

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23790846

研究課題名（和文）

心臓リモデリングにおける血管調節機構の解明

研究課題名（英文）

Mechanism of cardiac remodeling through modulation of angiogenesis.

研究代表者

大橋 浩二 (KOJI OHASHI)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：10595515

研究成果の概要（和文）：アディポネクチンの心臓リモデリング抑制作用を検討する過程で、アディポネクチンパラログである C1q/TNF-related protein (CTRP) family に着目して研究を行った。その中でもアディポネクチンとの相同性が最も高い CTRP9 が、アディポネクチン同様に脂肪組織から最も発現が多いアディポサイトカインであることを見出し、CTRP9 の投与が AMP キナーゼシグナルを介して心臓虚血再灌流モデルにおける心臓リモデリングを抑制することを報告した。

研究成果の概要（英文）：In the process of investigation for anti-cardiac remodeling-function of Adiponectin, we identified a C1q/TNF-related protein family 9 (CTRP9), which is a member of adiponectin paralogs (C1q/TNF-related protein family), as a novel adipocytokine. Administration of CTRP9 ameliorated cardiac remodeling after ischemia reperfusion injury via AMP-kinase signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：循環器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、~~7203~~循環器内科学

キーワード：血管新生、心筋リモデリング

1. 研究開始当初の背景

高血圧症は我が国において約 4000 万人が罹患している極めて頻度の高い疾患である。高血圧症は脳血管障害、虚血性心疾患を引き起こすのみならず、病的な心肥大を引き起こし最終的には代償機構の破綻により収縮不全を伴った慢性心不全を引き起こす。しかし心肥大から慢性心不全へ移行するメカニズムに関しては未だ明らかではない。以前の報告でドキシサイクリン(DOX)の投与によりスイッチが入る、心臓特異的 Akt1 トランスジェニックマウスを用いた検討で、DOX 投与後 2 週間までの早期は生理的な心肥大を呈し、6

週間 Akt1 過剰発現をオンにし続けると収縮不全を伴った慢性心不全の状態に至ることが示されている(Shiojima I et al. *J Clin Invest.* 2005)。この時 2 週目の生理的心肥大の時期では VEGF の発現が増加し心肥大に伴い毛細血管床も増加していたが、6 週目の心機能が低下している時期では毛細血管床は低下していることが確認された。さらに VEGF 受容体の阻害により 2 週間で早期に心不全に至ることより、心肥大から心不全への移行に代償的な毛細血管床増加の破綻が重要な役割を果たすことが示唆された。

アディポネクチンは脂肪組織特異的な分泌蛋白であり、動脈硬化(Ohashi K et al. *J*

Am Coll Cardiol. 2004, Okamoto Y, Ohashi K et al. *Circulation* 2002)、2 型糖尿病、高血圧(Ohashi K et al. *Hypertension* 2006)、慢性腎臓病(Ohashi K et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007)に防御的な作用を有することを我々は報告してきた。また我々は心臓の圧負荷モデル(大動脈縮搾手術(TAC))で、アディポネクチン欠損マウスは心肥大が増悪し早期に心機能障害に至ることを報告した(Shibata R, Ohashi K et al. *Nat Med.* 2004, Shimano M, Ohashi K et al. *J Moll Cell Cardiol.* 2010)。これまでの検討をふまえて今回の研究では、アディポネクチンが血管内皮細胞に直接作用し血管新生を促進することにより、心肥大から心不全への移行に対し防御的に働くという仮説をたてて研究を開始した。研究の過程で新たなアディポサイトカインの探索も行い、アディポネクチンパラログである CTRP-9 についても心臓リモデリング抑制作用を有するかを検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪細胞由来因子アディポネクチンとそのパラログである CTRP-9 の心臓リモデリングに対する作用を明らかにすることである。

3. 研究の方法

心臓リモデリングモデルの作成

- 心臓虚血再灌流モデル作成: マウス左冠動脈の結紮し、1 時間後に再灌流し、24 時間後に解剖し、心臓リモデリングを評価する。
- 心圧負荷モデル作成: マウス大動脈弓部に 26 ゲージの注射針(先端を鈍にしたもの)を置き、7-0 絹糸にて縫合し大動脈縮搾手術(TAC)を施行。
- 心臓リモデリングの評価:

