖尿病が複合的に集積し最終的には虚血性心疾患、脳卒中等の動脈硬化性疾患に発展する危険性が高まるメタボリックシンドロームにおいて、その基盤病態となる肥満の発症、進展にも脂

肪組織再構築（リモデリング）が大きく関わっていることが注目され始めていた。動脈硬化の病態形成、血管壁組織のリモデリングにおいては浸潤してくるマクロファージ、単球などの血球系炎症細胞が重要な役割を果たすこと、その走化性因子として monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1、別名 CCL2)が注目されていた。興味深いことに肥満病態でも MCP-1 や遊離脂肪酸などの脂肪細胞から分泌される悪玉アディポサイトカインが肪組織にマクロファージを浸潤、活性化させ、そのマクロファージから分泌される炎症性サイトカインにより脂肪細胞が活性化され、さらに脂肪からの悪玉アディポサイトカインの分泌を増大させるといった悪循環が脂肪細胞の形態学的変化である脂肪組織リモデリングを引き起こし、インスリン抵抗性増悪などのメタボリックシンドローム病態進展に関わることが解明され始めていた。多くの研究から MCP-1 が注目される一方で、MCP-1 以外の因子の関与も重要であることが明らかとなってきた。脂肪組織には血管が豊富に存在し、血管新生を抑制する薬剤の投与により肥満モデルマウスの体脂肪率の増加や肥満の進展を抑制できることが報告され、血管新生に関連して肥満に伴う脂肪組織リモデリング、特に脂肪細胞の増殖・分化が進むと考えられている。一方、動脈硬化病変においても動脈壁内の微小血管である Vasa vasorum において血管の増加が見られ血管新生に関連して血管壁リモデリングが進み動脈硬化病態が進展すると考えられている。以上のように肥満に伴う脂肪組織リモデリングと動脈硬化病変で見られる血管壁リモデリングとは血球系炎症細胞浸潤、血管の新生と退縮、繊維化など組織再構築過程に酷似点が多数認められ、軽度慢性炎症性変化などの組織レベルのみならず分子レベルにおいても共通の機構の存在が予想され、この解明が重要であると考えられていた。

## 2. 研究の目的

肥満に伴う脂肪組織リモデリングと動脈硬化病変で見られる血管壁リモデリングとは血球系炎症細胞浸潤、血管の新生と退縮、繊維化など組織再構築過程に酷似点が多数認められ、軽度慢性炎症性変化などの組織レベルのみならず分子レベルにおいても共通の機構の存在が予想される。近年、我々を含め複数の独立した研究グループより血管新生因子アンジオポエチンに構造上類似した 7 つの分子から構成されるアンジオポエチン様因子ファミリー (ANGPTL) が同定された。我々はそれらの機能解析を通じて ANGPTL ファミリーに属する分子の多くが代謝調節作用と血管新生作用を有することを明らかにしてきた。また、最近の研究で、肥満、イン

スリン抵抗性や動脈硬化の病態で ANGPTL の発現が変動することを見出している。本研究では、肥満に伴う脂肪組織リモデリングと動脈硬化病変で見られる血管壁リモデリングの酷似性において、ANGPTL がこれらの病態にどのように関与しているかを解明する基盤研究を行い、動脈硬化・肥満、メタボリックシンドロームの新規治療法・予防法の開発に ANGPTL が治療標的となりうるかを検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、血管細胞と脂肪細胞から分泌される Angpt12 に焦点し研究を行った。

### 遺伝子改変マウスと病態モデルを用いた Angpt12 の機能解析に関する研究

-1 Angpt12 トランスジェニックマウスの作成により本来肥満や動脈硬化の病態で発現が上昇する Angpt12 を脂肪細胞あるいは血管に持続的に過剰に発現させた状況を作製し肥満や動脈硬化などの病態発症の有無、生化学的変化、脂肪組織や血管壁リモデリングで見られる病理・病態変化の有無の検討を行う。

-2 Angpt12 ホモ欠損マウスを用いて高脂肪食負荷で誘導する肥満やアポE欠損マウスと交配実験による動脈硬化、バルーン障害モデルによる内皮細胞の修復、カフによる炎症モデルによる内膜肥厚などの病態発症・進展や脂肪組織リモデリングや血管壁リモデリングで見られる病理変化への影響の検討を行う。

