

## 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 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590349

研究課題名（和文） 血管平滑筋細胞の動脈硬化性形質転換におけるトリグリセリド代謝の意義

研究課題名（英文） Significance of triglyceride metabolism in human vascular smooth muscle cell phenotype

研究代表者

松本 裕文（MATSUMOTO HIROFUMI）

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90532408

研究成果の概要（和文）：血管平滑筋細胞（VSMC）にもトリグリセリド（TG）をエネルギー源として利用する系が存在し、それに adipose triglyceride lipase（ATGL）が関与していると考えられる。VSMC の ATGL を介する TG 代謝は炎症性形質の発現とも関連しており、さらに ATGL の発現と  $\beta$  酸化の調和がこれに関与している可能性がある。本培養モデルは粥状動脈硬化新生内膜病変における炎症性機序の解明や中性脂質代謝異常と血管病変形成との関連を論じる上で有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：VSMC could use TG mediated ATGL as an cellular energy. TG load in VSMC provided TG accumulation and enhanced TG metabolism and associated with inflammatory phenotype. In addition, coordination of ATGL expression level and beta-oxidation level was probably responsible for inflammatory phenotype. We believe that this culture model is useful in resolution of inflammatory mechanism in neointima and relationship between TG metabolism and atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：血管平滑筋細胞、トリグリセリド、脂質代謝、ATGL

### 1. 研究開始当初の背景

近年、高脂肪食・運動不足の生活習慣により、いわゆるメタボリックシンドロームを有する者が増加している。メタボリックシンドロームは余剰脂質が脂肪組織のみならず非脂肪組織中にも中性脂肪（TG）として蓄積し、細胞機能の障害やインスリン抵抗性をもたらす。動脈壁にも TG が相当量存在することは知られているが、動脈壁局所の TG 代謝や平滑筋細胞の機能発現や病的状態における TG の動態については、コレステロールと比し

てもほとんど研究対象とされてこなかった。このような状況において、平野らが新規疾患として報告した中性脂肪蓄積心筋血管症は中性脂肪分解の律速酵素 adipose triglyceride lipase（ATGL）の遺伝的欠損により冠状動脈・心臓に中性脂肪の蓄積を来し、その結果、重症心不全や虚血性心疾患を呈するものであり、ATGL を介した中性脂肪代謝が血管壁細胞の機能に重要な役割を果たしている事を予感させる。

## 2. 研究の目的

動脈硬化の形成にあずかる血管平滑筋細胞における形質転換と TG 代謝との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養条件：

オレイン酸 500 - 1000  $\mu$ M 条件下で 16 時間培養し、ヒト培養血管平滑筋細胞内に脂肪滴を形成させる。その後、増殖培地で培養し、それぞれの実験に用いる検体を培地交換直後 (0 時間) と培地交換後 24 時間を中心に採取した。

### (2) 細胞内 TG の定量：

中性脂肪測定キットを用いて細胞内 TG を定量した。

### (3) ATGL タンパクの局在：

免疫蛍光染色と Nile red 染色にてそれぞれ ATGL と脂肪滴の局在を同定した。

### (4) TG 代謝、炎症性形質の評価：

ATGL と  $\beta$  酸化関連酵素 CPT1B、PDK4 を TG 代謝の指標とし、VCAM-1、MCP-1 を炎症性形質の指標としてそれぞれリアルタイム PCR とウェスタンブロットにて検討した。

### (5) ATGL 遺伝子導入：

テトラサイクリン発現誘導システムを組み合わせたアデノウイルスベクターを作製した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内 TG 含量：

