

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860418

研究課題名(和文)新規生理活性ペプチドの動脈硬化性疾患診断マーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of diagnostic marker for atherosclerotic disease by new bioactive peptide

研究代表者

佐藤 健吾 (Sato, Kengo)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：70549930

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)：マクロファージの泡沫化はカルディオトロフィン1(CT-1)及びキスペプチン10(KP-10)で促進し、ウロコルチン(Ucn)及びTSG-6で抑制した。Ucn及びTSG-6はHUVECの炎症を抑制し、KP-10は促進した。大動脈平滑筋細胞の遊走・増殖はCT-1で促進し、TSG-6で抑制した。アポE欠損マウスへの投与でCT-1及びKP-10は動脈硬化病変形成を促進し、Ucn及びTSG-6は抑制した。冠動脈疾患(CAD)患者において、血漿中TSG-6濃度は増加し、冠動脈硬化プラークに高発現していた。よってTSG-6はCADの新しい治療の標的及びバイオマーカーになる可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cardiotrophin-1 (CT-1) and kisspeptin-10 (KP-10) enhanced foam-cell formation, but urocortin (Ucn) and tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) suppressed foam cell formation in human macrophages. The migration and proliferation were stimulated by CT-1, suppressed by Ucn and TSG-6 in human vascular smooth muscle cell. Ucn and TSG-6 suppressed LPS-induced up-regulation of MCP1, IL6, ICAM1, and VCAM1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Four-week-infusion of CT-1 and KP-10 into apolipoprotein E-deficient mice accelerated the development of aortic atherosclerotic lesions, whereas Ucn and TSG-6 retarded the atherogenesis. In coronary artery disease (CAD) patients, plasma TSG-6 levels were increased and TSG-6 was highly expressed in the fibrous cap within coronary atherosclerotic plaques. Thus, TSG-6 can be regarded as a novel therapeutic target and TSG-6 may be a candidate for biomarkers of CAD.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 バイオマーカー ペプチド 血管内皮細胞 マクロファージ 血管平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

【背景1】本邦の死因は、第1位が悪性新生物(29%)、第2位が虚血性心疾患(16%)、第3位が脳血管疾患(10%)である(2011年厚生労働省「人口動態統計」)。血管病(虚血性心疾患+脳血管疾患)の占める割合は、1位の悪性新生物(がん)に匹敵する。がんにおいても進展する際には血管新生が必須であり、脈管を介し転移するため、がんも血管にまつわる疾患である。

【背景2】急性冠症候群や脳卒中の主因となる動脈硬化の病態を把握するために高感度CRP等が測定されているが、信頼できるバイオマーカーの発見に至っていない。

2. 研究の目的

国民の健康維持・増進のため、動脈硬化の早期診断および有効な予防・治療法の開発が強く望まれている。故に、動脈硬化との関連が示唆される新規ペプチドであるスタニオカルシン類似ペプチド、カルディオトロフィン1、キस्पепチン10、ウロコルチン、Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6)の中から動脈硬化性疾患のバイオマーカーの探索を行う。

3. 研究の方法

動脈硬化病変形成には、血管内皮細胞の傷害(炎症)、単球-内皮接着、マクロファージの泡沫化、血管平滑筋細胞の遊走・増殖が極めて重要である。そこで、以下の方法で、新規ペプチド(スタニオカルシン類似ペプチド、カルディオトロフィン1、キस्पепチン10、TSG-6、ウロコルチン)の動脈硬化病変形成への制御作用および分子機構を解明する。

(1) 細胞実験: in vitro

培養ヒト内皮細胞の単球遊走・接着因子の発現、単球-内皮接着能、酸化LDLによる培養ヒト単球由来マクロファージの泡沫化、関連遺伝子(ACAT1, NCEH, CD36, SR-A, ABCA1, ABCG1, SR-BI)発現、大動脈平滑筋細胞の遊走・増殖・細胞外マトリックス(ECM)に対する制御作用を検討した。

(2) 動物実験: in vivo

動脈硬化モデル動物のアポE欠損マウスに腹腔もしくは浸透圧ポンプを用いて、生理食塩水(コントロール)、カルディオトロフィン1および抗カルディオトロフィン1抗体、キस्पепチン10、TSG-6、ウロコルチンを4週間投与する。マウス大動脈の動脈硬化病変、単球/マクロファージの浸潤、血管平滑筋細胞の増殖、浸出性腹腔マクロファージの泡沫化および関連遺伝子発現、血中パラメーター等の測定を行った。

(3) 臨床研究

TSG-6およびキस्पепチン10のヒトにおける病態生理学的意義およびバイオマーカー

としての有用性を検討するため、冠動脈疾患(急性冠症候群)患者の冠動脈プラークおよび血中レベルを比較した。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞への作用

