

平成22年 5月 1日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2007～2008

課題番号：19689016

研究課題名（和文） 脂肪細胞由来因子の心血管リモデリング制御機構の解明
と治療への応用

研究課題名（英文） The role of adponectin in regulation of cardiac remodeling

研究代表者

柴田 玲(SHIBATA REI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：70343689

研究成果の概要（和文）：

メタボリックシンドロームに関連した心血管病の病態には、種々の脂肪細胞由来因子の産生異常が関わっている。特にアディポネクチンは、抗糖尿病、抗動脈硬化作用を有し、心血管病の病態にも深く関与している。我々は、アディポネクチンが血管新生作用や心臓肥大抑制作用、抗アポトーシス作用、抗炎症作用、繊維化抑制作用を介して、心血管リモデリング予防効果を発揮することを明らかとした。この結果、アディポネクチンを上昇させる薬剤や治療法の開発、アディポネクチン受容体に対する作動薬の開発が心血管病の新しい治療法につながる可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
総計	19,000,000	5,700,000	24,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環機内科学

キーワード：心血管リモデリング、脂肪細胞由来因子、アディポネクチン、血管内皮前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満症やメタボリックシンドローム、糖尿病の患者の多くに心血管病を合併することは、よく知られていることではあるが、その発症機序は未だ十分に明らかではない。近年、脂肪細胞は数多くのホルモンを発現し分

泌する内分泌臓器であるという概念が確立し、現在では、アディポネクチン、レプチン、TNF- α 、レジスチンをはじめとする数多くの脂肪細胞由来因子(アディポサイトカイン)と病態との関連が明らかとなりつつある。

(2) アディポネクチンの血中濃度は肥満症や

糖尿病、冠動脈疾患の患者において低下しており、数多くの研究結果から、アディポネクチンは、抗糖尿病、抗動脈硬化作用を有するホルモンであることが示されてきた。しかしながら、アディポネクチンと心血管リモデリングとの関係は知られていなかった。そこで申請者らは心血管病におけるアディポネクチンの役割に注目。世界に先駆けて、アディポネクチンが虚血下組織において AMP キナーゼのシグナル伝達を促進させることにより血管新生作用を有する事、AMP キナーゼのシグナル伝達を介して心臓肥大抑制に関与している事を明らかにした。さらに、アディポネクチンが心筋梗塞巣の縮小効果や予防効果を有する事を示した。このように、アディポネクチンの新しい機能発見は心血管病の病態解明への新たなアプローチにつながると考えられる。

(3) 先進国で虚血性心血管疾患は年々増加しており、このような患者に対して虚血部の側副血行路を増加させ、虚血心筋の機能を回復させようとする血管新生療法の臨床応用が近年試みられている。1997年、成人末梢血中に血管内皮細胞に分化しうる未分化な細胞、血管内皮前駆細胞(EPC)が存在する事が発見され、EPCを経静脈的に投与すると、虚血領域の血管新生部位に組み込まれる事が明らかにされた。このことより近年、「細胞移植による血管新生療法」の臨床応用がスタートし良好な結果を得ている。これらの結果は虚血後の心機能回復や心リモデリングに血管新生作用やEPCの動員が重要な役割を果たしている事を示唆している。

2. 研究の目的

アディポネクチンの心血管リモデリングの制御機構、特に虚血性疾患における心血管リモデリングへの関与を明らかにする。またそのメカニズムとしてアディポネクチンの血

管新生作用、血管内皮前駆細胞(EPC)の骨髄からの動員や機能への関与を中心に明らかにしていく。具体的には、

(1) アディポネクチンの心筋梗塞後の心リモデリングにおける役割検討。

(2) EPCの動員や機能に対するアディポネクチンの役割検討。

(3) 各種薬剤によるアディポネクチン産生を介した新たな心血管病治療戦略の検討。

(4) ヒト心筋梗塞患者におけるアディポネクチン濃度、EPC動員と心リモデリングとの関連検討。 以上を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 左冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを作成。野生型(WT)、アディポネクチン遺伝子欠損(APN-KO)マウスを用いて心筋梗塞後の心リモデリングにおけるアディポネクチンの役割を検討する。

(2) ヒト及びマウス末梢血を用いて *in vitro* の系における EPC 動員、分化の検討、これらに関与するアディポネクチンレセプターやシグナル伝達経路の解明を行う。 *in vivo* の実験系としては、WT、APN-KO マウスに下肢虚血モデルを作成し EPC の骨髄からの動員や機能に対するアディポネクチンの役割を検討する。

