

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591314

研究課題名(和文) 異所性脂肪の心臓血管病発症における病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Role of ectopic fat in the mechanism of cardiovascular diseases

研究代表者

島袋 充生 (SHIMABUKURO, Michio)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・特任教授

研究者番号：60271144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1)腹部脂肪、肝臓、骨格筋、心臓周囲脂肪および筋量を非侵襲的に測定し、異所性脂肪分布様式を検証した。玄米食介入で減量および血管内皮機能改善効果を確認した。(2)飽和脂肪酸処理されたヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)でプロテオーム・トランスクリプトーム解析をおこない、発現変動の顕著な産物Xを同定した。分子X siRNAを過剰発現したHUVECでは、飽和脂肪酸による細胞死が、カスパーゼ3,7切断を阻害することで抑制された。(3)心臓手術症例で、心臓脂肪発現シグナルと全身および心臓脂肪分布との関係を検証した。心臓バイパス手術症例は、心臓周囲脂肪量が増加して炎症性シグナルが増加していた。

研究成果の概要(英文)：1. Fat contents in the abdomen, liver, skeletal muscle and epicardium were measured; 2. Expression of molecules in the endothelium was quantified by 2D SDS-PAGE and RT-PCR. Activation of caspase-3/7 was observed ~12 hours after treated with palmitate 200 micromol/L, and the activation was reduced by a knockdown of molecule X; 3. Epicardial adipose tissue volume (EATV), cytokine/adipocytokine profiles in epicardial adipose tissue were strongly associated in human samples.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：遊離脂肪酸 内臓肥満症 異所性脂肪 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで内臓脂肪蓄積からインスリン抵抗性、血管内皮障害、心血管イベントの合併にいたる“メタボリックシンドロームのナチュラルコース”の解明を目指してきた。その過程で、異所性脂肪が内臓脂肪由来活性物質と協調しながらも特異な動態を示し、心臓血管病発症に重要な役割を果たすという新規コンセプトを着想した。

## 2. 研究の目的

第一に内臓脂肪および異所性脂肪由来の生理活性物質がメタボリックシンドロームの病態でどのような役割を果たすか、第二に内臓脂肪および異所性脂肪由来の生理活性物質が心臓血管病発症の病態にどう関わるか、を臨床疫学、臨床研究、生理生化学、分子生物学的手法を用いて統合的に明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 臨床疫学的研究：プロトコール1：異所性脂肪分布様式と代謝マーカー、脂肪細胞由来生理活性物質の関係を明らかにする。プロトコール2：全身脂肪分布の測定をおこなう。異所性脂肪の測定は、腹部脂肪、肝臓、骨格筋、心臓周囲脂肪にフォーカスして実施。MRI (またはCT)を用いて心筋細胞内、冠動脈周囲、心臓外膜、近位大動脈および大動脈弁の異所性脂肪の測定をおこなう。プロトコール3：脂肪分布様式と生活習慣病・心臓血管病発症の関係を前向きコホートで調べる。異所性脂肪を有する対象者に治療介入をおこない、生活習慣病の新規発症および心血管イベント発症に及ぼす影響を観察する。

(2) 実験的臨床研究：プロトコール1：異所性脂肪蓄積を有する症例および性、年齢をマッチさせた健常者で、血管機能、心臓機能、インスリン感受性(M値)を測定し、遊離脂肪酸、アディポネクチン濃度、脂肪由来生理活性物質との相関を検討する。プロトコール2：心臓血管病症例で、各種マーカーと全身および心臓脂肪分布との関係を検証する。

(3) 遺伝子改変モデルおよび高脂肪食負荷モデル

肥満モデル(高脂肪食負荷マウス、db/db 遺伝的肥満マウス、アディポネクチンKOマウス、脂肪細胞特異的 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 過剰発現マウス)を用いて、異所性脂肪の分布様式と心臓血管システムとの関連を明らかにする。