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、ウロコルチンおよびTSG-6は、LPSが誘導するMCP-1とICAM-1のmRNA発現を抑制した。TSG-6はさらにIL-6、VCAM-1のmRNA発現を抑制した。スタニオカルシン類似ペプチドは、一方、キस्पепチン10は、E-selectin、VCAM-1、ICAM-1、MCP-1、IL-6、TNF- α のmRNA発現を促進し、さらに、VCAM-1、ICAM-1においてはタンパク質発現も促進することで、HUVECへのTHP1細胞(単球)の接着を有意に促進した。また、ウロコルチン、TSG-6、キस्पепチン10は、ヒト血管内皮細胞EA.hy926の増殖を抑制した。

(2) 単球/マクロファージへの作用

TSG-6およびウロコルチンはCD36、ACAT1発現抑制を介して泡沫化を抑制した。一方、CT-1およびキस्पепチン10はCD36、ACAT1発現促進(MAPK/ERK、PI3K、AKT1/2シグナルが関与、カルディオトロフィン1のみ検討)を介して泡沫化を促進した。スタニオカルシン類似ペプチドは配列により相反作用が認められた。TSG-6はヒト単球がマクロファージに分化する過程で、ERK1/2のdown-regulationにより炎症性のM1よりも抗炎症性のM2のフェノタイプに圧倒的にシフトしていた。

(3) 血管平滑筋細胞への作用

培養ヒト大動脈平滑筋細胞(HASMC)において、カルディオトロフィン1は遊走および増殖を促進し、一方、TSG-6、ウロコルチン、キस्पепチン10では抑制した。KP-10の遊走および増殖の抑制にはp38やERK1/2が関与していた。TSG-6は、c-Src、リン酸化ERK1/2、p38、NF- κ B発現を抑制し、抗アポトーシス分子のBcl-2タンパク質発現を促進した。スタニオカルシン類似ペプチドは遊走に対しても配列により相反作用が認められた。また、ウロコルチンおよびキस्पепチン10はECMのMMP2およびMMP9の活性を有意に増加させた。また、キस्पепチン10はHASMCのアポトーシスを誘導していた。カルディオトロフィン1およびTSG-6はコラーゲンの発現を促進した。

(4) In vivo, ex vivoでの作用

アポE欠損マウスへの4週間持続投与で、カルディオトロフィン1およびキस्पепチン10投与で大動脈硬化病変形成は促進した。また、大動脈弁輪部での病変面積、血管壁の単球/マクロファージの浸潤が増加した。カルディオトロフィン1ではさらに血管平滑筋細胞が増殖、コラーゲンの含有が増加した。抗カルディオトロフィン1抗体単独投与ではそれらはキャンセルされ、単球/マクロファージの浸潤はコントロールと比較しても抑制された。

カルディオトロフィン 1 投与マウスの浸出性腹腔マクロファージの解析では、ASC、NF- B、COX-2のようなインフラマソームの活性化が認められた。一方、ウロコルチンおよびTSG-6投与で、大動脈硬化病変形成はおよび有意に抑制された。ウロコルチン投与で、大動脈弁輪部の病変面積・血管壁の単球/マクロファージの浸潤および血管平滑筋細胞の増殖に作用は認められなかったが、TSG-6投与で、大動脈弁輪部の血管壁の単球/マクロファージの浸潤および血管平滑筋細胞の増殖を有意に抑制し、コラーゲン線維は有意に増加していた。また、総コレステロール値が有意に減少していた。TSG-6投与マウスより回収した浸出性腹腔マクロファージの解析では、MCP-1、CRP、ASC、NF- Bなどのインフラマソームの down-regulation が認められ、M2マクロファージが有意であった。

表 1 In vitroおよびin vivoにおける作用

	In vitro			In vivo
	血管内皮細胞の炎症反応	マクロファージの泡沫化	血管平滑筋細胞の遊走・増殖	ApoE欠損マウスの動脈硬化病変形成
カルディオトロフィン1	未検討	↑	↑	↑
ウロコルチン	↓	↓	↓	↓
スタニオカルシン1	↓	↓	(遊走のみ) ↓	未検討
スタニオカルシン2の分画	↓	↑	(遊走のみ) ↑	未検討
TSG-6	↓	↓	↓	↓
キスペプチン10	↑	↑	↓	↑

(5) 臨床研究

TSG-6のヒトにおける病態生理学的意義およびバイオマーカーとしての有用性を検討するため、冠動脈疾患患者の冠動脈および血中レベルを比較した。冠動脈疾患(急性冠症候群)患者の冠動脈プラークの線維性皮膜(フィブラスキャップ)において、TSG-6は強発現していた。また、冠動脈疾患患者では非冠動脈疾患患者に比べ、TSG-6の血中濃度は有意に増加していた。これは、動脈硬化病変形成を食い止めようと反応性にマクロファージや血管平滑筋細胞から分泌されて増加したものと考えられた。よって、TSG-6は、冠動脈硬化症のバイオマーカーになる可能性が強く示唆された。

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 11 件)

1. Watanabe K, Watanabe R, Konii H, Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Counteractive effects of omentin-1 against atherogenesis. *Cardiovas Res* 2016;110:118-28. (査読有)
DOI: 10.1093/cvr/cvw016.

