

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790644

研究課題名 (和文) レジスチン様分子の動脈硬化における役割の解析

研究課題名 (英文) Investigation of roles of resistin like molecule beta in pathogenesis of atherosclerosis

研究代表者

櫛山 暁史 (KUSHIYAMA AKIFUMI)

朝日生命成人病研究所・その他部局等・准教授

研究者番号：30435820

研究成果の概要 (和文)：レジスチン様分子 β (RELM β) は血管内皮細胞に対し増殖活性・遊走能亢進活性を示して血管新生 (弱く破れやすい血管が増え、動脈硬化巣が破れすくなり心筋梗塞や脳梗塞を生じやすい) を生じ、一方で内皮機能障害 (血管をリラックスさせる反応が低下すること) を来した。また実際に生体の中でも RELM β の濃度が上昇すると動脈硬化が進行することが示された。国民的・世界的な疾病である心筋梗塞・脳梗塞などの動脈硬化性疾患にレジスチン様分子が関与する可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：Resistin like molecule beta (RELM β) exhibited endothelial growth activity, migration activity, and angiogenesis progression, whereas endothelial dysfunction. Elevated serum RELM β resulted atherosclerosis progression *in vivo*. It was suggested that RELM β was involved in pathogenesis of atherosclerosis, cause of global disease, such as myocardial infarction and cerebral infarction,

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化症、血管内皮機能、血管新生、RELM β

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリン抵抗性は、2型糖尿病、動脈硬化の主要な原因であり、人類の死因の大多数を占める脳梗塞や心筋梗塞といった、大血管障害の発症の原因となる。様々なメカニズムによりインスリン抵抗性が惹起されることが知られるが、近年、内臓脂肪より分泌

される分子が全身を循環し、臓器間ネットワークとも呼ぶべき反応がインスリン抵抗性やそれに起因する動脈硬化に重要であることが明らかとなり、メタボリック症候群という新概念が規定されたが、インスリン抵抗性の改善、あるいは大血管障害の予防のため、これら分泌タンパクとインスリン抵抗性、あ

るいは動脈硬化との関連に関する研究は世界的にも、創薬の分野を含めて競争が激しい研究領域である。その中でレジスチンは、脂肪細胞より分泌され、肝でのインスリン抵抗性や糖脂質代謝異常をもたらすことが示唆されている。またヒトで動脈硬化との関連も示唆されている。そのレジスチンはマウスでアイソフォームが3種同定されており、それぞれREsistin-Like Molecule (RELM) α 、 β 、 γ と命名されている。そのうちRELM β のみが、ヒトに存在することが確認されている。RELMsはレジスチンと同様血液中を循環することが知られており、レジスチンとは発現臓器が異なり、また発現の制御機構も異なっている。

(2) 我々のグループでは、RELM β が高脂肪食負荷や *db/db* マウスなどで発現量が増加していることを発表し、さらに私は 2005 年には RELM β 過剰発現マウスの解析によって、RELM β による長期刺激によって糖尿病・高脂血症・脂肪肝といったメタボリック症候群様の表現形を呈し、インスリン抵抗性が生じていることを突き止めた。すなわち、RELM β は栄養の吸収や、外界との免疫防御にとって重要な場である腸管でのみ発現し、食事や腸管の炎症によりその発現が制御されることが知られているため、食事や腸管の状態(感染症などの炎症を含む)が RELM β を介してインスリン抵抗性に影響する、というメカニズムが想定された。

(3) 一方、インスリン抵抗性を惹起する因子は、動脈硬化をも惹起することが多く、RELM β も糖尿病・高脂血症などの発症を介して動脈硬化に影響することが容易に想像されるが、インスリン抵抗性に関するアディポサイトカインであるアディポネクチンや TNF α 、レジスチンはそれ単独でも血管に対して直接的に動脈硬化に関連することが知られており、RELM β が動脈硬化性の変化に対して直接的な影響があるかどうかを検証していくことは医学的研究として極めて重要なテーマと考えられる。Preliminary には RELM β 過剰発現マウスでは若干血圧が高いことや、血管の収縮性が強いことを確認しており、血管に対して何らかの作用があると考えられる。

2. 研究の目的

(1) RELM β が動脈硬化に関連するメカニズムを詳細に解析する。動脈硬化の病態に関して重要な役割を果たす血管内皮細胞とマクロファージを中心に解析を進める。まず、単離したマウスの血管による Aortic ring assay を行い、RELM β による血管内皮の血管形成能への影響に関して解析する。さらに、単離したマウス血管内皮及び HUVEC (ヒト臍帯静脈上皮細胞) 細胞に RELM β を投与して、血管内皮機能への影響を解析する。主な