(4) モデル動物およびヒト組織のマイクロRNAおよびプロテオミクス解析

モデル動物の血管・心筋組織のマイクロRNAおよびプロテオミクス解析で各分子の発現レベルを網羅的に解析する。血管内皮培養細胞、単離心筋細胞で、内臓脂肪由来活性酸素種発現レベル、炎症、免疫マーカーをみる。

ROS 産生メカニズムについてアディポサイトカイン分子動態を中心に解明する。プロテオーム・トランスクリプトーム解析により、脂肪酸処理された培養血管内皮細胞ならびにヒトサンプルにおいて発現変動の顕著な遺伝子(産物)を同定する。

## 4. 研究成果

(1) 臨床疫学的研究:プロトコール 1:健診受診者で異所性脂肪分布様式と代謝マーカー、脂肪細胞由来生理活性物質の関係を検討した。プロトコール 2: 異所性脂肪を推定する指標を検討。腹部脂肪、肝臓、骨格筋、心臓周囲脂肪および筋量を非侵襲的に測定し、その妥当性を検討した(Intern Med 2013;52:1561-71, Diabetol Metab Syndr 2014;6:27.)。プロトコール 3:メタボリックシンドローム男性に、玄米食による 8 週間の治療介入をおこない減量および血管内皮機能改善効果を確認した(Br J Nutr 2014;111:310-20)。メカニズムとしてインスリン節減効果、玄米に含まれる機能性分子の関与が示唆された(Diabetes 2012;61:3084-93.)。(2) モデル動物およびヒト組織のマイクロRNAおよびプロテオミクス解析飽和脂肪酸処理されたヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)でプロテオーム・トランスクリプトーム解析をおこない、発現変動の顕著な産物を同定した。分子 X siRNA を過剰発現した HUVEC では、飽和脂肪酸による細胞死が、カスパーゼ 3,7 切断を阻害することで抑制された。飽和脂肪酸による細胞死のメカニズムに分子 X 誘導が重要であることが示唆された。(3) 実験的臨床研究:心臓手術症例で、心臓脂肪サンプリングを実施し、全身および心臓脂肪分布との関係を検証した。冠動脈疾患群(心臓バイパス手術症例)は、非冠動脈疾患群(弁膜症手術群)に比べ、心臓周囲脂肪量が増加しており、M1 マクロファージが著明に増加していた(ATVB 2013;33:1077-1084.)。マイクロアレイによる遺伝子発現パターンは、心臓周囲脂肪と皮下脂肪で差があった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 27 件)

1. Shimabukuro M, et al. Effects of brown rice diet on visceral obesity and endothelial function: the BRAVO study. Br J Nutr 2014;111:310-20. 査読有 DOI:10.1017/S0007114513002432

2. Matsumoto S, et al. Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, restores endothelial function by reducing vascular inflammation and by increasing the phosphorylation ratio Ser1177/Thr497 of endothelial nitric oxide synthase in diabetic mice. Cardiovasc Diabetol. 2014