心エコーによる検討: 心拍数、左室拡張末期径、収縮末期径、左室心筋壁厚、左室駆出率などを心エコーを用い、経時的に観察し比較検討を行う。

観血的心機能検査による検討: ミラーカテーテルを用いて、心拍数、動脈圧、左室収縮期圧、左室拡張末期圧などの測定を行う。

摘出心を用いた形態学的、組織学的検討: 心重量、肺重量、体重を測定。肺組織は乾燥後、ドライウエイトも測定する。摘出心は以下のように組織学的比較検討を行う。

①HE 染色、Masson-trichrome 染色標本を用いて、心筋梗塞巣の面積測定、間質、血管周囲繊維化や炎症細胞浸潤の経時的変化の比較検討を行う。

②アポトーシスへの影響を Tunel 染色にて検討する。

③心筋肥大への影響を Wheat Germ Agglutinin (WGA) 染色にて検討する。

④血管新生への影響を CD31 染色にて検討する

CTRP-9 過剰発現系の作成

心臓虚血再灌流手術、大動脈縮搾手術(TAC)の3日前に野生型(WT)マウスの右頸静脈より、コントロールアデノウイルス(Adenovirus producing β -galactosidase (Ad- β gal)もしくは、CTRP-9 のアデノウイルス(Ad-CTRP9)を 3×10^8 pfu/マウス注入する。

遺伝子改変マウス

CTRP-9 欠損マウスは Neomycin 耐性遺伝子システムを用いた全身欠損マウス凍結胚を購入し、作成する。

培養細胞によるメカニズム解明

ラット胎児培養心筋細胞にリコンビナントアディポネクチンもしくはリコンビナント CTRP-9 を添加し、Hypoxia-Reoxygenation 下での心筋細胞のアポトーシスに対する作用を検討する。またノルエピネフリン添加による心筋細胞肥大においてもリコンビナントアディポネクチンもしくはリコンビナント CTRP-9 の作用を検討する。

4. 研究成果

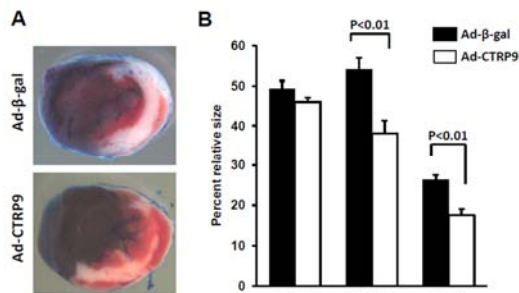
(1) CTRP-9 の発現調節

CTRP-9 の組織分布を調べたところ、以前の報告と一致して脂肪組織で最も発現が多く、アディポサイトカインであることが確認された。また肥満モデルとして、高脂肪高ショ糖食負荷マウスと、遺伝性の肥満モデルである db/db マウスでの CTRP-9 の血中濃度を Western blot で発現を見たところ、肥満モデ

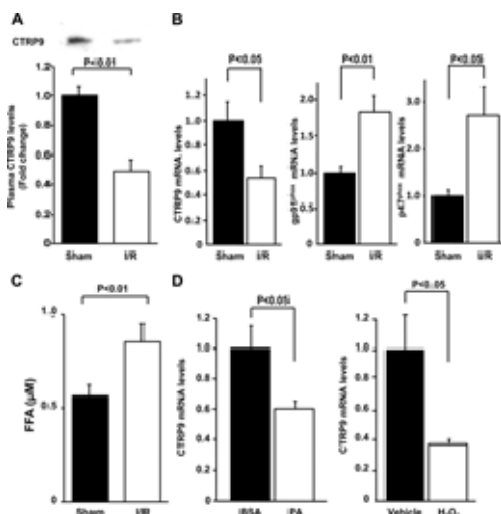
ルマウスで血中濃度が低下することが明らかとなった。

(2) CTRP-9 過剰発現による心臓リモデリング抑制作用

肥満モデルで低下する CTRP-9 の心臓リモデリングに対する作用を検討するために、マウス心臓虚血再灌流手術(I/R)3 日前にアデノウイルスにより CTRP-9 を過剰発現させ、その作用を解析した。CTRP-9 の投与は対照群と比較して有意に心筋梗塞領域を減少させた。



また I/R 手術 24 時間後の CTRP-9 血中濃度は、偽手術(Sham)群と比較して有意に低下していた。これに伴い脂肪組織での CTRP-9 mRNA レベルも低下しており、一方で酸化ストレスマーカー(gp91^{phox}, p47^{phox})の発現レベルは上昇し、血中の遊離脂肪酸(FFA)も上昇していた。このことより I/R 手術侵襲により、脂肪組織でのリポリシスが生じ、FFA が上昇することにより酸化ストレスが生じ、CTRP-9 発現を抑制する可能性が示唆された。培養脂肪細胞(3T3-L1)においても、代表的な FFA であるパルミチン酸(PA)や酸化ストレス惹起物質(H₂O₂)の添加により CTRP-9 の発現が低下することも明らかにした。

