

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460659

研究課題名(和文)冠動脈硬化症のリスク/バイオマーカーになる新規ペプチドの検索

研究課題名(英文) Investigation of new vasoactive peptides as risk/biomarker for coronary atherosclerosis

研究代表者

渡部 琢也 (Watanabe, Takuya)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30297014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、動脈硬化に対し新規血管作動性ペプチドのCardiotrophin-1、Fetuin-A、Kisspeptin-10、Stanniocalcin (STC)-2分画には促進作用が、STC-1、Omentin-1、Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6)、Urocortin-1には抑制作用がある事を世界で初めて明らかにした。血液中のKisspeptin-10、Omentin-1、TSG-6は冠動脈硬化症のバイオマーカーとして臨床応用出来る事や、後者2つとUrocortin-1を基に動脈硬化性疾患の治療薬の開発へ発展出来る事を見出した。

研究成果の概要(英文)：The present study (cellular, animal, and clinical research) provides the first evidence to demonstrate that new vasoactive peptides regulate atherosclerosis. The atherosclerosis is stimulated by cardiotrophin-1, fetuin-A, kisspeptin-10, and stanniocalcin (STC)-2-derived segments, but is suppressed by STC-1, omentin-1, tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6), and urocortin-1. This study also shows that plasma levels of kisspeptin-10, omentin-1, and TSG-6 may become candidates for biomarker of coronary atherosclerosis in patients with ischemic heart disease. Further studies are needed to make anti-atherosclerotic drugs on the basis of the good peptides, such as omentin-1, and TSG-6, and urocortin-1.

研究分野：循環器内科

キーワード：動脈硬化 冠動脈疾患 ペプチド バイオマーカー 創薬

1. 研究開始当初の背景

- (1) 昨今の世界第一位の死因は、虚血性心疾患であることが世界保健機関(WHO)の発表から明らかである。厚生労働省による人口動態調査から、本邦においても虚血性心疾患による死亡が極めて多いのが現状である。
- (2) 虚血性心疾患は、心臓を栄養する冠動脈における動脈硬化に起因する。動脈硬化病変は、血管内皮細胞の炎症・障害、酸化LDLによるマクロファージの泡沫化、血管平滑筋細胞の遊走・増殖により形成され進展していく。
- (3) 虚血性心疾患を予防するためには、危険因子である糖尿病、高血圧、脂質異常症等に対する個々の対症療法が懸命に行われてきたが、虚血性心疾患の発症は未だに減少していない。
- (4) 虚血性心疾患発症時の診断マーカー(CPK、GOT、LDH、白血球等)は確立されてきたが、虚血性心疾患の発症以前の予測因子の重要性も近年高まってきた。動脈硬化は慢性の血管炎であることから、炎症を反映する高感度 C-Reactive Protein (CRP)等が検討されてきたが、これに勝るより信頼できるバイオマーカーの発見には未だに至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、国民の健康維持・増進のため、動脈硬化の早期診断及び有効な予防・治療法の開発が強く望まれる時代の要請に応えるために立案された。

最近、脚光を浴びている炎症に関するサイトカイン/ペプチドホルモンの中で、炎症を促進させる Interleukin-6 Family である Cardiotrophin-1 や抗炎症作用を持つ Tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) に着目した。また、新規ペプチドである Kisspeptin-10、Fetuin-A、Stanniocalcin (STC)、Omentin-1、Urocortin-1等の動脈硬化制御作用や冠動脈疾患のリスクを検討した。本研究ではこれらを用い、冠動脈疾患のバイオマーカーや動脈硬化性疾患の治療薬を開発しようとして試みた。

3. 研究の方法

- (1) 培養ヒト血管壁細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト単球由来マクロファージ、ヒト大動脈平滑筋細胞)に対する新規ペプチドの作用とその分子機構を解明した。
- (2) 動脈硬化モデルのApoE欠損マウスに新規ペプチドを投与して動脈硬化進展に対する作用を検討した。
- (3) 虚血性心疾患患者13例及び非虚血性心疾患患者5例の冠動脈における新規ペプチドの発現レベルを検討した。
- (4) 虚血性心疾患患者135例、非虚血性心疾患患者47例、健常者28例における新規ペプチドの血中濃度を測定した。
- (5) 臨床研究により動脈硬化の病態把握のためのバイオマーカーとしての有用性を検証した。

