

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461143

研究課題名(和文)新規アディポサイトカイン「オメンチン」を標的とした血管病制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of omentin in the vascular disease

研究代表者

柴田 玲 (Shibata, Rei)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：70343689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満症を中心とした代謝異常、心血管病の病態には、種々のアディポカインの産生異常が関わっている。オメンチンは新たに見出されたアディポカインで、その血中濃度は、肥満症や冠動脈疾患において低値を示す。我々は、本研究の中で、オメンチン過剰発現マウスやアポリポ蛋白E欠損マウスを用いたアプローチにて、オメンチンの血管リモデリング抑制作用や動脈硬化抑制作用を見出した。また、オメンチンが、冠動脈疾患患者で、血中濃度低下と心臓周囲脂肪での発現増加を示すことを見出した。以上から、オメンチンは心血管病に対するバイオマーカーとして有用性のみならず、今後、治療への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue functions as an endocrine organ by secreting adipokines that can directly affect nearby or remote organs. Omentin is an adipokine whose concentration is down-regulated in subjects with obesity-related disorders. Low levels of circulating omentin appear to associate with the increased prevalence of obesity-linked vascular diseases including atherosclerosis. In our study, we have shown that omentin exerts beneficial effects on the vascular disease by directly acting on the component cells in the blood vessel. The therapeutic approaches aimed at increasing circulating omentin levels could be valuable for prevention or treatment of cardiovascular diseases.

研究分野：循環機内科学

キーワード：オメンチン 動脈硬化 血管リモデリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満症は高率に糖尿病、脂質異常症、高血圧を合併する生活習慣病の重要な発症基盤である。これらの動脈硬化危険因子が蓄積する事により、重篤な心血管疾患を発症させる。しかし、その発症機序は未だ十分に明らかではない。近年、脂肪細胞は数多くのホルモンを産生し分泌する内分泌臓器であるという概念が確立し、現在では、アディポネクチン、レプチン、TNF- α 、レジスチンをはじめとする数多くの脂肪細胞由来因子(アディポカイン)と病態との関連が明らかとなりつつある。

(2) 申請者らは、機能未知であるアディポカインの同定と機能解析に関わる研究プログラムを開始し、ヒト内臓脂肪の発現遺伝子解析にて、内臓脂肪に高発現しているクローンを見だし、解析した。その結果、このクローンは分泌蛋白をコードするレクチンの一種であるオメンチンと同一であった。オメンチンは内臓脂肪に高発現しており、肥満者や糖尿病患者において、その血中濃度が低値を示すことが報告されている。しかしながら、オメンチンの生理機能についてはほとんど解明されておらず、特に血管病に対する作用についてはまったく知られていなかった。

(3) 申請者らは、メタボリックシンドロームの構成因子の数が多いほどオメンチン血中濃度が減少していること、オメンチンの血中濃度が、動脈硬化のサロゲートマーカーである頸動脈内中膜複合体厚度(IMT)と逆相関関係を示し、冠動脈疾患患者で有意に低下している事を見いだした(*Diabetol Metab Syndr.* 2012, *Hypertens Res.* 2011, *Atherosclerosis.* 2011)。血管内皮細胞では、オメンチンタンパクの添加が管腔形成能促進やAkt/eNOSの活性化を引き起こす事、アデノウイルスを用いたオメンチン過剰発現が、マウス下肢虚血モデル作成後の血管新生増強作用を示すことを明らかとした(*J Biol Chem.* 2012)。これらの結果は、低オメンチン血症が、動脈硬化をはじめとした心血管病患者におけるリスクファクターである可能性を示唆している。

2. 研究の目的

新規アディポカイン「オメンチン」の血管病における役割を個体レベル、細胞レベルで解明し、その臨床的意義を明らかにする。具体的には以下の3点を中心に明らかとしていく。

(1) 血管リモデリングに対するオメンチンの作用解明。(2) 血管構成細胞に対するオメンチンの作用とシグナル伝達機構の解明。(3) 動脈硬化におけるオメンチンの臨床的意義の解明。