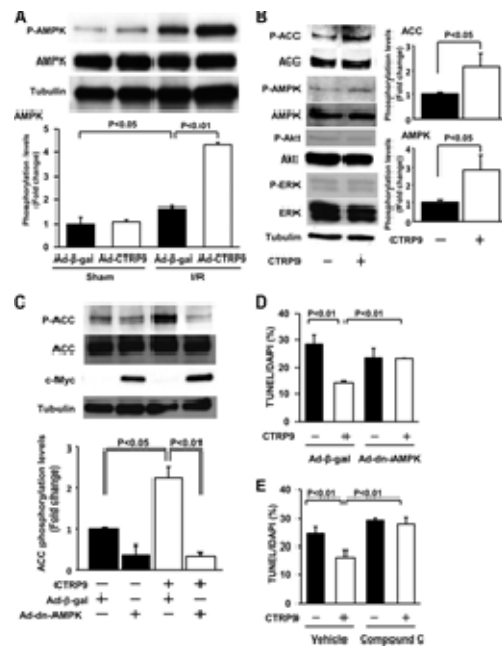


(3) CTRP-9 による心保護作用のメカニズム解明

CTRP-9 の投与は in vivo I/R モデルにおける心筋細胞、in vitro ラット新生仔心筋細胞の低酸素再酸素化傷害(Hypoxia Re-oxygenation (H/R))においても、TUNEL 染色で評価したアポトーシス細胞の数を減少させていた。

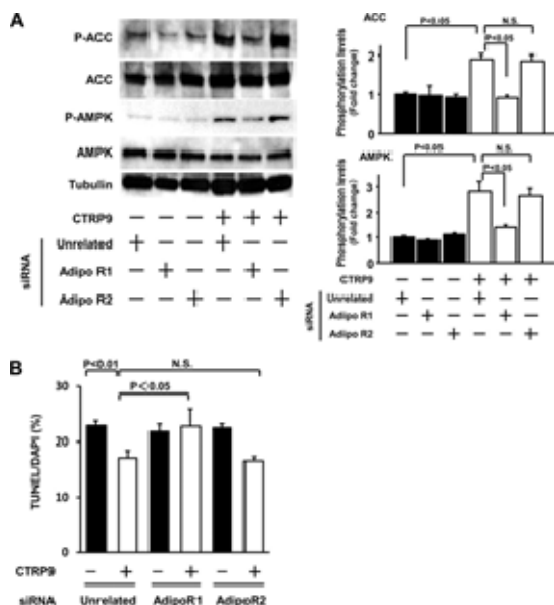
CTRP-9 の抗アポトーシス作用メカニズムとして、これまでに心筋細胞での抗アポトーシス作用が報告されている AMP キナーゼシグナルを見てみると、I/R モデルでの心筋組織、in vitro ラット新生仔心筋細胞のいずれにおいても CTRP-9 を投与した群で AMP キナーゼのリン酸化の亢進を認めた。

そこで CTRP-9 による心筋細胞抗アポトーシス作用が AMP キナーゼシグナルを介するかを明らかにするために、ラット新生仔心筋細胞に H/R 負荷時のアポトーシスをドミナントネガティブタイプの AMP キナーゼを過剰発現するアデノウイルス(Ad-dnAMPK)や AMP キナーゼ阻害薬(Compound C)を添加しその関与を検討した。Ad-dnAMPK, Compound C のいずれにおいても CTRP-9 による抗アポトーシス作用はほぼ完全にキャンセルされることが明らかとなった。



また以前の報告で、CTRP-9 が血管内皮細胞において、アディポネクチン受容体である Adipo R1 を介して AMP キナーゼシグナルを活性化し、内皮保護作用を発揮することが報告されており、今回心筋細胞においてもアディポネクチン受容体(Adipo R1, Adipo R2)を介して AMP キナーゼシグナルを活性化するかを検討した。ラット新生仔心筋細胞にリコンビ

ナント CTRP-9 を添加すると AMP キナーゼとその下流の ACC のリン酸化が増加するが、siRNA により Adipo R1 と Adipo R2 を減少させると、Adipo R1 を減少させた時のみ CTRP-9 による AMP キナーゼ (P-AMPK)、ACC のリン酸化 (P-ACC) の増加がキャンセルされた。