- (6) 新規ペプチドを基に動脈硬化治療薬の開発を試みた。

4. 研究成果

- (1) 培養ヒト血管壁細胞を用いた動脈硬化作用の検討

動脈硬化の3大主要現象(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)に関し、ヒト血管壁細胞を用い実験を行った。まず、ヒト単球由来マクロファージにおける酸化LDLによる泡沫化は、Cardiotrophin-1、Fetuin-A、Kisspeptin-10、STC-2分画ペプチドにより有意に促進され、STC-1、Omentin-1、TSG-6、Urocortin-1により有意に抑制された(表1)。また、血管内皮細胞での炎症反応や血管平滑筋細胞での遊走・増殖も、表1のような結果が得られた。以上から、動脈硬化において Cardiotrophin-1、Fetuin-A、Kisspeptin-10、STC-2分画ペプチドは悪玉であり、Omentin-1、TSG-6、STC-1、Urocortin-1は善玉であることが判明した(引用文献1、発表論文1,5,6,8,9,12)。

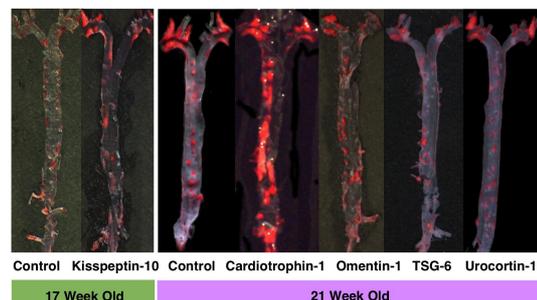
表1. 新規血管作動性ペプチドのヒト血管壁細胞に対する動脈硬化作用

	マクロファージ 泡沫化	血管内皮細胞 炎症反応	血管平滑筋細胞 遊走・増殖
Cardiotrophin-1	↑	↑	↑
Fetuin-A	↑	↑	↑
Kisspeptin-10	↑	↑	↓
Stanniocalcin-2分画	↑	↓	↑(遊走)
Stanniocalcin-1	↓	↓	↓(遊走)
Omentin-1	↓	↓	↓
TSG-6	↓	↓	↓
Urocortin-1	↓	↓	↓

- (2) ApoE欠損マウスに新規ペプチドの投与実験

上記ペプチドをApoE欠損マウスに浸透圧ポンプを用い4週間投与した結果、大動脈における動脈硬化病変の進展は、Cardiotrophin-1、Kisspeptin-10により有意に増大し、Omentin-1、TSG-6、Urocortin-1により有意に抑制された(図1)(引用文献1、発表論文1,5,8,12)。

図1. 新規血管作動性ペプチドのApoE欠損マウスの動脈硬化病変進展に対する作用



高コレステロール食を負荷したApoE欠損マウスにKisspeptin-10を13~17週齢の4週間投与し、Cardiotrophin-1、Omentin-1、TSG-6、Urocortin-1は17~21週齢の4週間投与した。ApoE欠損マウスの大動脈内腔の展開標本をオイルレッドOにて動脈硬化病変を赤く染色した。

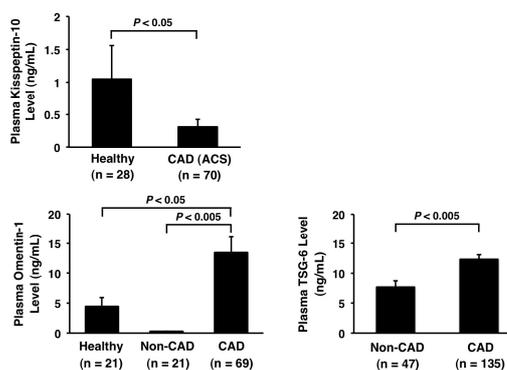
(3) 虚血性心疾患患者の冠動脈硬化病変における新規ペプチドの発現量

虚血性心疾患患者においては非虚血性心疾患患者に比べ、冠動脈病変における Kisspeptin-1、Omentin-1、TSG-6の発現レベルは全て増加していた(発表論文5,8,12)。

