

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659384

研究課題名(和文) 脂肪由来分泌蛋白を標的とした急性冠症候群の治療法の開発

研究課題名(英文) The novel fat-derived hormone as a therapeutic target for acute coronary syndrome

研究代表者

大内 乗有 (OUCHI, NORIYUKI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：00595514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪組織由来分泌因子であるオメンチンの急性心筋障害に対する作用を心筋虚血再灌流の動物モデルを用いて解析した。オメンチン蛋白の全身投与によりマウス心筋虚血再灌流モデルにおいて、心筋梗塞サイズは縮小し、心筋組織でのアポトーシスの抑制を伴っていた。また、ブタ心筋虚血再灌流モデルを作成し、オメンチン蛋白の冠動脈内投与すると心筋障害の抑制と心機能の回復を認めた。従って、オメンチンは急性冠症候群の治療法開発の標的分子になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here, we investigated the impacts of the fat-derived hormone omentin on acute myocardial injury in animal models of ischemia/reperfusion (I/R). We found that systemic administration of human omentin protein to mice reduced myocardial infarct size and apoptosis following I/R. Furthermore, intra coronary injection of omentin improved cardiac injury and dysfunction in a pig model of I/R. Thus, omentin represents a novel target molecule for the treatment of acute coronary syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学 急性冠症候群

1. 研究開始当初の背景

我が国をはじめとする先進国では虚血性心疾患、特に急性心筋梗塞などの急性冠症候群の発症率や死亡率は高い。冠動脈インターベンションの進歩により、急性冠症候群患者の救命率や症状の改善率は良くなったが、肥満、糖尿病を合併した例などでは、心筋梗塞サイズの縮小や心機能改善が見込めない予後不良なことが多い。従って、冠動脈インターベンションに加え、心筋障害を軽減し、予後を改善させる有効な薬物治療の確立が必要である。

肥満、特に内臓脂肪蓄積は、糖尿病、高脂血症、高血圧を高率に合併するメタボリックシンドロームやその終末像である虚血性心疾患の重要な発症基盤である。近年の研究により、脂肪組織はアディポサイトカイン(あるいはアディポカイン)と総称すべき生理活性物質を分泌する内分泌臓器であることが示された。そして、申請者や他の研究グループの研究成果により、肥満状態におけるアディポサイトカインの産生異常が肥満合併症の病態に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。オメンチンはヒト内臓脂肪に高発現しているアディポサイトカインであり、肥満者や糖尿病患者において、血中濃度が低値を示すが、その機能は十分には明らかにされておらず、心血管疾患に対するオメンチンの作用については全く不明である。

2. 研究の目的

急性冠症候群に対する有効な治療薬は確立されておらず、それらの開発は急務を要する。本研究は、新規アディポサイトカインであるオメンチンに着目し、オメンチンの急性冠症候群に対する作用とその機序を解明し、オメンチンを急性冠症候群に対する新しい標的分子ととらえて、新しい治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)心筋虚血に対する個体レベルでの評価

マウス心筋虚血再灌流モデル：野生型マウスの左冠動脈を60分間血流遮断後に再灌流し24時間後に心臓を摘出した。手術3日前にアデノウイルス発現系を用いて、オメンチンあるいはコントロールウイルス(-gal)を全身投与した。また、リコンビナントヒトオメンチン蛋白(100ng/BW(g))あるいはコントロールとしてPBSを血流遮断直前あるいは再灌流直後に頸静脈より全身投与、虚血心筋に対する作用を評価した。

ブタ心筋虚血再灌流モデル：全身麻酔下のミニブタに対してバルーンカテーテルを挿入し左冠動脈血流遮断した。その間、ワイヤルーメンを介して、冠動脈よりオメンチン蛋白(3.0 μg/kg ブタ)あるいはコントロール

として生理的食塩水を投与した。血流遮断45分後に血流を再開、24時間後に心臓摘出を行った。

摘出心の形態学的、組織学的検討：Evans Blue/TTC染色を行い、左室エリア、虚血エリア、梗塞エリアを同定し、心筋梗塞サイズの定量化を行った。アポトーシスへの影響をTUNEL染色にて検討した。

メカニズム解析：摘出心筋を用いて、シグナル伝達系物質(AMPK, Akt)をウエスタンブロットティング法により評価した。

(2)心筋細胞に対する細胞レベルでの評価

心筋細胞培養：ラット胎児から採取した心筋細胞を培養した。リコンビナントヒトオメンチン蛋白を培養液中に添加(300 ng/ml)して効果を検討した。

アポトーシスの解析：低酸素再酸素化状態でアポトーシスを誘導した。TUNEL染色でアポトーシスを評価した。

シグナル伝達経路の解析：シグナル伝達系物質(AMPK, Akt)をウエスタンブロットティング法により評価した。AMPKに対してはアデノウイルスを用いたドミナントネガティブAMPKの過剰発現系をAktに対してはアデノウイルスを用いたドミナントネガティブAktの過剰発現系を用いて検討した。

