

## 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 5月 9日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009-2011

課題番号：21591140

研究課題名（和文）ヘパリンコファクターIIによる心リモデリングおよびインスリン抵抗性制御機構の解析

研究課題名（英文）Pathophysiological roles of heparin cofactor II in cardiac remodeling and insulin resistance

研究代表者

栗飯原 賢一 (AIHARA KEN-ICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：70372711

研究成果の概要（和文）：トロンビンの生理的インヒビターであるヘパリンコファクターIIの欠損マウスを用い、アンジオテンシンII過剰負荷モデルの解析をしたところ、左室心筋間質の線維化および左房容積が野生型マウスに比較して増大していた。その成因として、NADPH oxidaseの活性化やTGF- $\beta$ などの心筋リモデリングの制御因子発現異常が見いだされた。また合成トロンビン阻害薬のアルガトロバンは、2型糖尿病モデルマウスのインスリン抵抗性を改善させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that thrombin inactivation ameliorate cardiac remodeling and diabetes. Angiotensin II accelerated cardiac concentric remodeling and larger left atrial volume with prominent interstitial fibrosis in heparin cofactor II (HCII), an endogenous thrombin inhibitor, -deficient mice than those in wild-type mice. And these cardiac phenotypes were caused by enhancement of NAD(P)H oxidase-transforming growth factor-beta1 pathway. In addition, we found that increased thrombin activity in adipose tissue contributes to the development of insulin resistance via enhancing MCP-1 production, leading to macrophage infiltration and insulin receptor substrate-1-Akt pathway inactivation.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：ヘパリンコファクターII、トロンビン、心筋リモデリング、インスリン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

我が国においてその予防と対策が急務とされているメタボリックシンドロームは腹部肥満によるインスリン抵抗性がその病態基盤にあり、高率に心血管イベントを引き起こすことが知られている。また心血管系ストレスの増大による心筋リモデリングの進行は重要な心血管イベントのリスクとなるが、メタボリックシンドロームでみられるインスリン抵抗性と心筋リモデリングの間には密接な関係があることが報告されている。この2つの病態は各々異なった病因によって生じるのではなく、共通した分子の作用異常によって引き起こされている可能性がある。近年の研究結果から、トロンビンはその受容体であるトロンビン受容体(PAR-1)の活性化を介して心血管リモデリングを促進させ、さらにはインスリン抵抗性をも増悪することが示唆されている。このことから我々は組織トロンビンの活性化が両者の表現型を関連づける鍵分子であると考えた。またトロンビン作用を生体内で効果的に阻害するヘパリンコファクターIIに注目し、その生理的意義を解明することは、心筋リモデリングとインスリン抵抗性の病態予防に大きく寄与するものと思われる。

### (1)心筋リモデリングにおける組織トロンビン作用とヘパリンコファクターII

トロンビンは血液凝固カスケードの鍵酵素として作用するのみならず、血管内皮細胞・血管平滑筋細胞・血小板に存在するトロンビン受容体(PAR1)を介して、細胞遊走・増殖、活性酸素産生などを来し、動脈硬化病変形成に深く関与している事が明らかとなっている。

ヘパリンコファクターII (HCII)は肝臓で合成分泌される一本鎖糖蛋白質で、主に傷害血管内皮下でのトロンビン作用を特異的に阻害する。我々はこれまでの臨床研究および遺伝子改変モデルを用いた解析からセリンプロテアーゼインヒビターであるヘパリンコファクターII(HCII)が新規の血管リモデリング抑制因子であることを見出した(Takamori et al. Circulation. 2004;109:481-6. Aihara et al. Circulation. 2004;109:2761-5, Aihara et al. J Clin Invest. 2007;117:1514-26)。これらの事実は、HCIIによる組織トロンビン活性化の阻害が血管リモデリングの進行を阻害する上で、有効な手段であることを示している。

一方、個体の心血管イベントの予後を決定する因子として血管リモデリングの他、心筋リモデリングも重要な要素であるが、心筋リモ

デリングにおけるトロンビンの作用や HCII の役割については未だ不明である。しかしながら心筋細胞には PAR-1 の発現が認められており、組織トロンビンの活性化が心筋リモデリングを促進することが予想され、それを HCII が抑制する可能性がある。

