

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08101

研究課題名(和文)新規抗炎症性アディポカインによる心臓病、腎臓病制御機構の解明

研究課題名(英文)Role of a novel anti-inflammatory adipokine in heart and kidney diseases

研究代表者

大橋 浩二(Ohashi, Koji)

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：10595515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞モデルを用いた検討では、アディポリン欠損マウスは野生型マウスと比較して心機能の増悪を認めた。5/6腎摘モデルを用いた検討では、アディポリン欠損マウスで血中UN、尿中アルブミン排泄が増加し、組織学的にも間質繊維化面積の増加を認め、野生型マウスと比較して腎機能の増悪を認めた。アディポリンによる腎保護作用のメカニズムとしては、PPAR を介したケトン体産生増加により、腎組織における内因性炎症、インフラマソームを抑制することで、腎保護作用を発揮することを明らかにした。これらの成果は、PLOS One誌(2020)とiScience誌(2023)に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満はメタボリックシンドローム、心血管病、慢性腎臓病の重要な発症基盤である。近年、分泌因子による臓器間ネットワークが注目されており、肥満状態では、脂肪組織の慢性炎症がアディポカインの調節障害を引き起こし、肥満関連疾患の病態を促進することが明らかになってきている。本研究では、申請者等が同定した、肥満の病態でその発現が低下する新規アディポカイン、アディポリンの心筋梗塞後の心筋リモデリング、慢性腎臓病に対する作用について明らかにすることにより、肥満における心臓病、慢性腎臓病のメカニズム解明と、包括的な治療法の開発に繋がる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Adipolin knockout (APL-KO) mice exhibited exacerbated cardiac function evaluated by echocardiography at 4 weeks after myocardial infarction compared with wild type (WT) mice. Adipolin protects against cardiac injury after myocardial infarction by reducing inflammation and apoptosis of cardiomyocytes through PI3/Akt dependent mechanism. In addition, APL-KO mice showed increased blood urea nitrogen and urinary albumin excretion at 8 weeks after 5/6 nephrectomy compared with WT mice. Adipolin exerts renal protective functions by reducing internal inflammation, inflammasome, through PPAR /HMGS2/ketone body dependent mechanism. These findings have been reported in PLOS One (2020) and iScience (2023).

研究分野：循環器内科

キーワード：アディポリン 虚血性心疾患 慢性腎臓病 臓器間ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患と虚血性心疾患に代表される心血管病は、罹患率、死亡率ともに高く、その病態解明及び治療法の確立は重要である。また慢性腎臓病(CKD)は高齢者人口の急激な増加により、現在では日本の人口の1/8が罹患するに至っており、高率に透析導入に至り患者の予後やQOLを著しく損なうため、心血管病に加えて、急務の課題である。近年、これらの疾患の病態制御に慢性炎症が関わることが分かってきており、さらに全身の慢性炎症の制御に、液性・神経性因子を介した臓器間ネットワークが関わることが注目されている。

近年、脂肪組織から分泌されるアディポカインが近傍や遠隔臓器に直接的に作用することにより、肥満を基盤とした代謝病や心血管病に関与することが明らかとなってきた。申請者等は、肥満によって制御される新規アディポカインの同定と機能解析を目的として、脂肪組織の遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に解析し、肥満状態で発現が低下する、C1q/TNF-related protein(CTRP)12に着目した。この分子が、脂肪組織の慢性炎症を抑制することで、インスリン感受性を高めることを明らかにし、アディポリン(Adipolin: adipose-derived insulin-sensitizing factor)と命名した(Enomoto, Ohashi et al. *J Biol Chem.* 2011)。アディポリンは抗炎症作用を有することより、慢性炎症の関与が知られている心筋梗塞後の心筋リモデリングや慢性腎臓病の病態を制御する可能性があり、その詳細なメカニズムの解明も含め明らかにする。

2. 研究の目的

抗炎症作用を有する新規アディポカイン、アディポリンによる臓器間クロストークが肥満関連疾患の病態において重要であると考え、アディポリンの心臓病と腎臓病に対する作用と、その詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究において、アディポリンの心臓病、慢性腎臓病に及ぼす影響を基礎医学的に解析することにより、肥満と密接に関連する心臓病、慢性腎臓病の病態生理を解明し、さらにはアディポリンやそのシグナルを分子標的とした新たな治療応用へと展開していくことが期待される。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウス作製:全身アディポリン欠損(APL-KO)マウスは常法により作製済みである。