4. 研究成果

(1)マウス心筋虚血再灌流障害に対してのオメンチンの保護作用。

オメンチンのマウス心筋虚血再灌流障害に対する効果の検討のため、心筋虚血再灌流モデル作成の3日前にアデノウイルス発現系を用いてオメンチンあるいはコントロールウイルスを静脈内全身投与した。オメンチン投与はコントロールに比し虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを著明に減少させた(図1A)。

次に、心筋のアポトーシスは虚血再灌流障害の進展に重要であるため、オメンチンのアポトーシスに対する作用をTUNEL染色で検討した。オメンチン投与は虚血心筋のTUNEL陽性細胞を有意に減少させ、アポトーシスを抑制していると考えられた(図1B)。また、心筋障害の指標であるCPKもオメンチン投与により低下した。

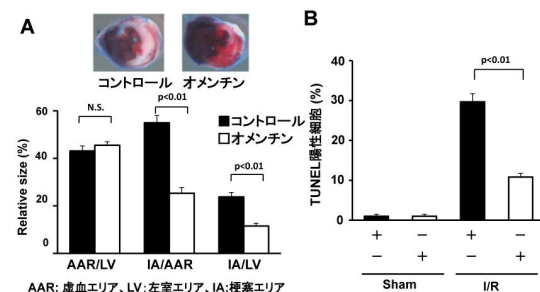


図1. オメンチンのマウス心筋虚血再灌流障害に対する効果

オメンチン蛋白投与の Maus 心筋虚血再灌流障害に対する効果の検討のため、血流遮断直前にヒトオメンチン蛋白あるいはコントロールである PBS を全身投与した。Maus へのヒトオメンチン蛋白投与はコントロールに比し虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを著明に減少させた。さらに、ヒトオメンチン蛋白を再灌流直後に全身投与しても、虚血再灌流後の心筋梗塞サイズは有意に減少した。従って、オメンチンは Maus において心筋組織でのアポトーシスを抑制し、心筋虚血再灌流障害に対して改善効果を有することが明らかとなった。

(2) 培養心筋細胞におけるオメンチンの抗アポトーシス作用。
オメンチンが心筋細胞に直接作用し、アポトーシスを制御するかを検討するために、通常酸素下 (Normoxia) あるいは低酸素再酸素化 (H/R) 刺激によって培養心筋細胞のアポトーシスを誘導した。アポトーシスを TUNEL 染色にて検出すると、オメンチン蛋白添加により心筋細胞のアポトーシスは抑制された (図 2)。オメンチンによるアポトーシス抑制作用の機序解明のため、抗アポトーシスシグナルである AMPK と Akt の関与を検討した。オメンチン蛋白を心筋細胞に添加すると AMPK と Akt のリン酸化が促進した。また、オメンチンの全身投与は、Maus 虚血心筋においても AMPK と Akt のリン酸化を促進していた。さらに、アデノウイルス発現系を用いて培養心筋細胞にドミナントネガティブ AMPK あるいはドミナントネガティブ Akt を過剰発現させ AMPK あるいは Akt シグナルを阻害するとオメンチンの抗アポトーシス作用は共に部分的に解除された。従って、オメンチンは心筋細胞に直接作用し AMP キナーゼあるいは Akt シグナルの促進を介して心筋細胞のアポトーシスを抑制すると示唆された。

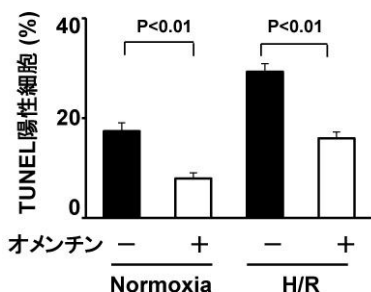
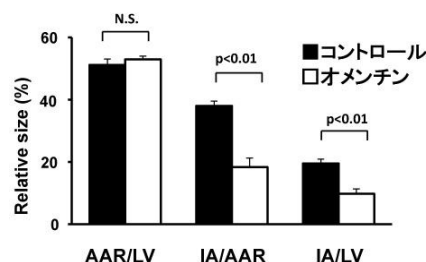


図2. オメンチンは培養心筋細胞のアポトーシスを抑制する

(3) ブタ心筋虚血再灌流モデルにおけるオメンチンの心筋保護作用。
リコンビナントヒトオメンチン蛋白投与によるブタ心筋虚血再灌流障害に対する作用の検討のため、ブタ左冠動脈をバルーン閉塞直後