解析対象は、細胞の遊走能、eNOS など血管内皮の機能に関連する。また、マクロファージを単離し、RELM β を投与した際の、マクロファージの血管内皮への遊走・接着能の変化や、遺伝子発現変化に関しても探索していく。これら細胞レベル(*in vitro*)、あるいは単離血管(*ex vivo*)でのデータを集積するのに加え、*in vivo*での RELM β の作用を検討するため、RELM β 過剰発現マウスと、RELM β 発現アデノウイルスを用いて、RELM β の血管カフ障害モデルにおける血管内膜肥厚に対する影響を検討する。

(2) 上述のようにマウスでの RELM β の作用が糖尿病・動脈硬化に重要であることは明らかとなりつつあるので、ヒトで RELM β が糖尿病や動脈硬化症にとって重要であるかを検討する。ここでは RELM β の生理的な範囲の変動でどの程度インスリン抵抗性や動脈硬化に影響するか、という点が重要である。したがって RELM β の血中濃度に関してはこれまでウエスタンブロットにより検討しているが、より定量性の確かな RIA や ELISA の系が確立される必要があり、humanRELM β のモノクローナル抗体を作成して血清 ELISA の系を確立していく予定である。完成後、ヒトで RELM β の血中濃度の変動と、インスリン抵抗性状態、また動脈硬化による疾病の発症率を調査し、RELM β が病態を反映し、予後予測につながるかどうかを検討する。また、頸動脈の内膜肥厚の程度と血中 RELM β の濃度の相関についても検討する。

3. 研究の方法

(1) ①*in vitro*(細胞レベル)実験

HUVEC(ヒト臍帯静脈血管内皮細胞)及び EOMA cell(マウス血管内皮由来細胞系列)、また RAW264 (マウス単球様細胞系列)、マウスより単離したマクロファージを用いた MTT アッセイ、BrdU 取り込みアッセイ、scratch migration assay、membrane invasion assay により、RELM β 投与による細胞の増殖能、遊走能の変化を見る。またこれらの細胞に RELM β を投与した際の細胞内シグナル伝達をウエスタンブロットなどの手法で解析する。mRNA を抽出し、血管内皮の機能に関与する遺伝子の転写調節に関しても検討する。

②*ex vivo*(単離血管)実験

単離した大動脈を用いての Aortic ring assay。Aortic ring assay は血管をリング状に単離しコラーゲンマトリクス内で三次元培養を行うもので、新生血管の本数、長さなどが血管形成能の指標として有用である。

③*in vivo*(動物)実験

カフ障害モデルを用い、RELM β 過剰発現マウスとその同胞マウスにおいて、カフ障害による内膜肥厚の程度が増加するか検討す

る。内膜肥厚の比較のための染色には Elastic van Gieson 染色、染 CD31 抗体、抗平滑筋抗体、抗マクロファージ抗体などを用い、血管の構成細胞の染め分け、マクロファージの浸潤に関しても検出していく。

(2) ヒト RELM β の血清 ELISA システムの作成

すでにヒト RELM β に対するウサギポリクロナル抗体は作成し、マウスモノクロナル抗体は一次スクリーニングですでにヒト RELM β に反応する抗体を分泌するハイブリドーマを得ており、現在クローニング中である。このハイブリドーマをヌードマウス腹腔に注射して腹水よりモノクロナル抗体を回収・精製する。モノクロナル抗体完成の後、血清 ELISA システムの開発を行う。NUNC 社の蛋白高結合性プレートに、作成した RELM β モノクロナル抗体を結合させ、ブロッキングの後、血清を加え、RELM β モノクロナル抗体と反応させた後にさらにウサギポリクロナル抗体を結合させるサンドイッチ ELISA の方法を用いる。なお、検出には化学発色では感度不十分となる可能性が考えられ、蛍光発光を利用したシステムも検討する。

