

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590957

研究課題名（和文）

脂肪酸結合蛋白の発現調節機構を標的とした病的腎臓由来の新規動脈硬化促進因子の同定

研究課題名（英文） Identification of a novel gene to promote atherosclerosis development by regulating fatty acid binding protein secreted from dysfunctional kidney

研究代表者

山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)

京都府立医科大学医学研究科・助教

研究者番号：00240036

研究成果の概要（和文）：

片腎摘出により慢性腎臓病モデルマウス（UNX）を作製し、動脈硬化形成前の腎臓における遺伝子発現様式をマイクロレイ解析を用いて網羅的に探索した。脂質代謝や動脈硬化形成に直接関与している脂肪酸結合蛋白（Fatty acid-binding protein 4：FABP4）遺伝子の発現が残存腎において亢進していることを見出したが、タンパクレベルにおける有意な発現亢進は認めなかった。しかしながら、UNX マウスでは胸部大動脈周囲脂肪組織におけるアンジオテンシノーゲン（AGT）の遺伝子発現レベルおよびアンジオテンシン II 濃度が対照マウスに比べて有意に増加していた。一方、精巣周囲脂肪組織における AGT 発現レベルおよび血漿 AngII 濃度は両群間で同等であったことから、大動脈周囲脂肪組織に特異的な RA 系の賦活化が UNX マウスの動脈硬化形成増悪に関与している可能性が示唆された。血管周囲脂肪組織は白色脂肪組織とは異なり褐色脂肪様の表現型を示すが、UNX マウスの大動脈周囲脂肪組織におけるレニン・アンジオテンシン（RA）系の亢進メカニズムを解析するうえで、インスリンによる AGT の発現亢進に注目した。UNX マウスでは HOMA-IR の増大とグルコース負荷時における血清インスリン値が対照マウスに比べて有意に高値であった。血管周囲脂肪組織より採取した成熟脂肪細胞はインスリン刺激後に AGT の発現増加を示し、PI3 キナーゼ阻害薬である Wortmannin によってその発現が抑制された。精巣脂肪組織より採取した成熟脂肪細胞ではインスリン刺激後の AGT 発現増加は認めなかった。脂肪組織特異的なインスリン刺激による RA 系の賦活化が UNX マウスにおける動脈硬化進展機序に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we demonstrated for the first time that exaggerated atherosclerosis development elicited by uninephrectomy was closely associated with PAT-specific increases in AGT mRNA expression and Ang II secretion without enhanced recruitment of monocytes/macrophages. HOMA-IR index and plasma insulin concentrations after glucose loading were markedly elevated in uninephrectomized apoE^{-/-} mice, and insulin stimulation of isolated PAT mature adipocytes significantly increased AGT mRNA expression in a depot-specific manner, suggesting that insulin resistance-associated hyperinsulinemia most likely contributed to the PAT-specific activation of RAS. In contrast, expression of adhesion molecules in the vasculature and the number of circulating inflammatory monocytes, which played a crucial role in the early stage of atherosclerosis development, were not altered by uninephrectomy. Moreover, accelerated atherosclerosis development caused by uninephrectomy was completely inhibited in apoE^{-/-}/AT1aR^{-/-} mice or by treatment with angiotensin II type 1 receptor blocker (olmesartan), further supporting the notion that PAT-specific activation of RAS is substantially involved in the CKD-associated atherogenesis and could be a novel therapeutic target for the prevention of CKD-associated cardiovascular disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環器内科学

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：血管病態学

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease:CKD)は脳・心血管イベントの独立した危険因子であるが、動脈硬化の病態生理における分子生物学的メカニズムは十分解明されていない。申請者はこれまで骨髄単球・マクロファージ前駆細胞におけるレニン・アンジオテンシン(RA)系に着目し、アンジオテンシン II (AngII)タイプ1 (AT1)受容体が骨髄単球・マクロファージ系前駆細胞の分化・増殖・活性化を介して動脈硬化形成の病態生理に関与することを報告してきた(ATVB 2010)。片腎摘出による慢性腎臓病モデルマウスの残存腎臓を用いたマイクロアレイ解析を実施した結果、マクロファージ活性化や泡沫細胞形成を促進する脂肪酸結合蛋白(Fatty-Acid-Binding Protein4:FABP4)遺伝子の発現亢進を認めた。