(3) チアゾリジン誘導体やカロリー制限はアディポネクチン濃度を上昇させることが知られている。そこでチアゾリジン誘導体の投与やカロリーを制限することにより、アディポネクチンは増加するか否かの検討。またアディポネクチンを介した心血管保護作用の有無とそのメカニズムを検討する。

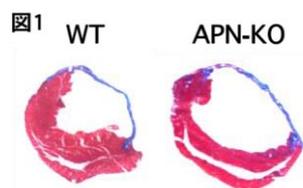
(4) 急性心筋梗塞発症患者の血液サンプルを採取の上、アディポネクチン濃度の測定や EPC マーカーの検討を行う。また、心筋梗塞後の心筋シンチグラフィデータ解析をおこ

ない、心リモデリングとアディポネクチン濃度やEPC数との相関関係を検討する。

4. 研究成果

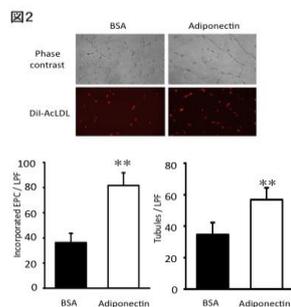
(1) アディポネクチンの心筋梗塞後の心リモデリングにおける役割検討

マウス左冠動脈を結紮し、心筋梗塞の慢性モデルを作成したところ、APN-KO マウスでは、WT マウスに比べ、著明な左室腔の拡大、心機能低下といった心筋リモデリング増悪を認めた (図1)。リモデリングの増悪に伴って、心筋虚血部での血管新生反応の有意な低下や非虚血部での心筋肥大、アポトーシス、間質の繊維化の増加を認めた。また、血中アディポネクチン濃度を上昇させることで、心筋リモデリングの改善や虚血組織における血管新生の増強を認め、非虚血領域の肥大、アポトーシス、繊維化も改善した。



(2) EPC の動員や機能に対するアディポネクチンの役割検討

ヒト末梢血より培養した EPC に、アディポネクチンを添加すると、EPC の分化能、増殖能、遊走能および管腔形成能がいずれをも有意に促進された (図2)。さらに、下肢虚血マウスモデル作成後の EPC の骨髄からの動員は、WT マウスに比較し APN-KO マウスにて低下していた。このように、アディポネクチンの血管新生促進作用には、EPC の動員や機能改善が、関与している可能性が明らかとなった。



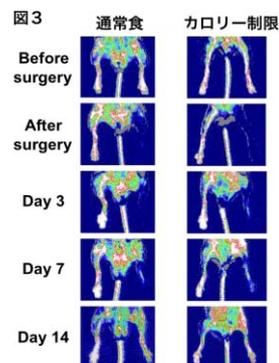
(3) 各種薬剤によるアディポネクチン産生、

分泌活性化を介した新たな心血管病治療戦略の検討

① チアゾリジン誘導体は、脂肪細胞分化誘導と肥大化細胞のアポトーシスを介して脂肪細胞を小型化させ、アディポネクチンの分泌を増加させる。我々は、チアゾリジン誘導体、ピオグリタゾンが塩分負荷やアンギオテンシン負荷に伴う心臓肥大、心臓間質内の繊維化を抑制する事を明らかにした。また、ピオグリタゾン投与下ではアディポネクチン濃度が 1.8 倍増加し、APN-KO マウスではピオグリタゾンの心臓肥大や繊維化抑制作用が発揮されなかった。以上から、ピオグリタゾンの心臓肥大、繊維化抑制作用は、アディポネクチン分泌を介していると考えられた。

② カロリー制限は、アンチエイジングの重要なファクターであり、アディポネクチンを増加させる効果を持つことが知られている。しかしながら、カロリー制限と血管新生との関係については明らかではなかった。我々は、マウス下肢虚血モデルを用いて、カロリーを制限することが虚血組織における血管新生作用に影響を及ぼすか否かを検討した。マウスに 35%のカロリー制限を 4 週間行った後、下肢虚血モデルを作成。作成 2 週間後、血管新生能を、レーザードップラー法や CD31 免疫染色による毛細血管密度から評価した。カロリー制限を行った野生型マウスでは、虚血後の血流回復が、自由摂食したマウス (コントロールマウス) と比較して有為に増加していた (図3)。