### (2)インスリン抵抗性発症における組織トロンビン作用とヘパリンコファクターII

アディポネクティンの解析をはじめとするメタボリックシンドローム発症分子基盤の解明は、ここ数年著しい進歩を見せているが、未だ未解明な部分も多く残されている。またその治療法も肥満症を基盤として発症した高血圧症・糖尿病・高脂血症の各々個別に対するものが中心であり、病態の根幹に対する治療法は未だ確立されているとは言えない。最近メタボリックシンドロームの発症機転において肥大化した脂肪細胞から分泌される TNF $\alpha$  や MCP-1 が脂肪組織へのマクロファージの浸潤をもたらすこと、さらにそのマクロファージから TNF $\alpha$  や MCP-1, IL6 などの炎症性サイトカインが分泌され、インスリン抵抗性を惹起する事が報告された

(Stuart et al. J. Clin. Invest. 2003. 112:1796-1808)。このことは、マクロファージの脂肪細胞における活性化が、メタボリックシンドローム発症の重要な要因であることを示しており、かつ根幹的治療法を模索するうえでの重要なターゲットとなる可能性を示唆している。一方、病的肥満患者では凝固能の活性化によるトロンビン産生の増加(Romano et al. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88:5321-6.)に加え、マクロファージ表面上には PAR-1 が存在し、トロンビンにより MCP-1 が誘導されることが報告されている(Colognato et al. Blood. 2003;102:2645-52.)。これらのことから我々は脂肪細胞におけるマクロファージの活性化機構に重要な影響を及ぼす分子として組織トロンビンに着目した。脂肪細胞におけるトロンビン-PAR1 を介したマクロファージの活性化制御の解析とその HCII を含めた組織トロンビン作用阻害効果の検討は、メタボリックシンドロームの基礎となるインスリン抵抗性の発症原因・病態の解明とその治療法の開発の上からも重要な意義を持つものと思われる。

## 2. 研究の目的

### (1)心筋リモデリングにおける組織トロンビン作用とヘパリンコファクターII

我々が作製した HCII 欠損マウスを用いて、心筋ストレス負荷モデルを用い、冠動脈のリモデリングを含めた心筋リモデリングの表

現型解析とその分子メカニズムの解明を行う事を目的とした。また同時に臨床においても心臓超音波装置を用いて、心筋リモデリングの表現型に HCII が関与するか否かを明らかにし、血漿 HCII 活性がヒトの心筋リモデリングの予後マーカーとなる可能性について検証することとした。

## (2)インスリン抵抗性発症における組織トロンビン作用とヘパリンコファクターII

トロンビンが肥満およびインスリン抵抗性制御因子の一つとして作用するとの仮説の下に、その相互作用に関わる因子のプロテオーム解析や2型糖尿病モデルマウスおよびHCII欠損マウスを用いた解析によりトロンビン-マクロファージ間のクロストーク並びに糖代謝制御系の関与の解明をはかる。また血漿HCII活性がヒトのインスリン抵抗性や2型糖尿病発症の予後マーカーとなる可能性についても検証することとした。

### 3. 研究の方法

#### I. 心血管リモデリングにおける組織トロンビン作用とヘパリンコファクターII

##### (1)HCII欠損マウスを用いた左室心筋リモデリング表現型の解析

###### (1)-1病理組織学的検討

野生型マウスと・CII欠損マウスの2群について、浸透圧ポンプにて2mg/kg/dayの割合でアンジオテンシンIIを2週間投与し、左室心筋の病理組織について、免疫染色を含め、心筋および心筋間質の線維化について検討を加えた。またヒトHCII蛋白の補充効果についても検証した。

(1)-2エコーによる心筋リモデリングの評価  
上記の2群のマウスにおける心筋リモデリングの精査を心臓エコー検査にて行い、左室および左房の形態評価と、左室機能について検証した。

###### (2)HCII欠損マウスにおける酸化ストレスの増大に関する検討

アンジオテンシンII負荷後の酸化ストレスの増大を尿中80HdGの排泄量の検討で確認した。また心筋における局所の活性酸素産生の増減について、dihydroethidium(DHE)染色による検討を行い、心筋間質および冠動脈周囲の発色強度を検証した。またアンジオテンシンIIによって誘導されるNADPH oxidaseコンポーネントの遺伝子発現の増減やRac-1の発現について検証した。

###### (3)ヒト心筋リモデリングにおけるHCIIの影響

#### 響に関する検討

徳島大学病院およびその関連施設の外来受診者、次年度より徳島大学病院にて正式発足するアンチエイジング医療センターのメタボリックシンドローム検診者を対象に心臓超音波検査を行い、血漿HCII活性と心筋リモデリングの形態および機能について相関の有無につき、多変量解析を用いて検証した。