3. 研究の方法

以下の3点に留意しながら、検討を進めた。

(1) 血管リモデリングに対するオメンチンの作用解明: 血管傷害後の新生内膜増殖に対するオメンチンの効果を検討する。アデノウイルス発現系を用いてオメンチンを投与後の野生型マウス、あるいは、野生型マウスとオメンチン過剰発現マウスに対して、0.38mmのステールワイヤーで大腿動脈に傷害を加える事により、ワイヤー血管障害モデルを作製する。また、動脈硬化を自然発症するアポリポ蛋白 E(ApoE)欠損マウスとオメンチン過剰発現マウスを交配することにより、オメンチンの動脈硬化に対する効果を検討する。

(2) 血管構成細胞に対するオメンチンの作用とシグナル伝達機構の解明: 血管平滑筋細胞やマクロファージを用いて、リコンビナントオメンチン蛋白の添加後に細胞の表現型(アポトーシス、増殖性反応、炎症性反応など)とシグナル伝達経路を明らかにする。

(3) 動脈硬化におけるオメンチンの臨床的意義の解明: 虚血性心疾患患者を対象にオメンチン濃度を測定し、臨床的意義を検討する。

4. 研究成果

(1) 血管リモデリングに対するオメンチンの作用解明

野生型マウスに対して、血管傷害モデルを作成し、アデノウイルスベクターを用いて、ヒトオメンチンの過剰発現を行った。オメンチンの過剰発現は、血管傷害後の平滑筋細胞増殖抑制作用や内皮細胞脱落後の修復促進作用を有した。この結果、血管傷害後の新生内膜肥厚を有意に抑制した。また、aP2プロモーターを用いた脂肪組織特異的なヒトオメンチン過剰発現マウスを用いた検討では、ヒトオメンチン過剰発現マウスは、コントロールマウスと比し血管傷害後の新生内膜増生が有意に抑制されていた(FASEB J, 2015) (下図)。

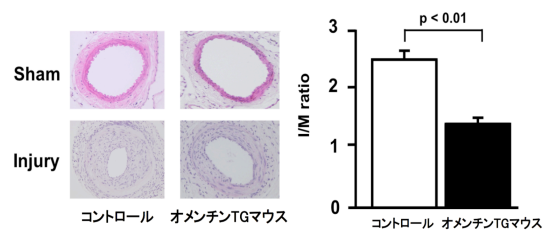


図: ヒトオメンチン過剰発現マウス(オメンチン TG マウス)を用いて、血管傷害モデルを作成。(左) HE 染色による血管組織標本。(右) 定量化(I/M ratio: 内膜/中膜比)のグラフ。

次に、ヒトオメンチン過剰発現マウスを動脈硬化モデルであるアポリポ蛋白 E 欠損マウスと交配させ、アポリポ蛋白 E 欠損オメンチントランスジェニックマウス(apoE-KO/OMT-Tg マウス)を作成した。その

結果、オメンチンの過剰発現は、アポ E 欠損マウスの動脈硬化巣の形成を有意に抑制した (Cardiovasc Res, 2015) (下図)。また、動脈硬化巣におけるマクロファージの発現が抑制されており、大動脈における炎症関連遺伝子 TNF- α , IL-6, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 の発現も減弱していた。

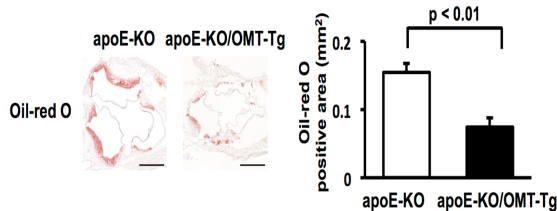
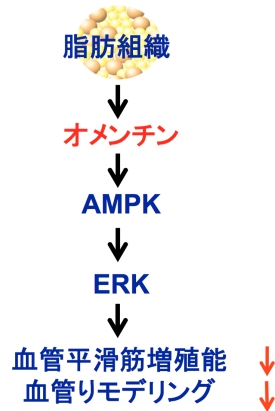


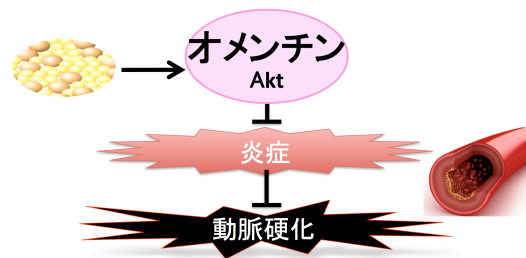
図: ヒトオメンチン過剰発現マウスを動脈硬化モデルであるアポリポ蛋白 E 欠損マウスと交配させ、アポリポ蛋白 E 欠損オメンチントランスジェニックマウス (apoE-KO/OMT-Tg マウス) を作成。(左) Oil-red O 染色による血管組織標本。(右) 定量化のグラフ。