2. 研究の目的

脂質代謝や動脈硬化形成に直接関与している脂肪酸結合蛋白(Fatty-acid-binding protein 4:FABP4)遺伝子の発現が残存腎において亢進していることより、その遺伝子発現制御機構を明らかにすると共に、病的腎臓由来の動脈硬化刺激因子を同定する。

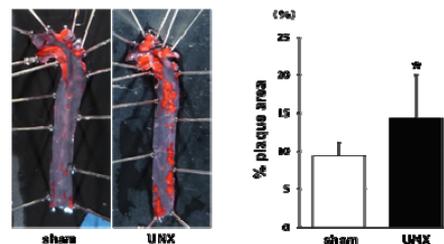
3. 研究の方法

慢性腎臓病モデルマウスの作製および動脈硬化病変の評価
慢性腎臓病モデルマウスの大動脈周囲脂肪組織における表現型の解析
慢性腎臓病モデルマウスの大動脈周囲脂肪組織特異的 RA 系賦活化のメカニズムの解析
大動脈周囲脂肪由来成熟脂肪細胞のインスリン刺激によるアンジオテンシノーゲン発現機序の解析

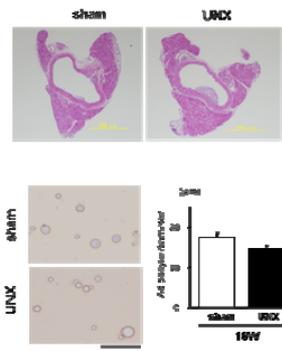
4. 研究成果

8 週齢アポ E 欠損マウスの片腎を摘出し慢性腎臓病モデルマウス (UNX) を作製した。12

週齢より高コレステロール食を開始し 20 週齢における動脈硬化形成を評価した。UNX マウスでは胸部大動脈における動脈硬化形成の有意な増大を認めた。

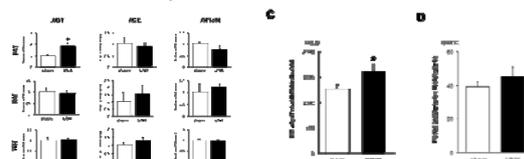


16 週齢時の大動脈周囲脂肪組織重量、断面積、脂肪滴径、各種アディポサイトカインの mRNA 発現レベルは両群間で同等であった。



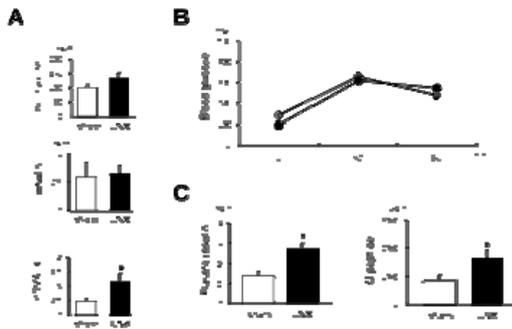
一方、肩甲骨間褐色脂肪組織(BAT)や精巣周囲白色脂肪組織(WAT)とは異なり、大動脈周囲脂肪組織(PAT)特異的にアンジオテンシノーゲン mRNA の発現亢進と AngII 濃度の増大が認められた。