### Angpt12 の発現調節機構に関する研究

脂肪細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の各々の細胞株を用いて、動脈硬化や肥満で上昇するサイトカイン、アディポサイトカイン、脂肪酸で Angpt12 の発現に変化が生じるかを検討する。

### Angpt12 の機能的受容体の探索・同定

### ヒト病態における Angpt12 の発現変動に関する研究

肥満や動脈硬化の病態モデルマウスと同様にヒトの病態においても Angpt12 が変動するかを検討するために、ヒト血清を用いて Angpt12 濃度を測定できる様に ELISA 系を樹立する。まずヒト Angpt12 に対する抗体を複数作製し、ELISA 系を作成する。作成後、肥満、肥満（糖尿病合併）、虚血性心疾患（狭心症、心筋梗塞）の症例で血中 Angpt12 濃度を測定する。また虚血性心疾患に関しては、その病態との関連も含め検討する。

### 血管病（大動脈瘤）マウスモデルにおける Angpt12 の発現変動に関する研究

大動脈モデルマウスを作製し、血管病変における Angpt12 の発現変動を検討する。

#### 4. 研究成果

##### 遺伝子改変マウスと病態モデルを用いた Angpt12 の機能解析に関する研究

-1 本来肥満の病態で発現が上昇する Angpt12 を脂肪細胞に持続的に過剰に発現させた Angpt12 トランスジェニックマウス(aP2-Angpt12TG マウス)を作製し、肥満で認められるような病態と類似した所見が得られるかどうか検討した。aP2-Angpt12TG マウスは、肥満を呈することはなかったが、脂肪組織に炎症所見が認められ、耐糖能異常、インスリン抵抗性を示した。このことより、肥満の病態で発現が上昇する Angpt12 は、肥満病態でみられる脂肪組織の炎症を惹起する重要な因子であり、発現上昇抑制が治療標的になりうるということが示唆された。

-2 Angpt12 ホモ欠損マウスを用いて高脂肪食負荷で誘導する肥満を作製し、-1の結果から得られた仮説の検証を行った。通常食下で、Angpt12 ホモ欠損マウスは、対照の野生型マウスに比較してわずかに体重が軽い傾向にあった。ゼブラフィッシュでは、Angpt12 は発生過程において重要な血管形成に関わる役割があることが知られており、脂肪組織形成においても何らかの役割がある可能性が示された。また、高脂肪食負荷下では、Angpt12 ホモ欠損マウスは、対照の野生型マウスに比較して肥満の程度はわずかに軽減しているが、肥満に伴って認められる耐糖能異常、インスリン抵抗性もその程度は軽減しており、肥満の病態で発現が上昇する Angpt12 は、肥満病態でみられる耐糖能異常、インスリン抵抗性の治療標的になりうるということが示唆された。

Angpt12 の発現調節機構に関する研究  
脂肪細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞の各々の細胞株を用いて、Angpt12 の発現調節機構を検討した。肥満や動脈硬化病変で認められる低酸素や小胞体ストレスによって、Angpt12 の発現が上昇することを認めた。また、現在プロモーター解析を行い、詳細な分子機構も解明中である。

Angpt12 の機能的受容体の探索・同定  
血管内皮細胞、単球においてインテグリンが Angpt12 の機能的受容体の役割を果たしていること、Rac の活性化により遊走能を促進させること、NF- $\kappa$ B の核内移行促進により炎症性変化をもたらすことを見出した。

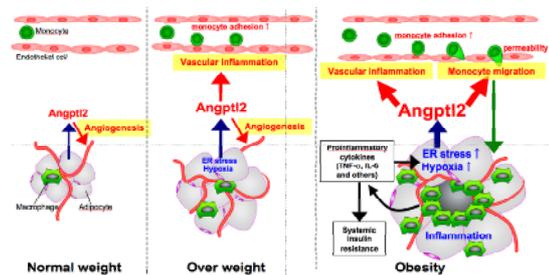
##### ヒト病態における Angpt12 の発現変動に関する研究

ヒト血清を用いて Angpt12 濃度を測定できる様に ELISA 系の樹立に成功した。肥満、肥満(糖尿病合併)、虚血性心疾患(狭心症、心筋梗塞)の症例で血中 Angpt12 濃度

を測定した。健常人より糖尿病患者群で血中濃度が有意に高いこと、健常人及び糖尿病患者の両群で肥満(BMI もしくは内臓脂肪面積)の程度、炎症(血中 CRP 濃度)の程度、インスリン抵抗性の程度に比例して血中 ANGPTL2 濃度が上昇することよりこれらの病態形成において ANGPTL2 が重要な役割を果たしている可能性を見出した。