- Jan 31;13:30. 查 読 有 DOI:10.1186/1475-2840-13-30
3. Yagi S, et al. Association of lower limb muscle mass and energy expenditure with visceral fat mass in healthy men. *Diabetol Metab Syndr* 2014;6:27. 查 読 有 DOI:10.1186/1758-5996-6-27
4. Natsuaki C, et al. Association of borderline ankle-brachial index with mortality and the incidence of peripheral artery disease in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2014;234:360-365. 查 読 有 DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.018
5. Shimabukuro M, et al. Miglitol, -glycosidase inhibitor, reduces visceral fat accumulation and cardiovascular risk factors in subjects with the metabolic syndrome. *Int J Cardiol* 2013;167:2108-2113. 查 読 有 DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.05.109
6. Hirata Y, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Eur J Pharmacol* 2013;699:106-111. 查 読 有 DOI:10.1016/j.ejphar.2012.11.057.
7. Hirata Y, et al. Beneficial effect of a synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301, in rat autoimmune myocarditis model. *Eur J Pharmacol* 2013;699:81-87. 查 読 有 DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.045
8. Taira S, et al. Lipid deposition in various sites of skeletal muscle and liver shows correlation with visceral fat accumulation in male patients with metabolic syndrome. *Intern Med* 2013;52:1561-71. 查 読 有 DOI:10.2169/internalmedicine.52.0521
9. Tian Z, et al. Perivascular adipose tissue-secreted angiopoietin-like protein2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury. *J Mol Cell Cardiol* 2013;57:1-12. 查 読 有 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.004
10. Shimabukuro M, et al. Defects of vascular nitric oxide bioavailability in subjects with impaired glucose tolerance: A potential link to insulin resistance. *Int J Cardiol* 2013;167:298-300. 查 読 有 DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.194.
11. Shimabukuro M, et al. Epicardial adipose tissue volume and adipocytokine imbalance are strongly linked to human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1077-1084. 查 読 有 DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300829.
12. Soeki T, et al. Ghrelin protects the heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin-43 protein. *Heart Vessels*. 2013;28:795-801. 查 読 有 DOI: 10.1007/s00380-013-0333-2.
13. Kurobe H, et al. Protective effects of selective mineralocorticoid receptor antagonist against aortic aneurysm progression in a novel murine model. *J Surg Res* 2013;185:455-462. 查 読 有 DOI: 10.1016/j.jss.2013.05.002.
14. Nakayama T, et al. Role of macrophage-derived hypoxia-inducible factor (HIF)-1 as a mediator of vascular remodeling. *Cardiovasc Res* 2013;99:705-715. 查 読 有 DOI: 10.1093/cvr/cvt146.
15. Soeki T, et al. Pentraxin 3 is a local inflammatory marker in atrial fibrillation. *Heart Vessels* 2013 in press 查 読 有 DOI:10.1007/s00380-013-0400-8
16. Hirata Y, et al. HMGB1 plays a critical role in vascular inflammation and lesion formation via toll-like receptor 9. *Atherosclerosis* 2013;231:227-233. 查 読 有 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.010.
17. Hirata Y, et al. A synthetic prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity, ONO-1301, protects myocardium from ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2012;674:352-358. 查 読 有 DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.045.
18. Watanabe Y, et al. The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes* 2012;61:1199-1209. 查 読 有 DOI: 10.2337/db11-1182.
19. Kozuka C, et al. Brown rice and its component, -oryzanol, attenuate the preference for high-fat diet by decreasing hypothalamic endoplasmic reticulum stress in mice. *Diabetes* 2012;61:3084-3093. 查 読 有 DOI: 10.2337/db11-1767.
20. Shiota A, et al, Activation of AMPK-Sirt1 pathway by telmisartan in white adipose tissue: A possible link to anti-metabolic effects. *Eur J Pharmacol* 2012;692:84-90. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.026.
21. Dagvasumberel M, et al, Sata M. Gender disparities in the association between epicardial adipose tissue volume and coronary atherosclerosis: A 3-dimensional

cardiac computed tomography imaging study in Japanese subjects. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:106. 査読有 DOI: 10.1186/1475-2840-11-106.

22. Yamakawa K, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation changes fatty acid composition and corrects endothelial dysfunction in hyperlipidemic patients. *Cardiol Res Pract* 2012;2012:754181. 査読有 DOI: 10.1155/2012/754181.

23. Shiota A, et al. Telmisartan ameliorates insulin sensitivity by activating the AMPK/SIRT1 pathway in skeletal muscle of obese db/db mice. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:139. 査読有 DOI: 10.1186/1475-2840-11-139.

24. Shimabukuro M, et al. Distinct effects of pitavastatin and atorvastatin on lipoprotein subclasses in patients of type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Med* 2011;28:856-864. 査読有 doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03240.x.