健常者・糖尿病患者・冠動脈疾患などの動脈硬化を有する患者血清での RELM β レベルの比較

作成したヒト RELM β の血清 ELISA システムを用いて当研究所附属病院患者を対象に血清 RELM β を測定する。入院患者においては、協力の得られた場合には診療上必要な頻回採血時に合わせて血清を採取し、食事による血清 RELM β の変動を測定していく。また、外来患者に関しては、血清サンプリングに関しては当研究所附属病院通院中の患者（4000人程度）の中からランダムに対象を絞り、健常人と糖尿病患者・冠動脈疾患患者との比較を行う。統計的手法としては重回帰分析を行う。回帰因子としては、年齢、性別、体重、糖尿病の有無、冠動脈疾患の有無、血清脂質コントロール、血圧、血清 hsCRP の値、血清アディポネクチンの値、血清レジスチンの値、血清 IL-6 の値、使用中の薬剤といった既知のインスリン抵抗性及び動脈硬化関連因子とされている因子と比較して RELM β が独立した（あるいは薬剤などと連動した）インスリン抵抗性あるいは動脈硬化増悪因子であるかどうかを検討する。さらに、平成19年度～平成20年度の間に当研究所附属病院では動脈硬化の指標を調べるための検査の一つとして比較的さかんに行われている頸動脈超音波検査を施行した患者について、血清 RELM β と頸動脈の内膜肥厚や echo lucency (脳血管障害のリスクファクターとされる) の有無との相関を調査する。

4. 研究成果

(1) ① *in vitro* (細胞レベル) 実験

HUVEC 及び EOMA cell、RAW264 について検討したところ、MTT アッセイ、BrdU 取り込みアッセイでは HUVEC 以外で RELM β による増殖活性が認められた。scratch migration assay、membrane invasion assay ではすべての細胞系列で RELM β 投与による遊走能の亢進を認めた。またこれらの細胞に RELM β を投与した際の細胞内シグナル伝達をウエスタンブロットした場合に、ERK-1/2、p38、JNK のリン酸化を生じ、また血管内皮細胞の系では eNOS Ser1177 はリン酸化は低下、eNOS Thr475 のリン酸化は亢進していた。さらに、NO 産生は RELM β 投与で抑制されていた。すなわち RELM β によって血管弛緩反応が抑制されることが示唆された。マクロファージ細胞系列に対しては逆に NO 産生は亢進しており、また炎症性サイトカインの分泌 (TNF α 、IL-6) 亢進を認めた。

② *ex vivo* (単離血管) 実験

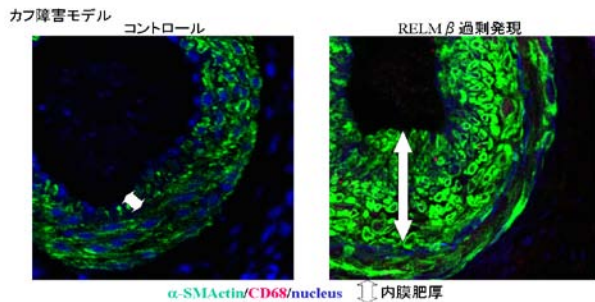
単離した大動脈を用いての Aortic ring assay では、新生血管の本数、長さともに RELM β を投与すると増加していた。RELM β の持つ細胞遊走能の亢進と炎症惹起の影響と考えられた。

③ *in vivo* (動物) 実験

カフ障害モデルを用い、RELM β 過剰発現マウスとその同胞マウスにおいて、カフ障害による内膜肥厚の程度が増加するか検討したところ、RELM β 過剰発現マウスでは内膜の肥厚を生じ、血管平滑筋細胞の明らかな増生と炎症細胞浸潤を認めた (下図)。また、マイクロアレイを用いた検討によれば、RELM β 過剰発現マウスでは動脈壁で粥状動脈硬化を誘導する遺伝子プロファイルを示した (下表)。

(2) ヒト RELM β の血清 ELISA システムの作成

マウスモノクロナル抗体はヒト RELM β に反応する抗体を得られたが、ELISA 開発を行った。RELM β 自体の検出はサンドイッチ ELISA により行うことができたが、バックグラウンドが高値となってしまう問題があるために、様々な方法 (交代濃度の検討、ブロッキング剤の選択やゲル濾過による抗体の再精製) により解決を図ったが難しく、商業化には至っておらず、開発を続行中である。そのため、当研究所附属病院患者を対象にした血清 RELM β の測定に関しては当研究所附属病院の倫理委員会は通過し、血清保存とデータの収集にとどまっているが、データ収集を含めて続行中である。一部のプロジェクトについては、現在投稿中である。