##### 血管病(大動脈瘤)マウスモデルにおける Angpt12 の発現変動に関する研究

動脈瘤の形成に従って Angpt12 の発現が上昇することを認め、その病態形成に何らかの役割を果たしている可能性が示された。以上の結果より以下のモデルを考えている。



#### 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8件)

Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, Satofuka S, Noda K, Ozawa Y, Oike Y, Ishida S, & Tsubota K. Resveratrol Prevents Ocular Inflammation in Endotoxin-Induced Uveitis via Inhibiting Oxidative Damage and Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009 in press 査読有

Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, Ishii N, Nagai R, Miyata K, Tabata M, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Kawashima J, Takeya M, Yamashita S, Koh GY, Nagy A, Suda T, Oike Y, & Araki E. Angpt14 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis. Biochem Biophys Res Commun. 379 806-811 2009 査読有

Tomita K, Oike Y, Teratani T, Taguchi T, Noguchi M, Suzuki T, Mizutani A, Yokoyama H, Irie R, Sumimoto H, Takayanagi A, Miyashita K, Akao M, Tabata M, Tamiya G, Ohkura T, & Hibi T. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression

of nonalcoholic steatohepatitis in mice. Hepatology 48 458-473 2008 査読有

Izumi-Nagai K, Nagai N, Ohgami K, Satofuka S, Ozawa Y, Tsubota K, Ohno S, Oike Y, & Ishida S. Inhibition of choroidal neovascularization with an anti-inflammatory carotenoid astaxanthin. Invest Ophthalmol Vis Sci. 49 1679-1685 2008 査読有

Urano T, Ito Y, Akao M, Sawa T, Miyata K, Tabata M, Morisada T, Hato T, Kadomatsu T, Yano T, Yasunaga K, Shibata R, Murohara T, Akaike T, Tanihara H, Suda T. & Oike Y. Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28 827-834 2008 査読有

Hato T, Tabata M, & Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins (Angptls) in angiogenesis and metabolism. Trends Cardiovasc Med. 18 6-14 2008 査読有

Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, Hashinuma T, & Hashimoto S. Angiopoietin-related growth factor (AGF) suppresses gluconeogenesis through the Akt/FoxO1-dependent pathway in hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 323 787-793 2007 査読有

Cho CH, Jun Koh Y, Han J, Sung HK, Jong Lee H, Morisada T, Schwendener RA, Brekken RA, Kang G, Oike Y, Choi TS, Suda T, Yoo OJ, & Koh, GY. Angiogenic Role of LYVE-1-positive Macrophages in Adipose Tissue. Circ Res 100 e47-57 2007 査読有

[学会発表](計9件)

尾池雄一、ANGPTLs: Potential New Targets for Metabolic Syndrome Therapy、第16回日本血管生物医学会、平成20年12月4日、金沢

尾池雄一、血管新生因子 ANGPTL と肥満・メタボリックシンドローム、第31回日本血栓止血学会・日本動脈硬化学会合同シンポジウム、平成20年11月20日、大阪

尾池雄一、アンジオポエチン様因子 (ANGPTL) と血管・リンパ管、第29回日本炎症・再生医学会、平成20年7月9日、東京

尾池雄一、Angiopoietin-like proteins

(Angptls): potential new targets for metabolic syndrome therapy、ASIAN PACIFIC CONGRESS OF CARDIOLOGY、平成19年12月12日、台湾

尾池雄一、アンジオポエチンファミリーとリンパ管・血管-リンパ管・血管標的抗がん療法を目指して-、第15回日本血管生物医学会学術大会、平成19年11月29日、福岡

尾池雄一、Angiopoietin-like proteins (Angptls): potential new targets for metabolic syndrome therapy、KSMBMB2007、平成19年10月24日、韓国

尾池雄一、ANGPTL2の機能解析、第28回日本肥満学会、平成19年10月19日、東京

尾池雄一、肥満を標的としたメタボリックシンドロームの治療戦略、第28回日本肥満学会、平成19年10月19日、東京

尾池雄一、肥満を標的としたメタボリックシンドロームの治療戦略、第44回日本臨床分子医学会学術集会、平成19年7月19日、和歌山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾池 雄一 (OIKE YUICHI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号 90312321

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者