25. Shimabukuro M, et al. Impaired glucose tolerance, but not impaired fasting glucose, underlies left ventricular diastolic dysfunction. *Diabetes Care* 2011;34:686-690. 査読有 DOI: 10.2337/dc10-1141.

26. Sunagawa S, et al. Serum Levels of B-Cell Activating Factor of TNF Family (BAFF) as a Useful Indicator for the Activity of Graves' Disease. *J Endocrinol Metab* 2011;1:73-78. 査読有

27. Hirata Y, et al. A synthetic prostacycline agonist, ONO-1301, ameliorates ventricular remodeling after acute myocardial infarction via up-regulation of HGF in rat. *Biomed Aging Pathol* 2011;90-96:1 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. Ishida M, 申請者 2 番目 Post-Transcriptional Regulation of Adiponectin by Micro-RNA 378 in Human Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue. AHA Scientific Sessions 2013, Dallas Convention Center (Dallas, USA) November 16-20, 2013 一般演題

2. Nishimoto S, 申請者 3 番目 Macrophage Toll-like Receptor 9 Signaling Contributes to the Development of Insulin Resistance through the Promotion of Inflammation in Adipose Tissue. AHA Scientific Sessions 2013, Dallas Convention Center (Dallas, USA) November 16-20, 2013 一般演題

3. Hara T, 申請者 15 番目 Rivaroxaban, A

Novel Oral Anticoagulant, Attenuates Plaque Progression in ApoE-Deficient Mice Through the Inhibition of Pro-Inflammatory Activation of Macrophages AHA Scientific Sessions 2013, Dallas Convention Center (Dallas, USA) November 16-20, 2013 一般演題

4. Nakayama T, 申請者 9 番目 Macrophage-Specific Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 -Deficient Mice Suppress the Vascular Remodeling and Regulate M2 Macrophage Polarization. AHA Scientific Sessions 2013, Dallas Convention Center (Dallas, USA) November 16-20, 2013 一般演題

5. Soeki T, 申請者 9 番目 Cardiospecific microRNA plasma levels are associated with coronary plaque vulnerability. ESC Congress 2013, Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

6. Ishida M, 申請者 2 番目 MicroRNA miR-378 regulates adipocytokine fate by targeting transcriptional factors in human visceral and subcutaneous adipose tissue. ESC Congress 2013, Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

7. Ishida M, 申請者 2 番目 MicroRNA-100 regulates a cluster of adipocytokine expression: A human biopsy study in subcutaneous and visceral adipose tissue. ESC Congress 2013, Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

8. Nishimoto S, 申請者 3 番目 Genetic ablation of TLR9 improves insulin resistance through macrophage accumulation in adipose tissue. ESC Congress 2013, Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

9. Nishikawa K, 申請者 7 番目 Visceral fat mass is associated with daily physical activity, leg skeletal muscle mass and fiber intake in healthy men. ESC Congress 2013, Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

10. Soeki T, 申請者 9 番目 Electrophysiological correlation and prognostic impact of pentraxin 3 as a local inflammatory marker in atrial fibrillation. ESC Congress 2013,

Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

11. Bando S, 申請者 8 番目 Ghrelin ameliorates the progression of experimental autoimmune myocarditis. ESC Congress 2013, Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

12. Shimabukuro M, Saito T, Higa T, Nkamura K, Sata M. Gender-based risk stratification of coronary artery disease in asymptomatic diabetic subjects: a multi-clinic study using multi-detector computed tomography. ESC Congress 2013, Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

13. Bando S, 申請者 8 番目 Plasma Brain Natriuretic Peptide (BNP) level is elevated in patients with cancer. ESC Congress 2013, Amsterdam RAI Exhibition and Convention Centre (Amsterdam, Netherlands) 31 Aug- 4 Sep 2013 一般演題

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島袋 充生 (SHIMABUKURO, Michio)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・特任教授

研究者番号 60271144

### (2) 研究分担者

益崎 裕章 (MASUZAKI, Hiroaki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号 : 00291899

苅谷 研一 (KARIYA, Kenichi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号 : 40263371