(2) 血管構成細胞に対するオメンチンの作用とシグナル伝達機構の解明

血管平滑筋細胞を用いた検討では、オメンチンは、平滑筋細胞の増殖や遊走能、ERKのリン酸化を抑制した。オメンチン添加により、AMPKのリン酸化が認められ、オメンチンの平滑筋細胞増殖抑制作用やリン酸化ERKの活性抑制作用は、ドミナントネガティブAMPKによる前処置にて解除された。このように、血管平滑筋細胞におけるオメンチンの効果は、AMPKを介していた (右図)。



ヒトマクロファージへのオメンチンの添加は、マクロファージの泡沫化抑制やコレステリルエステル含有量の減少、スカベンジャー受容体 (SRA, CD36) の発現減少を引き起こした。また、オメンチンの添加は、LPSにより誘導された炎症性サイトカインの発現が抑制され、NF- κ Bのリン酸化も減少した。マクロファージに対するオメンチン添加は、Aktのリン酸化を引き起こし、オメンチンのマクロファージにおける抗炎症効果は、ドミナントネガティブAktの前処置にて解除された。このように、オメンチンのマクロファージにおける抗炎症作用には、Aktシグナルが関与していた (右上図)。



(3) 動脈硬化におけるオメンチンの臨床的意義の解明

冠動脈疾患患者と非冠動脈疾患患者の2群間にて、心臓周囲脂肪におけるオメンチンの発現レベルおよびオメンチン血中濃度を比較検討した。その結果、冠動脈疾患患者では、非冠動脈疾患患者と比べ、オメンチン血中濃度が低下していた。反対に、心臓周囲脂肪でのオメンチンの発現は、増加していた (Atherosclerosis, 2016) (下図)。

Clinical data of the study patients.

	CAD (n = 15)	non-CAD (n = 10)	p value
Biochemical markers			
Triglyceride (mg/dL)	133 (97, 142)	115 (75, 129)	0.405
HDL-cholesterol (mg/dL)	47.0 (44, 52)	46.5 (33, 58)	0.950
LDL-cholesterol (mg/dL)	126 (108, 147)	87 (74, 122)	0.008
Hemoglobin A _{1c} (%)	5.8 (5.2, 6.6)	5.7 (5.1, 6.6)	0.828
BNP (pg/mL)	174 (20, 413)	401 (43, 738)	0.076
hs-CRP (mg/L)	1.10 (0.50, 2.20)	0.55 (0.40, 0.75)	0.675
Adipocytokines			
Omentin in EAT	1.25 (1.10, 2.85)	0.76 (0.71, 0.89)	0.002
Omentin in SCAT	1.03 (0.71, 2.14)	0.86 (0.64, 1.53)	0.267
Plasma omentin (ng/mL)	323 (225, 553)	630 (325, 954)	0.025
Abdominal visceral fat area (cm ²)	81.8 (61, 125)	77.0 (62, 114)	0.401
Epicardial fat volume (mL)	95.8 (78, 139)	81.6 (68, 117)	0.045

Data are presented as median with interquartile of patients as indicated.

p values were determined by Student's t test or Mann-Whitney U test, with those less than 0.05 being highlighted in bold.

LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; BNP, brain natriuretic peptide; CRP, C-reactive protein; EAT, epicardial adipose tissue; SCAT, subcutaneous adipose tissue.

(4) まとめ

肥満症に伴う動脈硬化の病態には、種々のアディポカインの産生異常が関わっている。特にアディポネクチンは抗動脈硬化作用、心血管保護作用を有し、その血中濃度は肥満症、動脈硬化症を始めとする生活習慣病で低下していることが知られている。近年では、アディポネクチンに加え、血管保護的な作用を有している可能性が高いと思われるアディポカインがいくつか見出され、その機能解析がすすんでいる。オメンチンもその一つである。今後、オメンチンの更なる機能解析や発現作用調節機構が明らかになることで、肥満症やそれに伴う動脈硬化/心血管病の包括的理解と治療法の開発につながると考えられる。

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 25 件)