細胞内脂肪滴形成後 48 時間までに細胞内 TG 含量が有意に漸減した。特に、24 時間後では、対照に比して約 30% 減少した (図 1)。

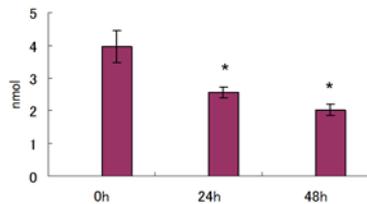


図 1. 細胞内 TG 含量

### (2) ATGL タンパクの局在：

ATGL タンパクは細胞質内にびまん性に細顆粒状に分布し、細胞内 TG 存在下では、脂肪滴に一致した局在も認められた (図 2)。

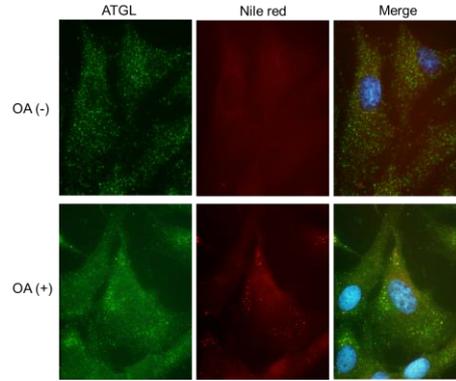


図 2. 免疫蛍光染色 green:ATGL, red:TG

### (3) ATGL 発現の変化：

オレイン酸添加群と非添加群との間に、mRNA レベルでは 0 時間、24 時間後いずれも有意差は認められなかった。一方、タンパクレベルでは、0 時間から 24 時間後にかけて発現がほぼ一定に増大していた (図 3)。

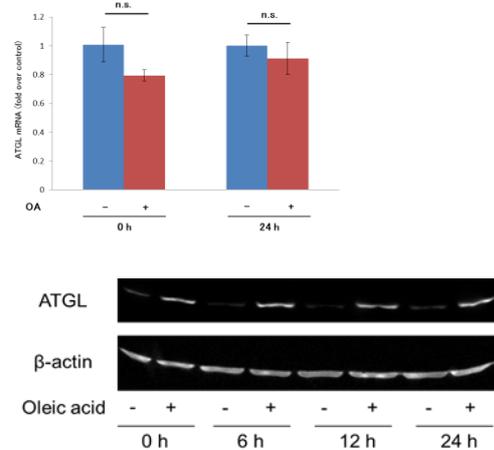
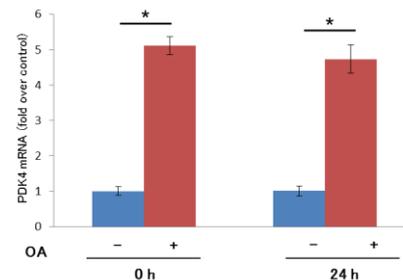


図 3. ATGL リアルタイム PCR とウェスタンブロット

### (4) $\beta$ 酸化関連遺伝子：

0 時間、24 時間いずれの時点でも PDK4 および CPT1B の発現はオレイン酸添加群で有意に増大した (図 4)。



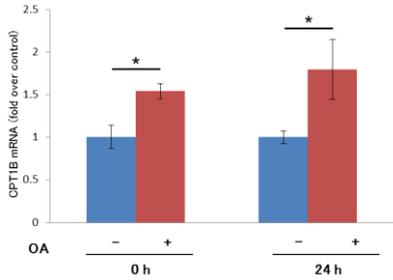


図 4. PDK4、CPT1B リアルタイム PCR

(5) 炎症性形質の発現：

VCAM-1 について、mRNA レベルではオレイン酸添加群と非添加群との間に、0 時間後に有意差がなく、24 時間後ではオレイン酸添加群の方が有意に減少した。一方、タンパクレベルでは、0 時間後に VCAM-1 タンパクの発現増大が認められ、時間経過とともにその発現量は漸減した (図 5)。