2. Naito C, Hashimoto M, Watanabe K, Shirai R, Takahashi Y, Kojima M, Watanabe R, Sato K, Iso Y, Matsuyama T, Suzuki H, Ueda HI, Watanabe T. Facilitatory effects of fetuin-A on atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2016;246:344-51. (査読有)
DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.037.
3. Hasegawa A*, Sato K*, Shirai R, Watanabe R, Yamamoto K, Watanabe K, Nohtomi K, Hirano T, Watanabe T. Vasoprotective effects of urocortin 1 against atherosclerosis in vitro and in vivo. *PLoS One* 2014;9:e110866. [*equally contribution] (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0110866. eCollection 2014.
4. Ogawa A, Fujimoto K, Hayashi A, Chida S, Sato K, Takai K, Masaki T, Suzuki A, Kamata Y, Takano K, Koyama T, Shichiri M. Physiological fluctuations of human plasma total salusin-β, an endogenous parasympathomimetic/proatherosclerotic peptide. *Peptides* 2014;59:83-88. (査読有)
DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.037.
5. Tashiro Y*, Sato K*, Watanabe T, Nohtomi K, Terasaki M, Nagashima M, Hirano T. A glucagon-like polypeptide-1 analog liraglutide suppresses macrophage foam cell formation and atherosclerosis. *Peptides* 2014;54C:19-26. [*equally contribution] (査読有)
DOI: 10.1016/j.peptides.2013.12.015.
6. Watanabe T, Konii H, Sato K, Itoh F. The roles of novel vasoactive agents in atherosclerotic cardiovascular diseases: good or bad guys? *Cardiovascular Disease I*. 2014, 117-131. (査読有)
<https://www.iconceptpress.com/book/cardiovascular-disease-i/11000116/1303000865.pdf>
7. Terasaki M, Nagashima M, Nohtomi K, Kohashi K, Tomoyasu M, Sinmura K, Nogi Y, Katayama Y, Sato K, Itoh F, Watanabe T, Hirano T. Preventive effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on atherosclerosis is mainly attributable to incretin's actions in nondiabetic and diabetic apolipoprotein E-null mice. *PLoS ONE* 2013;8:e70933. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0070933.
8. Konii H*, Sato K*, Kikuchi S, Okiyama H, Watanabe R, Hasegawa A, Yamamoto K, Itoh F, Hirano T, Watanabe T. Stimulatory effects of cardiotrophin-1 on atherosclerosis.

Hypertension 2013;62:942-950. [*equally contribution] (査読有)
DOI: 10.1161/hypertensionaha.113.01653.

9. Watanabe T, Sato K, Itoh F, Noguchi Y, Fujimoto K, Koyama T, Shichiri, M. Emerging roles for vasoactive peptides in diagnostic and therapeutic strategies against atherosclerotic cardiovascular diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2013;14:472-480. (査読有)
DOI: 10.2174/13892037113149990064.
10. Sato K, Watanabe R, Itoh F, Watanabe T. Salusins: potential use as a biomarker for hypertension and atherosclerotic cardiovascular diseases. *Int. J. Hypertens.*, 2013;2013:965140. (査読有)
DOI: 10.1155/2013/965140.
11. 佐藤健吾、伊東史子、渡部琢也。冠動脈硬化疾患のバイオマーカーとしての血管作動性物質の有用性。 *日本臨床検査自動化学会誌「JJCLA」*2013;38:255-261. (査読有)
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=cl0rikej/2013/003803/001&name=0255-0261j&UserID=202.249.50.60>.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 白井玲美奈、佐藤健吾、松山高明、木庭新治、渡部琢也。Neopterin の抗炎症・抗動脈硬化作用。第19回日本心血管内分分泌代謝学会学術集会、2015/12、神戸
2. 佐藤健吾、白井玲美奈、松山高明、木庭新治、渡部琢也。Kisspeptin-10 (KP10)は動脈硬化性プラークの進展および不安定化を促進する。第19回日本心血管内分分泌代謝学会学術集会、2015/12、神戸
3. Shirai R, Sato K, Watanabe K, Watanabe R, Matsuyama T, Koba S, Hirano T, Watanabe T Preventive Effects of Neopterin on Atherosclerosis. *American Heart Association Scientific Sessions 2015*. (2015/11/9 Orland, FL, USA.)
4. Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Koba S, Hirano T, Watanabe T. A potent vasoconstrictor kisspeptin-10 induces atherosclerotic plaque progression and instability. *American Heart Association Scientific Sessions 2015*. (2015/11/10 Orland, FL, USA.)
5. Watanabe K, Watanabe R, Konii H, Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T.