## II. インスリン抵抗性発症における組織トロンビン作用とヘパリンコファクターII

### (1)抗トロンビン剤投与によるインスリン抵抗性改善効果の検討

8週齢の野生型マウスおよび2型糖尿病モデルであるdb/dbマウスに浸透圧ポンプを用いてプラセボおよび抗トロンビン剤であるアルガトロバン0.3mg/g/dayを4週間持続投与した。一晩絶食後に、インスリン負荷試験を行い、インスリン抵抗性の差異について検討した。HCII欠損マウスについては、高脂肪食負荷後の耐糖能を検証した。

### (2)免疫組織化学的検討

野生型マウスおよび、db/dbマウスマウスの脂肪組織における脂肪細胞サイズの解析や免疫組織化学的検討にてマクロファージの浸潤程度を各々アルガトロバンの投与・非投与群、で検討を行った。

### (3)インスリン抵抗性関連遺伝子および蛋白発現量の検討

野生型マウスおよび、db/dbマウスの脂肪組織と肝組織でのインスリンシグナル制御因子、アディポサイトカインやマクロファージ由来炎症性サイトカインの活性化や発現量の分析をreal-time PCRおよびWestern blotで検証した。

### 4. 研究成果

#### I. 心血管リモデリングにおける組織トロンビン作用とヘパリンコファクターII

##### (1)HCII欠損マウスを用いた左室心筋リモデリング表現型の解析

###### (1)-1病理組織学的検討

アンジオテンシンIIの負荷にて、HCII欠損マウスではマクロ病理標本にて左室求心性肥大、および左房の拡大を認めた。またミクロ組織の解析では心房および心室心筋間質の線維化亢進を認め、免疫染色の評価では、TGFβ1の発現増加が見られた。またこれらの変化はヒトHCIIの補充で回復した(図1)。

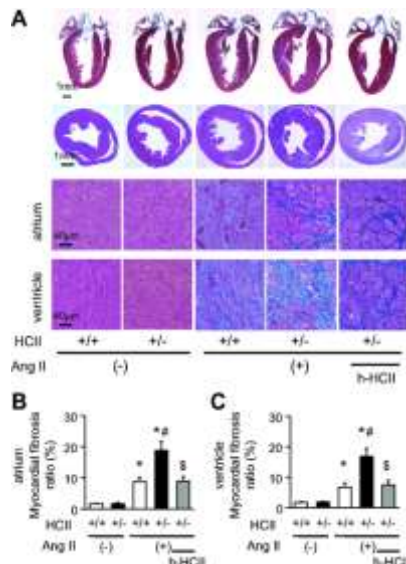


図 1. HcII 欠損マウスの心筋異常

(1)-2 エコーによる心筋リモデリングの評価  
アンジオテンシン II の負荷にて、HcII 欠損マウスでは左室収縮能の変化は見られなかったが、エコー計測にて左房拡大や左室の求心性肥大が見られた。

(2) HcII 欠損マウスにおける酸化ストレスの増大に関する検討

酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG はアンジオテンシン II 負荷にて HcII 欠損マウスで有意に増加していた。また心房や心室心筋では DHE 染色にて HcII 欠損マウスの活性酸素産生の優位な増多を認めた。またその成因として HcII 欠損マウスでは NADPH oxidase の component である Nox4, Rac-1, p67phox の発現増加が見られた。

(3) ヒト心筋リモデリングにおける HcII の影響に関する検討

ヒトの血漿 HcII 活性および心エコーによる左房・左室リモデリングを多変量解析にて、その相関について検証した。その結果、血漿 HcII 活性と求心性リモデリング変化、左房容積、左室拡張能低下指標 (E/Ea 比) との独立した負の相関を認めた (図 2)。

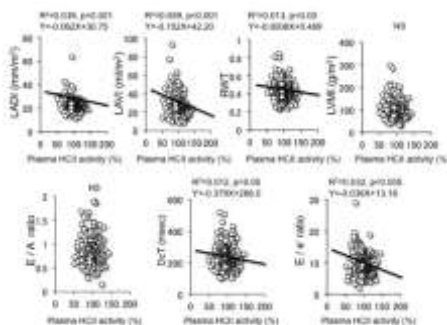


図 2. 血漿 HcII 活性と心エコー指標との相関

## II. インスリン抵抗性発症における組織ト

### ロンピン作用とヘパリンコファクター II

#### (1) 抗トロンピン剤投与によるインスリン抵抗性改善効果の検討

8週齢の野生型マウスおよび2型糖尿病モデルである *db/db* マウスに浸透圧ポンプを用いてプラセボおよび抗トロンピン剤であるアルガトロバン 0.3mg/g/day を4週間持続投与した。一晚絶食後に、インスリン負荷試験の結果、アルガトロバン投与群で有意にインスリン抵抗性の改善が見られた (図 3)。一方、HcII 欠損マウスについては、高脂肪食負荷後の耐糖能は悪化の傾向をみたが、有意で無かった。