から 10 分間かけてヒトオメンチン蛋白あるいは生理的食塩水 (コントロール) を冠動脈内に注射した。ヒトオメンチン蛋白投与により、再灌流 24 時間後の心筋梗塞サイズは有意に減少した (図 3)。また、心筋障害の指標である血中のトロポニン I やクレアチンキナーゼ MB 分画の濃度は、オメンチン投与により有意に低下した。さらに、オメンチン投与は再灌流 24 時間後の心機能をも改善させていた。それに伴い、オメンチン投与群では、TUNEL 染色にて検討したブタの虚血心筋におけるアポトーシスは減少していた。



AAR: 虚血エリア、LV: 左室エリア、IA: 梗塞エリア

図3. オメンチンのブタ心筋虚血再灌流障害に対する効果

以上より、オメンチンは AMPK シグナルと Akt シグナルの活性化による心筋細胞のアポトーシス抑制を介した心筋保護作用を有すると考えられた。従って、オメンチンは急性冠症候群の治療法開発に対する新しい標的分子になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- Enomoto T, Ohashi K, Shibata R, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Kataoka Y, Miyabe M, Matsuo K, Joki Y, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Ito M, Murohara T, Ouchi N. Transcriptional regulation of an insulin-sensitizing adipokine adipolin/CTRP12 in adipocytes by Kruppel-like factor 15. *PLoS One*. 2013;8(12):e83183. doi: 10.1371/journal.pone.0083183. 査読有
- Shimizu Y, Shibata R, Ishii M, Ohashi K, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Kataoka Y, Kihara S, Murohara T, Ouchi N. Adiponectin-mediated modulation of lymphatic vessel formation and lymphedema. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000438. doi: 10.1161/JAHA.113.000438. 査読有
- Yamamoto T, Shibata R, Ishii M, Kanemura N, Kito T, Suzuki H, Miyake H, Maeda K, Tanigawa T, Ouchi N, Murohara T. Therapeutic Reendothelialization by Induced Pluripotent Stem Cells After

- Vascular Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:2218-21. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301313. 査読有
- ・ Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, Yamamura Y, Yamamoto T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Tanigawa T, Yamashita JK, Ouchi N, Honda H, Isobe K, Murohara T. iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for reparative angiogenesis. *Sci Rep.* 2013; 3: 1418. doi: 10.1038/srep01418. 査読有
 - ・ 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. Adipose-derived factor CTRP9 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *FASEB J.* 2013;27:25-33. doi: 10.1096/fj.12-213744. 査読有
 - ・ 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. Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical animal models. *Circulation.* 2012;126:1728-38. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115089. 査読有
 - ・ Shibata R, Ouchi N, Takahashi R, Terakura Y, Ohashi K, Ikeda N, Higuchi A, Terasaki H, Kihara S, Murohara T. Omentin as a novel biomarker of metabolic risk factors. *Diabetol Metab Syndr.* 2012;4:37. doi: 10.1186/1758-5996-4-37. 査読有
 - ・ 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. CTRP9 protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMPK-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2012;287:18965-73. doi: 10.1074/jbc.M112.357939. 査読有

[学会発表](計8件)

- ・ 大内乗有 アディポサイトカインと血管病 第17回日本心不全学会学術集会 大宮ソニックシティ(さいたま市)埼玉 2013年11月29日
- ・ 大内乗有 柴田玲 大橋浩二 室原豊明

アディポサイトカインと心血管病 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(豊中市)大阪 2013年11月22日

- ・ 大内乗有 柴田玲 大橋浩二 室原豊明 高血圧合併症とアディポサイトカインの関連 第21回日本血管生物医学会学術集会 千里阪急ホテル(豊中市)大阪 2013年9月28日
- ・ Ouchi N. Role of adipocytokines in cardiovascular disease. The 2nd International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis Seoul Korea 2013年9月14日
- ・ Ouchi N. Role of adipocytokines in the cardiovascular system. The 29th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section Centennial Hall Kyushu University School of Medicine (Fukuoka) Fukuoka, Japan, 2012年10月27日
- ・ 大内乗有 心血管系における新規アディポサイトカインの役割 第33回日本肥満学会 ホテルグランヴィア京都(京都市)京都 2012年10月12日
- ・ 大内乗有 アディポサイトカインによる炎症調節機構 第44回日本動脈硬化学会総会 ヒルトン福岡シーホーク(福岡市)福岡 2012年7月20日
- ・ 大内乗有 アディポサイトカインによる疾患制御 第49回日本臨床分子医学会学術集会 みやこめっせ(京都市)京都 2012年4月13日

6. 研究組織

(1)研究代表者

大内 乗有 (OUCHI, Noriyuki)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号: 00595514

(2)研究分担者

大橋 浩二 (OHASHI, Koji)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号: 10595515

柴田 玲 (SHIBATA, Rei)
名古屋大学・医学系研究科・特任講師
研究者番号: 70343689

室原 豊明 (MUROHARA, Toyooki)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 90299503

(3)連携研究者 なし