カロリー制限を行うと、血中アディポネクチン濃度がコントロールマウスに比して、1.8 倍上昇しており、アディポネクチン遺伝子欠

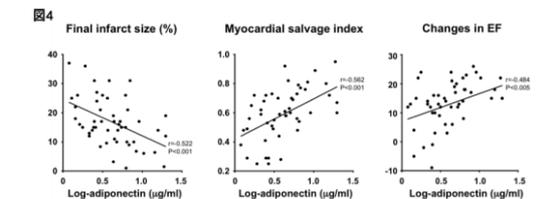


損マウスにカロリー制限を行っても、下肢虚血後の血管新生促進作用は見られなかった。カロリー制限を行った、野生型マウスの虚血組織では、eNOS や AMPK のリン酸化増強が確認された。eNOS 遺伝子欠損マウスや NO 合成阻害剤 L-NAME、AMPK 阻害剤 compound C 投与下の野生型マウスでは、アディポネクチン濃度上昇は認めるものの、カロリー制限に伴う下肢虚血後の血管新生促進作用はみられなかった。そこで、カロリー制限はアディポネクチン産生促進、それに伴う AMPK/eNOS シグナルを介した血管新生の増強作用を有していると考えられた。以上より、カロリー制限を目的とした、栄養学的なアプローチが、虚血性心血管病の補助的治療として重要である可能性が示唆された。

(4) ヒト心筋梗塞患者におけるアディポネクチン濃度、EPC 動員と心リモデリングとの関連検討

ヒト急性心筋梗塞発症症例でアディポネクチン濃度との関連検討を行ったところ、発症初期のアディポネクチン濃度が高値な症例では、経皮的冠動脈形成術6ヵ月後の心筋梗塞サイズの縮小率が高く、心機能の回復も良好であることが明らかになった(図4)。加えて、急性心筋梗塞発症症例で経皮的冠動脈形成術後7日目のアディポネクチン濃度とEPCマーカー(CD34陽性細胞数)が正の相関を示した。

(5) まとめ



本研究成果から、アディポネクチンは血管新生作用や心臓肥大抑制作用、抗アポトーシス作用、抗炎症作用、繊維化抑制作用を介して、心血管リモデリング予防効果を発揮するこ

とが明らかとなった。この事は、肥満症やメタボリックシンドロームにおける虚血性心疾患発症の病態への低アディポネクチン血症の関与を示唆しており、アディポネクチンが、心血管病への診断に有用であるだけでなく、アディポネクチンを上昇させる薬剤や治療法の開発、アディポネクチン受容体に対する作動薬の開発が心血管病の新しい治療法につながる可能性を示唆している。

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 25 件) (すべて査読有り)

1. Shimano M, Ouchi N, Shibata R (責任著者), Ohashi K, Pimentel DR, Murohara T, Walsh K. Adiponectin deficiency exacerbates cardiac dysfunction following pressure overload through disruption of an AMPK-dependent angiogenic response. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 (in press).
2. Kondo K, Shibata R (責任著者), Unno K, Shimano M, Ishii M, Kito T, Shintani S, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Impact of a single intracoronary administration of adiponectin on myocardial ischemia/reperfusion injury in pig model. *Circ; Cardiovascular Interventions.* 2010 (in press).
3. Unno K, Shibata R (責任著者), Izawa H, Hirashiki A, Murase Y, Yamada T, Kobayashi M, Noda A, Nagata K, Ouchi N, Murohara T. Adiponectin acts as a positive indicator of left ventricular diastolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 2010 (in press).
4. Li P, Shibata R (責任著者), Unno K, Shimano M, Furukawa M, Ohashi T, Cheng X, Nagata K, Ouchi N, Murohara T. Evidence for the importance of adiponectin in the cardioprotective effects of pioglitazone. *Hypertension.* 55(1):69-75,

2010.

5. Shimano M, Shibata R (責任著者), Inden Y, Yoshida N, Uchikawa T, Tsuji Y, Murohara T. Reactive oxidative metabolites are associated with atrial conduction disturbance in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 6(7):935-940, 2009 .
6. Kondo M, Shibata R (責任著者), Miura R, Shimano M, Kondo K, Li P, Ohashi T, Kihara S, Maeda N, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 284(3):1718-1724, 2009 .
7. Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M, Kitagawa Y, Murohara T. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29(1):61-66, 2009 .
8. Komai H, Shibata R, Juri M, Matsushita K, Ouchi N, Murohara T. Plasma adiponectin as a predictive factor of survival after a bypass operation for peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 50(1):95-99, 2009 .
9. Shibata R (責任著者), Ouchi N, Murohara T. Adiponectin and cardiovascular disease. *Circ J*. 73(4):608-614, 2009
10. Shimano M, Shibata R (責任著者), Tsuji Y, Kamiya H, Uchikawa T, Harata S, Muto M, Ouchi N, Inden Y, Murohara T. Circulating adiponectin levels in patients with atrial fibrillation. *Circ J*. 72(7):1120-1124, 2008 .
11. Shibata R (責任著者), Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K. Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS Lett*. 582(11):1607-1612, 2008 .