心筋梗塞モデルの作製: APL-KOマウス、野生型(WT)マウスを用いる。

冠動脈左前下行枝を恒久的に結紮することにより、心筋梗塞(MI)モデルを作製する。継時的に心エコーで心機能を評価する。心筋障害・心筋リモデリングの評価として、アポトーシス(TUNEL染色)、線維化(Masson-trichrome染色)、炎症性変化と酸化ストレス反応を解析する。また血中のサイトカイン濃度や糖代謝のパラメーターを測定する。またWTマウスにおいて、MI手術後7日目に右頸動脈から APL を発現するアデノウイルス(Ad-APL)を投与し、全身の血中 APL を上昇させ、治療効果についても解析する。

5/6腎摘モデルの作製: APL-KOマウスとWTマウスを用いる。

左腎上下極を1/3ずつ切除し、1週間後に右側腎臓を全摘する。術後8週目に解剖し解析に用いる。解剖前に随時尿を採取し、Albumin(Alb)濃度を測定する。血中BUN, Creatinine(Cr)濃度を測定する。遺残腎はパラフィン切片を作製後、Hematoxylin eosin(H-E)染色を施行し、メサンギウム細胞増殖を反映する糸球体面積と有核細胞数を解析する。線維化はMasson-Trichrome染色を施行する。遺残腎からmRNAを採取し、インフラマソーム関連蛋白(NLRP3, Caspase1, IL1等)、炎症性サイトカイン(TNF, IL6等)、線維化マーカー(Collagen I, Collagen III等)、酸化ストレスマーカー(NADPH オキシダーゼの構成成分)の発現レベルを定量的PCR法にて解析する。またWTマウスにおいて、5/6腎摘手術4週目に右頸動脈から APL を発現するアデノウイルス(Ad-APL)を投与し、全身の血中 APL を上昇させ、治療効果についても解析する。

リコンビナント蛋白作製: HEK293F細胞にアディポリンのcDNAを高発現した安定細胞株を、無血清培地で培養し、培養液中に分泌されたアディポリン蛋白をアフィニティーカラムを用いて精製する。

アディポリンの培養細胞の表現型に対する作用とシグナル伝達機構の解明

(1) 培養心筋細胞(ラット新生仔心筋細胞)において、アディポリン蛋白の前投与後に16時間の低酸素刺激を行い、心筋細胞アポトーシスをTUNEL染色にて評価する。

(2) 培養近位尿管細胞(HK2細胞)を用いて、アンジオテンシン(Ang)II誘導性の炎症性応答とインフラマソーム活性化に対するアディポリン蛋白の作用を定量的PCR法にて評価する(TNF, IL6等)。定量的PCR法にて、インフラマソーム関連蛋白(NLRP3, Caspase1, IL1等)の発現を解析する。

(3) 各培養細胞において、アディポリンのシグナル伝達系物質(AMPK, Akt, P38, SMAD2/3, JAK/STAT等)への直接作用をリン酸化抗体等を用いたウエスタンブロット法により評価する。培養細胞の表現型に関与するシグナル経路の解析には、siRNAや阻害剤、あるいはdominant-negative変異体を用いて検討する。

マウスモデルにおけるインフラマソーム関連蛋白の関与の検討

APL-KO マウスと WT マウスにインフラマソーム阻害剤(MCC950)を osmotic mini pump にて持続投与し(5mg/kg/day)、アディポリンの心筋梗塞後と心臓圧負荷モデル後の心筋リモデリング抑制と、5/6 腎摘モデルにおける腎障害抑制にインフラマソーム関連蛋白が関与するか検討する。