Pathway based on Molecule

rank	name	score	score(p)
1	NFKBによる発現調節 (Transcriptional regulation by NFKB)	773.074	1.913E-233
2	IRFによる発現調節 (Transcriptional regulation by IRF)	102.438	1.457E-031
3	Ets-1/2による発現調節 (Transcriptional regulation by Ets-1/2)	81.875	2.256E-025
4	GRによる発現調節 (Transcriptional regulation by GR)	55.788	1.607E-017
5	C/EBPによる発現調節 (Transcriptional regulation by C/EBP)	48.680	2.217E-015
6	VDRによる発現調節 (Transcriptional regulation by VDR)	40.609	5.965E-013
7	AP-1による発現調節 (Transcriptional regulation by AP-1)	38.688	2.258E-012
8	RUNXによる発現調節 (Transcriptional regulation by RUNX)	37.752	4.319E-012
9	SMADによる発現調節 (Transcriptional regulation by SMAD)	35.250	2.448E-011
10	PU.1による発現調節 (Transcriptional regulation by PU.1)	34.623	3.780E-011

これら全体の結果の公表については、さらにヒトでの検討を加えるなどしており、2009-2010に公表できる予定である。本プロジェクトが完遂されることで動脈硬化の発症メカニズムの一端を明らかに出来、ひいては抗動脈硬化薬の創薬にもつながると考えられる。

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 7 件)

1: Egawa M, Kamata H, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Nakatsu Y, Ying G, Jun Z, Tsuchiya Y, Takata K, Kurihara H, Asano T. Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast BeWo cells. *Placenta*. 2008 Dec;29(12):1003-8.

2: Horike N, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Kamata H, Nishiyama K, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H, Asano T. AMP-activated protein kinase activation increases phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta and thereby reduces cAMP-responsive element transcriptional activity and phosphoenolpyruvate carboxykinase C gene expression in the liver. *J Biol Chem*. 2008 Dec 5;283(49):33902-10.

3: Koketsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyama A, Fukushima Y, Ono H, Anai M, Kikuchi T, Fukuda T, Kamata H, Horike N, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T. Hepatic

overexpression of a dominant negative form of raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin sensitivity in K/KAy mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Apr;294(4):E719-25.

4: Asano T, Sakoda H, Fujishiro M, Anai M, Kushiyama A, Horike N, Kamata H, Ogihara T, Kurihara H, Uchijima Y. Physiological significance of resistin and resistin-like molecules in the inflammatory process and insulin resistance. *Curr Diabetes Rev*. 2006 Nov;2(4):449-54.

5: Fujio J, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ogihara T, Fukushima Y, Anai M, Horike N, Kamata H, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T. Regulation of gut-derived resistin-like molecule beta expression by nutrients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Jan;79(1):2-10.

6: Asano T, Fujishiro M, Kushiyama A, Nakatsu Y, Yoneda M, Kamata H, Sakoda H.

Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions. *Biol Pharm Bull*. 2007 Sep;30(9):1610-6.

7: Ono H, Sakoda H, Fujishiro M, Anai M, Kushiyama A, Fukushima Y, Katagiri H, Ogihara T, Oka Y, Kamata H, Horike N, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T. Carboxy-terminal modulator protein induces Akt phosphorylation and activation, thereby enhancing antiapoptotic, glycogen synthetic, and glucose uptake pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Nov;293(5):C1576-85.

[学会発表] (計 3 件)

1. Functionally distinct roles of each member of the resistin family in insulin resistance and atherosclerosis

A. Kushiyama, H. Sakoda, M. Fujishiro, H. Ohno, M. Yoneda, Y. Nakatsu, H. Kamata, M. Kikuchi, T. Asano

68th American Diabetes Association Scientific Sessions/San Francisco, USA : June 6-10, 2008

2. インスリン抵抗性を誘導するレジスチンファミリー (resistin/RELMβ) は各々異なった機序で動脈硬化に関与する

榎山 暁史, 浅野知一郎, 迫田秀之, 藤城 緑, 瀬瀬優子, 福田武俊, 佃 克則, 大西由希子, Amelia, 犬飼浩一, 菊池方利

第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会/東京都 : 5月22-24日, 2008

3. Resistin-like molecule (RELM) β は内皮機能障害及び炎症反応を介して動脈硬化に関与する

榎山 暁史, 浅野知一郎, 迫田秀之, 藤城 緑, 瀬瀬優子, 穴井元暢, 油谷浩幸, 栗原裕基, 菊池方利

BMB2007/神奈川県 : 12月13日, 2007

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリック
クシンドロームの検出方法

発明者：櫛山 暁史・浅野知一郎

権利者：同上

種類：特許

番号：2007-321240

出願年月日：2007年12月12日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.asahi-life.or.jp/laboratory/
biomolecular.html](http://www.asahi-life.or.jp/laboratory/biomolecular.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛山 暁史 (KUSHIYAMA AKIFUMI)

朝日生命成人病研究所・その他部局・准教
授

研究者番号：30435820

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：