また Adipo R1 の siRNA により CTRP-9 による抗アポトーシス作用もキャンセルされた。以上より CTRP-9 は心筋細胞において、Adipo R1-AMPK シグナルを介して抗アポトーシス作用を発揮することが示された。

この内容に関しては、Journal of Biological Chemistry 誌 (2012; 287: 18965-73) に発表している。

現在 CTRP-9 の心筋保護作用に関しては、TAC モデルによる圧負荷心筋肥大に対する作用も検討中である。今後アディポネクチンとそのパラログである CTRP family の心筋保護作用に関して、アディポネクチン受容体欠損マウスを用いて詳細に検討していく予定である。

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 13 件)

1. Uemura Y, Shibata R, Ohashi K, Enomoto T, Kambara T, Yamamoto T, Ogura Y, Yuasa D, Joki Y, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T, Ouchi N. 2013. Adipose-derived factor CTRP9

attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *FASEB J.* 27:25-33. 査読有

2. Enomoto T, Shibata R, Ohashi K, Kambara T, Kataoka Y, Uemura Y, Yuasa D, Murohara T, Ouchi N. 2012. Regulation of adipolin/CTR12 cleavage by obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 428:155-9. 査読有
3. Ogura Y, Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, Kito T, Maruyama S, Yuasa D, Matsuo K, Enomoto T, Uemura Y, Miyabe M, Ishii M, Yamamoto T, Shimizu Y, Walsh K, Murohara T. 2012. Therapeutic Impact of Follistatin-like 1 on Myocardial Ischemic Injury in Preclinical Animal Models. *Circulation* 126:1728-38. 査読有
4. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y. 2012. Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie.* 94:2137-42. 査読有
5. Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Murohara T. 2012. Adipocytokines and obesity-linked disorders. *Nagoya J Med Sci.* 74:19-30. 査読有
6. Kambara T, Ohashi K, Shibata R, Ogura Y, Maruyama S, Enomoto T, Uemura Y, Shimizu Y, Yuasa D, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T, Ouchi N. 2012. CTRP9 protein protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 287:18965-73. 査読有

7. Maruyama S, Shibata R, Kikuchi R, Izumiya Y, Rokutanda T, Araki S, Kataoka Y, Ohashi K, Daida H, Kihara S, Ogawa H, Murohara T, Ouchi N. 2012. Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 287:408-17. 査読有
8. Shimano M, Ouchi N, Nakamura K, van Wijk B, Ohashi K, Asaumi Y, Higuchi A, Pimentel DR, Sam F, Murohara T, van den Hoff MJ, Walsh K. 2011. Cardiac myocyte follistatin-like 1 functions to attenuate hypertrophy following pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:E899-906. 査読有
9. Enomoto T*, Ohashi K*, Shibata R, Higuchi A, Maruyama S, Izumiya Y, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. 2011. Adipolin/C1qdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *J Biol Chem*. 286:34552-8. ***Equally first author** 査読有
10. Maruyama S, Shibata R, Ohashi K, Ohashi T, Daida H, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. 2011. Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 286:32790-800. 査読有
11. Li P, Shibata R, Maruyama S, Kondo M, Ohashi K, Ouchi N, Murohara T. 2010. Fenofibrate promotes ischemia-induced revascularization through the adiponectin-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 299:E560-6. 査読有
12. Shimano M, Ouchi N, Shibata R, Ohashi K, Pimentel DR, Murohara T, Walsh K. 2010. Adiponectin deficiency exacerbates cardiac dysfunction following pressure overload through disruption of an AMPK-dependent angiogenic response. *J Mol Cell Cardiol*. 49:210-20. 査読有
13. Ohashi, K., Ouchi, N., and Matsuzawa, Y. 2010. Adiponectin and Hypertension. *Am J Hypertens*. 24:263-9. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2010 Ohashi K, November 13 - 17, 2010 Chicago, Illinois, USA
Poster presentation
 2. 日本循環器学会総会 大橋 浩二 2011. 2011, 8月3-4日。横浜。英語口演発表。
 3. 日本循環器学会総会 大橋 浩二 2013. 2013, 3月15-17日。横浜。英語ポスター発表。
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
大橋 浩二 (KOJI OHASHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号：10595515
 - (2) 研究分担者 (なし)
 - (3) 連携研究者 (なし)