4. 研究成果

心筋梗塞モデル: アディポリン欠損(APL-KO)マウスと野生型(WT)マウスに対して心筋梗塞(MI)モデルを作製した。MI モデル作製後の APL-KO マウスは、WT マウスと比較して心重量/体重比と肺重量/体重比が有意に増加していた。また、心エコーでは、APL-KO マウスは WT マウスと比較して左室腔が拡大し、収縮能が低下しており、鬱血性心不全の増悪が示唆された。組織学的検討では、MI 部位遠位部における TUNEL 陽性アポトーシス心筋細胞数は APL-KO マウスにおいて WT マウスと比較して有意に高値であった。また、MI モデル作製後の心臓組織での遺伝子発現を定量的 PCR 法により評価したところ、APL-KO マウスは炎症性サイトカイン(TNF , IL6)の発現が増加していた。ラット新生仔心筋細胞を用いた *in vitro* の検討において、LPS 添加による、炎症メディエーター(TNF , IL6)の増加は、アディポリン蛋白前投与により有意に抑制された。16 時間低酸素負荷により、TUNEL 陽性のアポトーシスを起こした培養心筋細胞数は、アディポリン蛋白の前投与により、有意に減少した。

シグナルに関しては、培養心筋細胞に APL 蛋白を投与することにより、Akt リン酸化(Ser-473)が上昇しており、PI3 キナーゼ/Akt シグナル阻害剤である、LY294002 投与により、培養心筋細胞におけるアディポリンの抗アポトーシス作用と抗炎症作用ともキャンセルされたことより、アディポリンは Akt シグナルを介して、MI 後の病的な心筋リモデリングを抑制することが示された。

最後にアディポリンを発現するアデノウイルス(Ad-APL)投与により、MI 後の心機能低下、心筋細胞アポトーシス、炎症メディエーター(TNF , IL6)の増加は、コントロール群と比較して有意に低下しており、MI 後の心筋リモデリングをアディポリンは心筋細胞のアポトーシスと炎症性応答を Akt シグナルを介して抑制することで、保護的に作用することを見出し、PLOS ONE 誌(2020)に報告した。

慢性腎臓病モデル: APL-KO マウスと WT マウスに、慢性腎臓病のモデルである 5/6 腎摘手術を行い、8 週後に採尿、採血した後に解剖した。APL-KO マウスは WT マウスと比較して尿中アルブミン量が増加しており、遺残腎において、炎症性サイトカイン(TNF , IL6 etc.)、インフラマソームの構成因子(NLRP3, IL1 etc.)、酸化ストレスマーカー(NADPH オキシダーゼ構成因子: gp91 phox, p47 phox etc.)の発現が著明に上昇していた。

WT マウスに 5/6 腎摘手術後 4 週目に Ad-APL を頸静脈から投与し血中アディポリン濃度を上昇させることにより、尿中アルブミン排泄、血中 UN、遺残腎における間質繊維化、インフラマソームの構成因子(NLRP3, IL1 etc.)、酸化ストレスマーカー(NADPH オキシダーゼ構成因子: gp91 phox, p47 phox etc.)の発現が低下した。さらにインフラマソーム阻害剤である MCC950 を浸透圧ミニポンプにて持続注入することにより、APL-KO マウスで上昇する、尿中アルブミン排泄、血中 UN 濃度、遺残腎における間質繊維化、インフラマソームの構成因子(NLRP3, IL1 etc.)、酸化ストレスマーカー(NADPH オキシダーゼ構成因子: gp91 phox, p47 phox etc.)の発現が全て WT マウスレベルまで低下することより、アディポリンの腎保護作用はインフラマソーム抑制を介することが示された。

培養近位尿細管細胞(HK-2)を用いた *in vitro* の検討では、アディポリン蛋白の前投与により、アンジオテンシン II 蛋白負荷誘導性のインフラマソーム構成因子(NLRP3, IL1 etc.)、酸化ストレスマーカー(NADPH オキシダーゼ構成因子: gp91 phox, p47 phox etc.)の発現上昇を有意に抑制した。

APL がインフラマソームを抑制するメカニズムに関しては、PPAR を介してケトン体産生酵素である HMGCS2 を転写レベルで発現上昇することによりケトン体産生を促進し、ヒドロキシ酪酸が上昇することにより、インフラマソームを抑制することを明らかにし、iScience 誌(2023)に報告した。