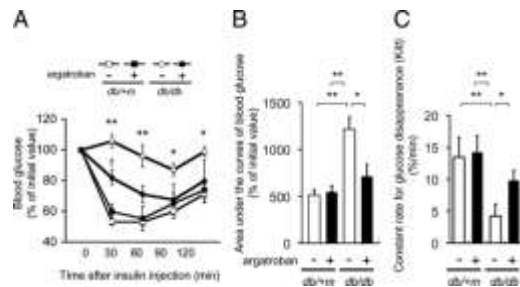


図 3. *db/db* マウスにおけるアルガトロバンの効果

#### (2) 免疫組織化学的検討

増大していた *db/db* マウスマウスの脂肪細胞サイズはアルガトロバンの投与で減少し、の解析や免疫組織化学的検討にてマクロファージの浸潤程度も抑制された。

#### (3) インスリン抵抗性関連遺伝子および蛋白発現量の検討

*db/db* マウスの脂肪組織ではアルガトロバンにて FVII, MCP-1, IL-6 の抑制とアディポネクチンの増加、IRS-1 や Akt のリン酸化の回復が見られた。以上からインスリン抵抗性の改善にはトロンピン作用の抑制が必要であることが明らかになった。

### 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 5 件)

1: Aihara K, Ikeda Y, Yagi S, Akaike M, Matsumoto T. Transforming growth factor- $\beta$  1 as a common target molecule for development of cardiovascular diseases, renal insufficiency and metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* 査読有. 2011:175381. DOI: 10.4061/2011/175381

2: Ise T, Aihara K, Sumitomo-Ueda Y, Yoshida S, Ikeda Y, Yagi S, Iwase T, Yamada H, Akaike M, Sata M, Matsumoto T. Plasma heparin cofactor II activity is inversely associated with left atrial volume and diastolic dysfunction in humans with cardiovascular risk factors. 査読有. *Hypertens Res.* 34. 2011:225-31. DOI:10.1038/hr.2010.211

3: Sumitomo-Ueda Y, Aihara K, Ise T, Yoshida S, Ikeda Y, Uemoto R, Yagi S, Iwase T, Ishikawa K, Hirata Y, Akaike M, Sata M, Kato S, Matsumoto T. Heparin cofactor II protects against angiotensin II-induced cardiac remodeling via attenuation of oxidative stress in mice. Hypertension. 査読有.;56:2010:430-6.  
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.152207

4: Mihara M, Aihara K, Ikeda Y, Yoshida S, Kinouchi M, Kurahashi K, Fujinaka Y, Akaike M, Matsumoto T. Inhibition of thrombin action ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. Endocrinology. 査読有.  
151:2010:513-9. DOI:10.1210/en.2009-0661

5: Aihara K, Azuma H, Akaike M, Sata M, Matsumoto T. Heparin cofactor II as a novel vascular protective factor against atherosclerosis. J Atheroscler Thromb. 査読有. 16:2009:523-31.  
<http://dx.doi.org/10.5551/jat.1552>

[学会発表] (計 5 件)

1: 栗飯原賢一、ヘパリンコファクターIIは耐糖能制御因子である、第85回日本内分泌学会学術総会、2012.4.19、名古屋国際会議場(名古屋市)

2. Ken-ichi Aihara, Heparin cofactor II, a serine protease inhibitor, is a novel regulating factor for glucose metabolism and albuminuria. Keystone Symposia Complications of Diabetes: Mechanisms of Injury and Failure of Repair. 2012.3.14. Boston Park Plaza & Towers, Boston, Massachusetts, USA

3: Yuka Sumitomo-Ueda, Ken-ichi Aihara, Heparin cofactor II is a novel anticardiac remodeling factor against angiotensin II excess, 17th International Society for Heart Research, 2010.3.14. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan

4: 栗飯原賢一、尿中アルブミンは内臓脂肪蓄積の強力な増悪因子である、第82回日本内分泌学会学術総会、2009.4月23日、群馬県民会館、前橋商工会議所(前橋市)

5: 栗飯原賢一、内臓脂肪増大因子に関する臨床的検討、第106回日本内科学会総会・講演会 2009.4.11、東京国際フォーラム(東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗飯原 賢一 (AIHARA KEN-ICHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師  
研究者番号：70372711

### (2) 研究分担者

赤池 雅史 (AKAIKE MASASHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：90271080  
岩瀬 俊 (IWASE TAKASHI)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：10403718  
遠藤 逸朗 (ENDOU ITSUROU)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：10432759  
藤中 雄一 (HUJINAKA YUICHI)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：30432751  
(H21, H22 研究分担者)