血漿 AngII 濃度は両群間で同等であった。また、大動脈における接着因子の発現レベルおよび末梢血中の単球数も両群間で同等であった。

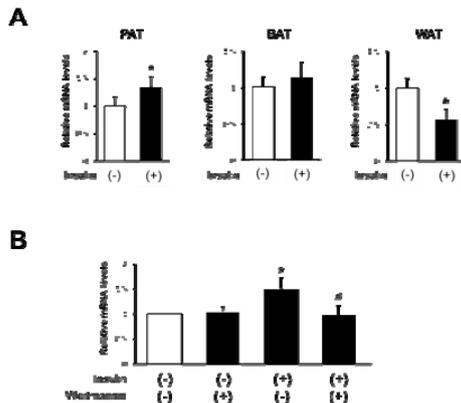


以上の結果より、UNX マウスにおける PAT 特異的な RA 系の賦活化は、UNX マウスの動脈硬化進展過程に重要な役割を果たしていることが示唆された。UNX マウスの PAT における

アンジオテンシノーゲン発現亢進機構として高インスリン血症に注目した。UNX マウスの HOMA-IR および糖負荷後の血漿インスリン濃度は対照マウスに比し有意に高値を示した。



各脂肪組織より採取した成熟脂肪細胞に対するインスリン刺激後のアンジオテンシノーゲン発現レベルは WAT 由来成熟脂肪細胞において低下していたが、PAT 由来成熟脂肪細胞では逆に有意に増加し、PI3-K 阻害薬の投与によりその増加は完全に消失した。



インスリン刺激後のアンジオテンシノーゲン発現調節が WAT と PAT で異なるメカニズムについては今後の検討を要すると考えられた。さらに、本研究結果はインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症が血管周囲脂肪組織の RA 系賦活化を介して動脈硬化を進展させる可能性を示唆しており、新たな RA 系の治療標的として注目される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Tsubakimoto Y, Yamada H, Yokoi H, Kishida S, Takata H, Kawahito H, Matsui A, Urao N, Nozawa Y, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Hiroaki Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin AT₁ Receptor Regulates Differentiation of Monocyte Lineage Progenitors from Hematopoietic Stem

Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1529-1536.

2. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Taku Kato T, Akihiro Matsui A, Hideyo Hirai H, Eishi Ashihara E, Taira Maekawa T, Masaru Iwai M, Masatsugu Horiuchi M, Kouji Ikeda K, Tomosaburo Takahashi T, Mitsuhiro Okigaki M, and Hiroaki Matsubara H. Bone Marrow AT₁ Augments Neointima Formation by Promoting Mobilization of Smooth Muscle Progenitors via Platelet-Derived SDF-1 α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:60-67.
3. 川人浩之、山田浩之、松原弘明 CKD と心血管病 *Renin Academy Japan Journal* 9:12-13, 2012
4. 山田浩之、松原弘明 受容体・シグナル伝達の最新知見 AT₁ 受容体 高血圧 (第 4 版)、日本臨床社、大阪:288-293、2009
5. 山田浩之、松原弘明 骨髄 RAS の血管傷害後内膜増生における役割 *医学のあゆみ* 228(5):446-451, 2009.
6. 山田浩之、横井宏和、椿本恵則、高田博樹、川人浩之、岸田聡、松原弘明 プラーク形成・不安定化における AT₁ 受容体の役割 *分子血管病学* 10(2):25-31, 2009

[学会発表] (計 14 件)

1. Yamada H, Tsubakimoto Y, Yokoi H, Kishida S, Kato T, Kawahito H, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Ikeda K, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone marrow angiotensin AT₁ receptor regulates differentiation of Monocyte lineage progenitors from hematopoietic stem cells. *International Congress of Endocrinology (ICE) 2010 Mar26-30, Kyoto, Japan*
2. Yamada H, Tsubakimoto Y, Yokoi H, Kishida S, Kato T, Kawahito H, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Ikeda K, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone marrow AT₁ augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1 α . *International Congress of Endocrinology (ICE) 2010 Mar26-30, Kyoto, Japan*
3. Yamada H, Tsubakimoto Y, Yokoi H, Kishida S, Kato T, Kawahito H, Okigaki