12. Shibata R (責任著者), Numaguchi Y, Matsushita K, Sone T, Kubota R, Ohashi T, Ishii M, Kihara S, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Usefulness of adiponectin to predict myocardial salvage following successful reperfusion in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 101(12):1712-1715, 2008.
13. Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, Shibata R, Qiu J, Kudo C, Shin HK, Moskowitz MA, Ouchi N. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation*. 117(2):216-223, 2008
14. Kato MF, Shibata R, Obata K, Miyachi M, Yazawa H, Tsuboi K, Yamada T, Nishizawa T, Noda A, Cheng XW, Murate T, Koike Y, Murohara T, Yokota M, Nagata K. Pioglitazone attenuates cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension: role of activation of AMP-activated protein kinase and inhibition of Akt. *J Hypertens*. 26(8):1669-1676, 2008 .
15. Ikeda Y, Ohashi K, Shibata R, Pimentel DR, Kihara S, Ouchi N, Walsh K. Cyclooxygenase-2 induction by adiponectin is regulated by a sphingosine kinase-1 dependent mechanism in cardiac myocytes. *FEBS Lett*. 582(7):1147-1150, 2008 (IF 3.264).
16. Shibata R (責任著者), Ouchi N, Walsh K, Murohara T. Potential of adiponectin as a cardioprotective agent. *Future Cardiol*. 3(6):647-656, 2007.
17. Shibata R, Izumiya Y, Sato K, Papanicolaou K, Kihara S, Colucci WS, Sam F, Ouchi N, Walsh K. Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 42(6):1065-1074, 2007.

〔学会発表〕(計 10 件)

海外招待講演等

ワークショップ

1. Shibata R, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Caloric restriction stimulates ischemia-induced angiogenesis via adiponectin-mediated activation of eNOS. The XV International Symposium on Atherosclerosis, Jun 15, 2009 (USA New Orleans).

国内招待講演等

シンポジウム

1. 柴田 玲: Role of adiponectin in regulation of cardiac remodeling:第74回日本循環器病学会:3月5日, 2010. 京都
2. 柴田玲:アディポサイトカインと循環器疾患:第13回日本心不全学会:10月31日, 2009. 福岡国際会議場

モーニングレクチャー

1. 柴田玲:アディポサイトカインと循環器疾患:第73回日本循環器病学会:3月22日, 2009. 大阪国際会議場

ランチョンセミナー

1. 柴田玲:脂肪細胞由来因子アディポネクチンのNOを介した血管新生作用:第9回日本NO学会:5月9日, 2009. 静岡

Young Investigator award 受賞講演

1. Li P, Shibata R, Murohara T: Fenofibrate mediates angiogenesis in response to ischemia via adiponectin-mediated LKB1/AMPK dependent mechanism: 第 74 回日本循環器病学会: 国際留学生 Young Investigator Award 優秀賞:3月5日, 2010. 京都
2. 柴田玲, 近藤和久, 室原豊明: Impact of a single intracoronary administration of

adiponectin on myocardial ischemia / reperfusion injury in pig model: 第13回日本心不全学会優秀賞: 10月30日, 2009. 福岡

3. Li P, Shibata R, Murohara T: Pioglitazone Attenuates Angiotensin II-induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis Through Stimulation of Adiponectin Secretion: 第73回日本循環器病学会: 国際留学生 Young Investigator Award 優秀賞:3月21日, 2009. 大阪

4. 柴田玲, 沼口靖, 大内乗有, Kenneth Walsh, 室原豊明: Adiponectin predicts myocardial salvage following successful reperfusion in patients with acute myocardial infarction: 第56回日本心臓病学会 Young Investigator Award 最優秀賞:9月8日, 2008. 東京

〔図書〕(計 1 件)

1. 森永 卓郎, 柴田玲: 痩せりゃいい、つてもんじゃない!-脂肪の科学, 文春新書, 2008 年 6月20日発刊. 166P

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: THERAPEUTIC APPLICATION OF ADIPONECTIN IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

発明者: 柴田玲、室原豊明

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 12/713, 709

出願年月日: 22年2月26日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/junnai/junnai/>

受賞

- ① 2009年 第56回日本心臓病学会 Young Investigator Award 最優秀賞

② 2009 年 第 13 回日本心不全学会 Young
Investigator Award 優秀賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 玲 (SHIBATA REI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・

特任講師

研究者番号 : 70343689