また、MCP-1 の mRNA レベルは 24 時間後にオレイン酸添加群の方が軽度増大した (図 6)。

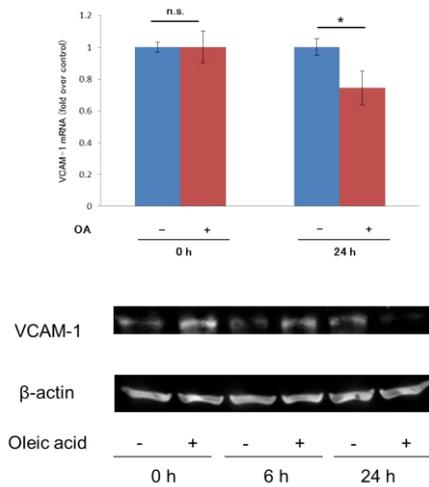


図 5. VCAM-1 リアルタイム PCR と ウェスタンブロット

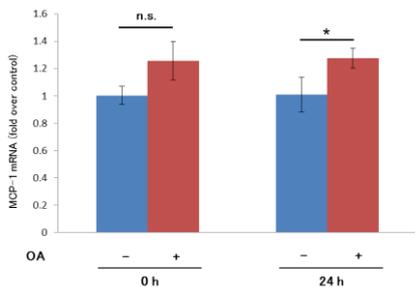


図 6. MCP-1 リアルタイム PCR

(6) ATGL 発現レベル介入：

ATGL を介した TG 代謝と炎症性形質転換との関係を解明するために、テトラサイクリン発現誘導システムを組み合わせたアデノウイルスベクターを作製した。このベクターを 200~500 MOI の条件下で血管平滑筋細胞にトランスフェクションさせ、発現誘導群 (テトラサイクリン 500 ng/ml) と非誘導群とを比較した。

①細胞内 TG 含量：

非誘導群に比して誘導群では、24 時間後に軽度に TG 含量が減少した (図 7)。

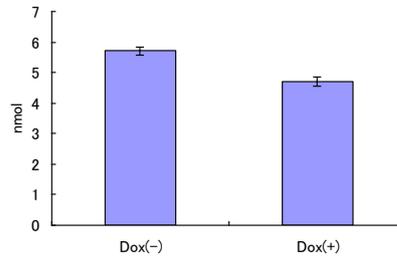


図 7. 細胞内 TG 含量 (AdvATGL Dox+/-)

②β酸化関連遺伝子：

0 時間後の PDK4 発現を除いて、非誘導群と誘導群との間に PDK4 および CPT1B の発現に有意差はなかった (図 8)。

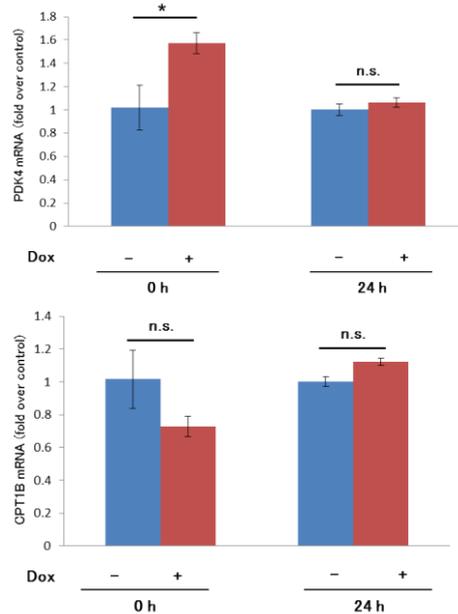


図 8. PDK4、CPT1B リアルタイム PCR (AdvATGL Dox+/-)

③炎症性形質の発現：

VCAM-1、MCP-1 いずれも 0 時間および 24 時間後で発現の増大を認めた (図 9, 10)。

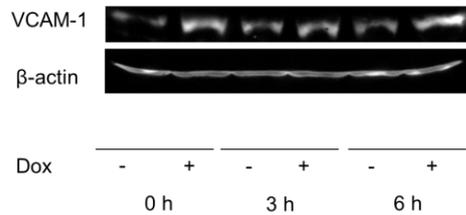
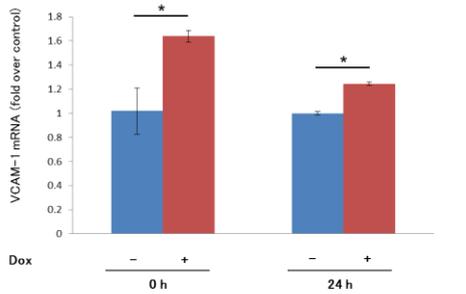