- M, Matsubara H. Bone marrow angiotensin AT₁ receptor regulates differentiation of monocyte lineage progenitors from hematopoietic stem cells. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (CVEM) 2010 March 31-April 1, Nara, Japan
4. Kawahito H, Yamada H, Kishida S, Kato T, Irie D, Fukui K, Ikeda K, Okigaki M, Mori M, Matsubara H. Phenotypic conversion of brown to white perivascular adipose tissue in uninephrectomized apoE deficient mice: Possible role in the early stage of atherosclerosis in chronic kidney disease. American Heart Association (米国心臓病学会) 2011 Nov12-16, Orland, USA
 5. Irie D, Yamada H, Kato T, Kawahito H, Kishida S, Fukui K, Ikeda K, Okigaki M, Matsubara H. Impaired periaortic differentiation in angiotensin AT₁ receptor deficient mice: Possible role in pro-inflammatory phenotypic modulation of perivascular adipose tissue. American Heart Association (米国心臓病学会) 2011 Nov12-16, Orland, USA
 6. Kato T, Yamada H, Kawahito H, Irie D, Fukui K, Ikeda K, Okigaki M, Mogi M, Iwai M, Horiuchi M, Matsubara H. Bone marrow angiotensin AT₂ receptor deficiency aggravates atherosclerosis by eliminating macrophage liver X receptor-mediated anti-atherogenic actions. American Heart Association (米国心臓病学会) 2011 Nov12-16, Orland, USA
 7. 川人浩之、山田浩之、岸田聡、加藤拓、高橋知三郎、沖垣光彦、森泰清、松原弘明 慢性腎臓病 (CKD) における動脈硬化促進の分子メカニズム—アポE欠損マウスCKD腎臓でのマイクロアレイ解析— 第32回日本高血圧学会総会 2009年10月 滋賀
 8. 川人浩之、山田浩之、入江大介、岸田聡、加藤拓、沖垣光彦、森泰清、松原弘明 血管周囲脂肪表現型とレニン・アンジオテンシン系 慢性腎臓病はRA系賦活化を介して動脈硬化を進展させる 第33回日本高血圧学会総会 2010年10月 福岡
 9. Yamada H. Bone Marrow Angiotensin AT₁ Receptor Regulates Differentiation of Monocyte Lineage Progenitors from Hematopoietic Stem Cells 第75回日本循環器学会 2011年8月 横浜
 10. Kawahito H, Yamada H, Kishida S, Kato T, Irie D, Ikeda K, Okigaki M, Mori Y, Matsubara H. Increased perivascular adipose tissue-specific development in uninephrectomized apoE deficient mice: Possible role in accelerated atherogenesis in chronic kidney disease. 第43回日本動脈硬化学会 2011年7月 札幌
 11. Kawahito H, Yamada H, Kato T, Kishida S, Irie D, Ikeda K, Okigaki M, Matsubara H. Increased perivascular adipose tissue-specific development in uninephrectomized apoE deficient mice: Possible role in accelerated atherogenesis in chronic kidney disease. 第75回日本循環器学会 2011年8月 横浜
 12. 川人浩之、山田浩之、入江大介、福居顕介、加藤拓、池田宏二、沖垣光彦、森泰清、松原弘明 片腎摘出 apoE 欠損マウスにおける血管周囲脂肪組織の形質変化—慢性腎臓病における動脈硬化進展機序への関与— 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月 宇都宮
 13. 川人浩之、山田浩之、岸田聡、加藤拓、入江大介、福居顕介、沖垣光彦、森泰清、松原弘明 Phenotypic conversion of perivascular adipose tissue in uninephrectomized apoE deficient mice: Mechanism in the early stage of atherosclerosis in CKD 第19回日本血管生物医学学会学術集会 2011年12月 東京
 14. 川人浩之、山田浩之、岸田聡、加藤拓、入江大介、福居顕介、池田宏二、沖垣光彦、森泰清、松原弘明 Phenotypic conversion of perivascular adipose tissue in uninephrectomized apoE deficient mice: Possible role in the early stage of atherosclerosis in chronic kidney disease 第76回日本循環器学会 2012年3月 福岡
6. 研究組織
(1) 研究代表者
山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)
京都府立医科大学医学研究科・助教
研究者番号：00240036