原著 (英文)

1. Harada K, Shibata R, Ouchi N, Tokuda Y, Funakubo H, Suzuki M, Kataoka T, Nagao T, Okumura S, Shinoda N, Kato B, Sakai S, Kato M,

- Marui N, Ishii H, Amano T, Matsubara T and Murohara T. Increased expression of the adipocytokine omentin in the epicardial adipose tissue of coronary artery disease patients. *Atherosclerosis*. 251:299-304, 2016. (査読有)
2. Hiramatsu-Ito M, Shibata R (責任著者), Ohashi K, Uemura Y, Kanemura N, Kambara T, Enomoto T, Yuasa D, Matsuo K, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Otaka N, Kihara S, Murohara T and Ouchi N. Omentin attenuates atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 110:107-17, 2016. (査読有)
3. Hayakawa S, Ohashi K, Shibata R, Takahashi R, Otaka N, Ogawa H, Ito M, Kanemura N, Hiramatsu-Ito M, Ikeda N, Murohara T and Ouchi N. Association of Circulating Follistatin-Like 1 Levels with Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Healthy Men. *PLoS One*. 11:e0153619, 2016. (査読有)
4. Yuasa D, Ohashi K, Shibata R, Mizutani N, Kataoka Y, Kambara T, Uemura Y, Matsuo K, Kanemura N, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Ito M, Ogawa H, Murate T, Murohara T and Ouchi N. C1q/TNF-related protein-1 functions to protect against acute ischemic injury in the heart. *FASEB J*. 30:1065-75, 2016. (査読有)
5. Yamaguchi S, Shibata R (責任著者), Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Tanigawa T, Ueda M, Murohara T and Yamamoto A. Dental pulp-derived stem cell conditioned medium reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion. *Sci Rep*. 5:16295, 2015. (査読有)
6. Tanigawa T, Shibata R (責任著者), Kondo K, Katahira N, Kambara T, Inoue Y, Nonoyama H, Horibe Y, Ueda H and Murohara T. Soybean beta-Conglycinin Prevents Age-Related Hearing Impairment. *PLoS One*. 10:e0137493, 2015. (査読有)
7. Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, Uemura Y, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Kanemura N, Ito M, Ogawa H, Daida H, Murohara T and Ouchi N*. Neuron-derived neurotrophic factor ameliorates adverse cardiac remodeling after experimental myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 8:342-51, 2015. (査読有)
8. Kambara T, Shibata R (責任著者), Ohashi K, Matsuo K, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Aprahamian T, Walsh K, Murohara T and Ouchi N. C1q/Tumor Necrosis Factor-Related Protein 9 Protects against Acute Myocardial Injury through an Adiponectin Receptor I-AMPK-Dependent Mechanism. *Mol Cell Biol*. 35:2173-85, 2015. (査読有)
9. Matsuo K, Shibata R (責任著者), Ohashi K, Kambara T, Uemura Y, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Joki Y, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Kihara S, Murohara T and Ouchi N. Omentin functions to attenuate cardiac hypertrophic response. *J Mol Cell Cardiol*. 79:195-202, 2015. (査読有)
10. Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Ito M, Matsuo K, Kambara T, Uemura Y, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Kanemura N, Ogawa H, Daida H, Murohara T and Ouchi N. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 459:124-30, 2015. (査読有)
11. Takahashi N, Shibata R, Takahashi N, Ouchi N, Maehara Y, Murohara T, Komori K. Metformin stimulates ischemia-induced revascularization through an eNOS dependent pathway in the ischemic hindlimb mice model. *J Vasc Surg*. 61:489-96, 2015. (査読有)
12. Hayakawa S, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Miyabe M, Enomoto T, Joki Y, Shimizu Y, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Matsuo K, Hiramatsu-Ito M, van den Hoff M, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. Cardiac myocyte-derived follistatin-like 1 prevents renal injury in a subtotal nephrectomy model. *J Am Soc Nephrol*. 26:636-46, 2015. (査読有)
13. Uemura Y, Shibata R (責任著者), Kanemura N, Ohashi K, Kambara T, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Joki Y, Matsuo K, Ito M, Hayakawa S, Ogawa H, Murohara T, Ouchi N. Adipose-derived protein omentin prevents neointimal formation after arterial injury. *FASEB J*. 29:141-51, 2015. (査読有)
14. Kataoka Y, Shibata R (責任著者), Ohashi K, Kambara T, Enomoto T, Uemura Y, Ogura Y, Yuasa D, Matsuo K, Nagata T, Oba T, Yasukawa H, Numaguchi Y, Sone T, Murohara T and Ouchi N. Omentin Prevents Myocardial Ischemic Injury Through AMP-Activated Protein Kinase- and Akt-Dependent Mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 63:2722-33, 2014. (査読有)
15. Ishii M, Shibata R (責任著者), Shimizu Y, Yamamoto T, Kazuhisa K, Yoko I, Ouchi N, Tanigawa T, Kanemura N, Ito A, Honda H, Murohara T. Multilayered adipose-derived regenerative cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 175(3):545-53, 2014. (査読有)
16. Watanabe Y, Shibata R (責任著者), Ouchi N, Kambara T, Ohashi K, Jie L, Inoue Y, Murohara T, Komori K. Adiponectin ameliorates endotoxin-induced acute cardiac injury. *Biomed Res Int*. 382035, 2014. (査読有)
17. Ishii M, Shibata R (責任著者), Kondo K, Kambara T, Shimizu Y, Tanigawa T, Bando YK, Nishimura M, Ouchi N, Murohara T. Vildagliptin Stimulates Endothelial Cell Network Formation and Ischemia-induced Revascularization via an Endothelial Nitric-oxide Synthase-dependent Mechanism. *J Biol Chem*. 289(39):27235-45, 2014. (査読有)