図9. VCAM-1リアルタイムPCRとウェスタンブロット (AdvATGL Dox+/-)

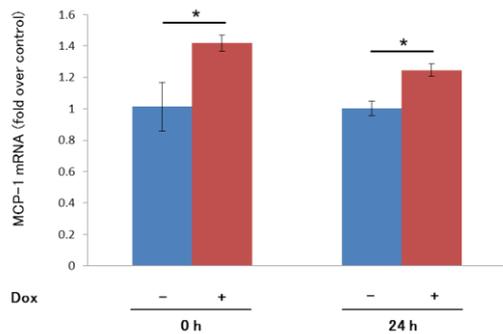


図10. MCP-1リアルタイムPCR (AdvATGL Dox+/-)

以上から血管平滑筋細胞にも TG をエネルギー源として利用する系が存在し、それに ATGL が関与していると考えられる。血管平滑筋細胞の ATGL を介する TG 代謝は炎症性形質の発現とも関連しており、さらに ATGL と  $\beta$  酸化の調和がこれに関与している可能性がある。本培養モデルは粥状動脈硬化新生内膜病変における炎症性機序の解明や中性脂質代謝異常と血管病変形成との関連を論じる上で有用と考えられる。

#### 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 1 件)

- ① Lin Y, Chiba S, Suzuki A, Yamaguchi S,

Nakanishi T, Matsumoto H, Ikeda Y, Ishibashi-Ueda H, Hirano K, Kato S, Vascular smooth muscle cells isolated from adipose triglyceride lipase-deficient mice exhibit distinct phenotype and phenotypic plasticity, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読あり, 434(3), 2013, 534-40

[学会発表] (計 5 件)

① Yanhui Lin, Shunmei Chiba, Ken-ichi Hirano, Akira Suzuki, Satoshi Yamaguchi, Takaya Nakanishi, Hirofumi Matsumoto, Seiya Kato, Ectopic gene transfer successfully corrects vascular smooth muscle phenotypes of adipose tissue triglyceride lipase deficient mouse, American Heart Association Scientific Sessions, 2012年11月4日, Los Angeles, USA

② 松本裕文, 仲西貴也, 千葉俊明, Yanhui Lin, 又吉宣, 平野賢一, 加藤誠也, オレイン酸添加血管平滑筋培養細胞の飢餓刺激による中性脂肪代謝と細胞形質との関連, 第101回日本病理学会総会, 2012年4月28日, 東京都新宿区

③ Takaya Nakanishi, Hirofumi Matsumoto, Yoshihiko Ikeda, Hatsue Ueda, Kenichi Hirano, Seiya Kato, Relationship between lipid deposition and ATGL expression in human myocardial tissue: A study with autopsy cases, 第1回中性脂肪蓄積心筋血管症国際シンポジウム, 2011年11月26日, 京都

④ 仲西貴也, 松本裕文, 千葉俊明, 池田善彦, 植田初江, 平野賢一, 加藤誠也, 剖検症例における中性脂肪蓄積心筋血管症の検索と培養心筋細胞における ATGL の機能解析, 第100回日本病理学会総会, 2011年4月30日, 神奈川県横浜市

⑤ 加藤誠也, Lin Yanhui, 松本裕文, 新垣和也, 又吉宣, 仲西貴也, 千葉俊明, 荒川文子, 大島孝一, 洲鎌和茂, 血管平滑筋細胞の古典的形質転換と炎症性形質転換, 第100回日本病理学会総会, 2011年4月30日, 神奈川県横浜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 裕文 (MATSUMOTO HIROFUMI)  
琉球大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90532408

### (2) 研究分担者

加藤 誠也 (KATO SEIYA)  
琉球大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：60268844

### (3) 連携研究者

なし