これらの結果より、アディポリンは、慢性炎症が関与すると考えられる心筋梗塞後の心筋リモデリングや慢性腎臓病にも防御的に作用することが示唆され、さらに 5/6 腎摘モデルの結果から、インフラマソーム活性化を制御することにより病態を抑制する可能性が示された。アディポリンの様々な抗炎症作用から考慮すると、心筋梗塞後の心筋リモデリングや慢性腎臓病に加え、慢性心不全の病態を含め、慢性炎症の関与が知られている他の様々な肥満関連疾患の病態を制御する可能性をも秘めており、今後アディポリンの様々な病態への作用と、受容体を含めた詳細なメカニズムを明らかにすることにより、肥満状態で引き起こされる慢性炎症を基盤とした疾患の根本的な治療ターゲットになることが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Fang Lixin, Ohashi Koji, Hayakawa Satoko, Ogawa Hayato, Otaka Naoya, Kawanishi Hiroshi, Takikawa Tomonobu, Ozaki Yuta, Takahara Kunihiro, Tatsumi Minako, Takefuji Mikito, Shimizu Yuuki, Bando Yasuko K., Fujishima Yuya, Maeda Norikazu, Shimomura Iichiro, Murohara Toyoaki, Ouchi Noriyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Adipolin protects against renal injury via PPAR α -dependent reduction of inflammasome activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106591 ~ 106591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki Yuta, Ohashi Koji, Otaka Naoya, Kawanishi Hiroshi, Takikawa Tomonobu, Fang Lixin, Takahara Kunihiro, Tatsumi Minako, Ishihama Sohta, Takefuji Mikito, Kato Katsuhiko, Shimizu Yuuki, Bando Yasuko K., Inoue Aiko, Kuzuya Masafumi, Miura Shinji, Murohara Toyoaki, Ouchi Noriyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Myonectin protects against skeletal muscle dysfunction in male mice through activation of AMPK/PGC1 α pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-40435-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masanori Ito, Rei Shibata, Koji Ohashi, Naoya Otaka, Shukuro Yamaguchi, Hayato Ogawa, Takashi Enomoto, Tomohiro Masutomi, Toyoaki Murohara, Noriyuki Ouchi	4. 巻 18
2. 論文標題 Omentin Modulates Chronic Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-22-0079.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fang L, Ohashi K, Otaka N, Ogawa H, Hiramatsu-Ito M, Kawanishi H, Bando YK, Shibata R, Shimizu Y, Kato K, Takikawa T, Ozaki Y, Takefuji M, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 118
2. 論文標題 Omentin attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 1597-1610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvab179.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fang L, Ohashi K, Ogawa H, Otaka N, Kawanishi H, Takikawa T, Ozaki Y, Takahara K, Tatsumi M, Takefuji M, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Factor Xa inhibitor, edoxaban ameliorates renal injury after subtotal nephrectomy by reducing epithelial-mesenchymal transition and inflammatory response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15218.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki Y, Ohashi K, Otaka N, Ogawa H, Kawanishi H, Takikawa T, Fang L, Tatsumi M, Takefuji M, Enomoto T, Darwish M, Iijima Y, Iijima T, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 593
2. 論文標題 Neuron-derived neurotrophic factor protects against dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 4-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 尾崎裕太、大橋浩二、室原豊明、大内乗有
2. 発表標題 内分泌因子「マイオネクチン」を標的とした骨格筋機能異常の病態解明
3. 学会等名 第26回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、若手研究奨励賞(YIA)受賞 (尾崎)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Ozaki, Koji Ohashi, Toyoaki Murohara, Noriyuki Ouchi
2. 発表標題 Role of the endocrine factor "myonectin" in maintaining skeletal muscle function
3. 学会等名 BCVR 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kunihiko Takahara, Koji Ohashi, Yuta Ozaki, Toyoaki Murohara, Noriyuki Ouchi
2. 発表標題 A novel selective PPAR modulator, pemafibrate ameliorates endothelial cell injury and renal damage
3. 学会等名 ICoLA 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大内 乗有 (Ouchi Noriyuki) (00595514)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	
研究分担者	室原 豊明 (Murohara Toyoaki) (90299503)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------