(4) 虚血性心疾患患者における新規ペプチドの血中濃度

虚血性心疾患患者においては、非虚血性心疾患患者または健常者に比べ、予想に反して、血漿中のKisspeptin-10濃度は有意に減少し、Omentin-1やTSG-6濃度は有意に増加していた(図2)(発表論文5,8,12)。

図2. 冠動脈疾患(CAD)患者、非冠動脈疾患(Non-CAD)患者、健常者における血液中のKisspeptin-10, Omentin-1, TSG-6濃度の比較



Kisspeptin-10の冠動脈病変での発現レベルは、労作性狭心症や陳旧性心筋梗塞患者での検討では動脈硬化病変の重症化になるにつれ増加していた。しかし、Kisspeptin-10の血中濃度の測定は急性冠症候群(ACS)発症4時間以内の患者で行われたが、非虚血性心疾患患者に比べ低下していた。Kisspeptin-10は、線溶系を活性化することが知られているため、ACS発症における血栓形成時には血中で消費されてしまったものと考えられた。また、Omentin-1とTSG-6が善玉でありながら病変部及び血中で増加していたのは病変進展を抑制するために反応性に増加していたものと推察された。これらのことから、役割こそ違えど、Kisspeptin-1、Omentin-1、TSG-6は、虚血性心疾患を反映するバイオマーカーに成り得る候補であることが判明した。

(5) 臨床研究により動脈硬化の病態把握のためのバイオマーカーとしての有用性を検証

これからも、症例をもっと増やし、採血のタイミングを変えて検討する必要がある。また3つのバイオマーカーを組み合わせると診断効率が上昇するかどうか検証する必要がある。更に、虚血性心疾患発症後3年にわたり追跡調査を行い、発症時のバイオマーカーの高値の程度と心血管イベントや予後との関連も調べてみたいと考えている。

(6) 創薬

我々のin vitro及びin vivoの実験結果から、Omentin-1、TSG-6、STC-1、Urocortin-1は動脈硬化に対して善玉であることが判明したた

め、本学薬学部の協力の基にそれらのアナログ製剤を精製することを今後も継続して行っていきたいと考えている。ドラッグデリバリーシステムとして、ペプチドは経口投与では消化されてしまうため、インスリンのように主に注射となってしまうが、ナノカプセルを応用した投与方法も将来検討していきたい。

以上、本研究では、新規ペプチドをターゲットにした虚血性心疾患のリスクとしての重要性やバイオマーカーに成り得る可能性を検討した。更に、善玉ペプチドを利用した血管壁細胞の遺伝子・分子を標的にした新たな治療法の可能性を見出した。

故に、本研究は、虚血性心疾患の予防・治療の再構築に大いに寄与するものと考えられる。

<引用文献>

1. Konii H, Sato K, Kikuchi S, Okiyama H, Watanabe R, Hasegawa A, Yamamoto K, Itoh F, Hirano T, Watanabe T. Stimulatory effects of cardiostrophin 1 on atherosclerosis. *Hypertension* 2013;62:942-950.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

- 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:e0110866(査読有).
- Mori S, Yamada H, Noguchi Y, Miyakawa T, Morikawa R, Watanabe T, Takasu M. Structure analysis of GLP-1 in DPC micelle. *Pept Sci* 2015;2014:213-216(査読無).
- Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, Kohashi K, Nagashima M, Kushima H, Watanabe T, Hirano T. Amelioration of hyperglycemia with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor prevents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and type 2 diabetic mice. *PLOS ONE* 2015;10:e0143396(査読有).
- Furuta C, Miyamoto T, Takagi T, Noguchi Y, Kaneko J, Itoh S, Watanabe T, Itoh F. Transforming growth factor- signaling enhancement by long-term exposure to hypoxia in a tumor microenvironment composed of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Sci* 2015;106:1524-1533(査読有).
- 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. *Cardiovasc Res* 2016;110:118-128(査読有).