Counteractive Effects of Omentin-1 Against Atherogenesis. *American Heart Association Scientific Sessions 2015*. (2015/11/8 Orland, FL, USA.)

6. 佐藤健吾、白井玲美奈、渡部琢也。Kisspeptin-10 の動脈硬化病変形成およびプラーク不安定化に対する作用。第22回動脈硬化若手研究会、2015/10、東京
7. Shirai R, Sato K, Watanabe K, Watanabe R, Matsuyama T, Koba S, Hirano T, Watanabe T. Suppressive Effects of Neopterin on Atherosclerosis. 第47回日本動脈硬化化学会学術集会、2015/7、仙台
8. Watanabe K, Watanabe R, Konii H, Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Koba S, Hirano T, Watanabe T. Preventive effects of omentin-1 on atherosclerosis. 第47回日本動脈硬化化学会学術集会、2015/7、仙台
9. 渡部麗奈、渡辺夏帆、白井玲美奈、小島美穂、吉澤隼巳、佐藤健吾、渡部琢也。動脈硬化に対する Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6)の抑制作用。第4回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム、2015/6、東京
10. Rena Watanabe, Kaho Watanabe, Remina Shirai, Hanae Konii, Kengo Sato, Takuya Watanabe. Preventive effects of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 on atherosclerosis. *American Heart Association Scientific Sessions 2014*. (2014/11, Chicago, Illinois, USA.)
11. 白井玲美奈、佐藤健吾、渡部琢也。Neopterin の In Vitro における動脈硬化に対する作用。第18回日本心血管内分分泌代謝学会学術集会、2014/11、横浜
12. 佐藤健吾。tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) の抗動脈硬化作用。第21回動脈硬化若手研究会、2014/10、大阪
13. Rena Watanabe, Kengo Sato, Hitomi Watanabe, Hanae Konii, Akinori Hasegawa, Keigo Yamamoto, Takuya Watanabe Preventive effects of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) on atherosclerosis. 第46回日本動脈硬化化学会学術集会、2014/7、東京
14. Terasaki M, Nagashima M, Nohtomi K, Kohashi K, Tomoyasu M, Ikado K, Nogi Y, Sato K, Itoh F, Watanabe T, Hirano T. The suppressive effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on atherosclerosis is mainly attributable to the action of incretin in both

nondiabetic and diabetic mice. *49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes*. (2013/9, Barcelona, Spain)

15. Tomoyasu M, Watanabe T, Kim-Kaneyama J, Terasaki M, Nohtomi K, Sato K, Itoh F, Hirano T. Incretin-based treatments suppress human macrophage foam cell formation and VSMC migration and proliferation contributing to atherosclerosis prevention. *49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes*. (2013/9, Barcelona, Spain)
16. Watanabe T, Konii H, Kikuchi S, Okiyama H, Watanabe R, Hasegawa A, Yamamoto K, Sato K, Itoh F, Hirano T. Stimulatory effects of cardiotrophin-1 on atherosclerosis. *American Heart Association Scientific Sessions 2013*. (2013/11, Dallas, Texas, USA.)
17. Watanabe T, Konii H, Kikuchi S, Okiyama H, Watanabe R, Hasegawa A, Yamamoto K, Sato K, Itoh F, Hirano T. Stimulatory effects of cardiotrophin-1 on atherosclerosis. 第45回 日本動脈硬化学会学術集会、2013/7、東京
18. Yamamoto K, Sato K, Tajima Y, Hasegawa A, Itoh F, Watanabe T. Opposite effect of stanniocalcin-related proteins on foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. 第45回 日本動脈硬化学会学術集会、2013/7、東京
19. Hasegawa A, Sato K, Konii H, Watanabe R, Yamamoto K, Itoh F, Watanabe T. Suppressive effects of urocortin-1 on atherosclerosis. 第45回 日本動脈硬化学会学術集会、2013/7、東京
20. Watanabe T, Konii H, Kikuchi S, Okiyama H, Watanabe R, Hasegawa A, Yamamoto K, Sato K, Itoh F. Cardiotrophin-1 accelerates the development of atherosclerotic lesions. 第21回 日本血管生物医学学会学術集会、2013/9、大阪
21. 佐藤健吾、Cardiotrophin-1 の動脈硬化促進作用、第20回 動脈硬化若手研究会、2013/10、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~cardiovasc/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 健吾 (SATO KENGO)

東京薬科大学 生命科学部 心血管医科学
研究室・助教

研究者番号：70549930