6. Naito C, Hashimoto M, Watanabe K, Shirai R, Takahashi Y, Kojima M, Watanabe R, Sato K, Iso Y, Matsuyama T, Suzuki H, Ishibashi-Ueda H, Watanabe T. Facilitatory effects of fetuin-A on atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2016; 246:344-351(査読有).
7. Kohashi K, Hiromura M, Mori Y, Terasaki M, Watanabe T, Kushima H, Shinmura K, Tomoyasu M, Nagashima M, Hirano T. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor but not incretins suppresses abdominal aortic aneurysms in angiotensin II-infused apolipoprotein E-null mice. *J Atheroscler Thromb* 2016;23:441-454 (査読有).
8. Watanabe R, Watanabe H, Takahashi Y, Kojima M, Konii H, Watanabe K, Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Iso Y, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Atheroprotective effects of tumor necrosis factor-stimulated gene-6. *JACC Basic to Transl Sci* 2016;6:494-509 (査読有).
9. Yamamoto K, Tajima Y, Hasegawa A, Takahashi Y, Kojima M, Watanabe R, Sato K, Shichiri M, Watanabe T. Contrasting effects of stanniocalcin-related polypeptides on macrophage foam cell formation and vascular smooth muscle cell migration. *Peptides* 2016;82:120-127(査読有).
10. Hiromura M, Mori Y, Kohashi K, Terasaki M, Shinmura K, Negoro T, Kawashima H, Kogure M, Wachi T, Watanabe R, Sato K, Kushima H, Tomoyasu M, Nakano Y, Yamada Y, Watanabe T, Hirano T. Suppressive effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide on cardiac hypertrophy and fibrosis in angiotensin II-infused mouse models. *Circ J* 2016;80:1988-1997(査読有).
11. Mori S, Yamada H, Noguchi Y, Miyakawa T, Morikawa R, Watanabe T, Takasu M. Analysis of interaction between GLP-1 and bilayer. *Pept Sci* 2016;2015:339-342 (査読無).
12. Sato K, Shirai R, Hontani M, Shinooka R, Hasegawa A, Kichise T, Yamashita T, Yoshizawa H, Watanabe R, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Potent vasoconstrictor kisspeptin-10 induces atherosclerotic plaque progression and instability: reversal by its receptor GPR54 antagonist. *J Am Heart Assoc* 2017;6:e005790(査読有).
13. Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, Kohashi K, Kushima H, Ohara M, Watanabe T, Andersson O, Hirano T. Combination therapy with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor and a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor additively suppresses macrophage foam cell formation and atherosclerosis in diabetic mice. *Int J Endocrinol* 2017; 2017:1365209(査読有).
14. Watanabe T, Watanabe-Kominato K, Takahashi Y, Kojima M, Watanabe R. Adipose tissue-derived omentin-1 function and regulation. *Compr Physiol* 2017, in press (査読有).
- [学会発表](計 27 件)
1. Watanabe R, Watanabe K, Shirai R, Konii H, Sato K, Watanabe T. Preventive effects of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 on atherosclerosis. 87th Scientific Sessions of the American Heart Association, 2014/11, Chicago, Illinois, USA.
2. 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. 88th Scientific Sessions of the American Heart Association, 2015/11, Orland, Florida, USA.
3. Shirai R, Sato K, Watanabe K, Watanabe R, Matsuyama T, Koba S, Hirano T, Watanabe T. Preventive effects of neopterin on atherosclerosis. 88th Scientific Sessions of the American Heart Association, 2015/11, Orland, Florida, 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. 88th Scientific Sessions of the American Heart Association, 2015/11, Orland, Florida, USA.
5. Watanabe T, Watanabe R, Takahashi Y, Kojima M, Watanabe K, Shirai R, Sato K, Iso Y, Matsuyama T. Stimulatory effects of fetuin-A on atherosclerosis. 65th Annual Scientific Sessions of the American College of Cardiology, 2016/4, Chicago, Illinois, USA.
6. Sato K, Shirai R, Yamashita T, Yoshizawa H, Matsuyama T, Koba S, Watanabe T. A potent vasoconstrictor kisspeptin-10 accelerates atherosclerotic plaque progression and instability. 65th Annual Scientific Sessions of the American College of Cardiology, 2016/4, Chicago, Illinois,

- USA.
7. Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Koba S, Watanabe R, Watanabe K, Watanabe T. Counteractive effects of neopterin on atherosclerosis (The Best Poster Award). 65th Annual Scientific Sessions of the American College of Cardiology, 2016/4, Chicago, Illinois, USA.
 8. Hiromura M, Mori Y, Kohashi K, Terasaki M, Shinmura K, Kushima H, Tomoyasu M, Yamada Y, Watanabe T, Hirano T. Suppressive effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide on cardiac hypertrophy and fibrosis in angiotensin II-infused mouse models. 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 2016/6, New Orleans, Louisiana, USA.
 9. Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Koba S, Watanabe R, Watanabe K, Hirano T, Watanabe T. Neopterin reacts against vascular inflammatory and atherosclerosis. 38th Congress of the European Society of Cardiology, 2016/8, Roma, Italy.
 10. Watanabe R, Takahashi Y, Kojima M, Shirai R, Sato K, Watanabe T. Atheroprotective effects of tumor necrosis factor-stimulated gene-6. 66th Annual Scientific Sessions of the American College of Cardiology, 2017/3, Washington, D.C., USA.
 11. Watanabe R, Sato K, Watanabe H, Konii H, Hasegawa A, Yamamoto K, Watanabe T. Preventive effects of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 on atherosclerosis. 第 46 回 日本動脈硬化学会学術集会、2014/7、東京。
 12. 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 日本動脈硬化学会学術集会、2015/7、仙台。
 13. Shirai R, Sato K, Watanabe K, Watanabe R, Hirano T, Watanabe T. Suppressive effects of neopterin on atherosclerosis (優秀ポスター賞). 第 47 回 日本動脈硬化学術集会、2015/7、仙台。
 14. 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 日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2014/11、横浜。
 15. 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。
 16. 森咲季子、山田寛尚、野口瑤、宮川毅、森河良太、渡部琢也、高須昌子。GLP-1 の構造変化に関する分子動力学シミュレーション。日本物理学会 2015 年秋季大会、2015/9、大阪。
 17. 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 日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2015/12、神戸。
 18. 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 日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2015/12、神戸。
 19. Kojima M, Watanabe R, Watanabe K, Takahashi Y, Sato K, Mori Y, Hirano T, Watanabe T. Preventive effects of catestatin on atherosclerosis. 第 48 回 日本動脈硬化学会学術集会、2016/7、東京。
 20. Yoshizawa H, Sato K, Shirai R, Yamashita T, Matsuyama T, Koba S, Hirano T, Watanabe T. Preventive effects of chemerin on atherosclerosis. 第 48 回 日本動脈硬化学会学術集会、2016/7、東京。
 21. Takahashi Y, Watanabe R, Watanabe K, Kojima M, Shirai R, Sato K, Watanabe T. Preventive effects of osmotin on atherosclerosis. 第 48 回 日本動脈硬化学術集会、2016/7、東京。
 22. 森咲季子、山田寛尚、野口瑤、宮川毅、森河良太、渡部琢也、高須昌子。生体膜環境下の GLP-1 の分子動力学シミュレーション。日本物理学会 2016 年秋季大会、2016/9、金沢。
 23. 渡部麗奈、高橋由衣、小島美穂、小湊夏帆、白井玲美奈、佐藤健吾、松山高明、木庭新治、平野勉、渡部琢也。Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6) の動脈硬化抑制作用。第 20 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2016/12、東京。
 24. 山下智之、白井玲美奈、佐藤健吾、渡部琢也。Adropin の動脈硬化抑制作用。第 20 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2016/12、東京。
 25. 高橋由衣、渡部麗奈、小湊夏帆、小島美穂、白井玲美奈、佐藤健吾、渡部琢也。新規植物ペプチド Osmotin の動脈硬化予防作用。第 20 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2016/12、東京。
 26. 小島美穂、渡部麗奈、小湊夏帆、高橋由衣、佐藤健吾、森雄作、平野勉、渡部琢也。Catestatin の動脈硬化抑制作用。第 20 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2016/12、東京。
 27. 白井玲美奈、渡部琢也。血管炎症および動脈硬化に対する Neopterin の抑制作用。

第 23 回 動脈硬化若手研究会、2016/10、
東京。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 琢也 (WATANABE, Takuya)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：3 0 2 9 7 0 1 4

(2) 研究分担者

木庭 新治 (KOBAYASHI, Shinji)
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号：2 0 2 7 6 5 4 6

磯 良崇 (ISO, Yoshitaka)
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号：6 0 3 8 4 2 4 4
(平成 28 年度より連携研究者)

佐藤 健吾 (SATO, Kengo)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：7 0 5 4 9 9 3 0