18. Miyabe M, Ohashi K, Shibata R, Uemura Y, Ogura Y, Yuasa D, Kambara T, Kataoka Y, Yamamoto T, Matsuo K, Joki Y, Enomoto T, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Ito M, Van Den Hoff MJ, Walsh K, Murohara T and Ouchi N. Muscle-derived follistatin-like 1 functions to reduce neointimal formation after vascular injury. *Cardiovasc Res*. 103:111-20,2014. (査読有)
19. Ohashi K, Enomoto T, Joki Y, Shibata R, Ogura Y, Kataoka Y, Shimizu Y, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Murohara T and Ouchi N. Neuron-derived neurotrophic factor functions as a novel modulator that enhances endothelial cell function and revascularization processes. *J Biol Chem*. 289:14132-44,2014. (査読有)
20. Yuasa D, Ohashi K, Shibata R, Takeshita K, Kikuchi R, Takahashi R, Kataoka Y, Miyabe M, Joki Y, Kambara T, Uemura Y, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Ito M, Ikeda N, Murohara T and Ouchi N. Association of Circulating C1q/TNF-Related Protein 1 Levels with Coronary Artery Disease in Men. *PLoS One*. 9:e99846,2014. (査読有)
21. Tanigawa T, Shibata R (責任著者), Ouchi N, Kondo K, Ishii M, Katahira N, Kambara T, Inoue Y, Takahashi R, Ikeda N, Kihara S, Ueda H and Murohara T. Adiponectin deficiency exacerbates age-related hearing impairment. *Cell Death Dis*. 5:e1189,2014. (査読有)

総説 (英文)

1. Ouchi N, Ohashi K, Shibata R and Murohara T. Protective Roles of Adipocytokines and Myokines in Cardiovascular Disease. *Circ J*. 2016. (査読有)
2. Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Murohara T and Ouchi N. Adiponectin as a Target in Obesity-related Inflammatory State. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 15:145-50,2015. (査読有)
3. Ohashi K, Shibata R, Murohara T and Ouchi N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 25:348-355,2014. (査読有)
4. Shibata R (責任著者), Ohashi K, Murohara T and Ouchi N. The potential of adipokines as therapeutic agents for cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 25(4):483-7,2014. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

国際学会

シンポジウム

1. Shibata R, Murohara T: Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia by implantation of adipose-derived regenerative cells, The 26th Annual Scientific Meeting of Indonesian Heart Association, Apr 22, 2017 Jakarta (Indonesian)
2. Shibata R: Therapeutic angiogenesis for critical

limb ischemia by implantation of adipose-derived regenerative cells, The 10th Oriental Congress of Cardiology, May 27, 2016 Shanghai (China)

国内学会

シンポジウム

1. 柴田玲、大内乗有、室原豊明: オメンチンの心血管病における役割: 第88回日本薬理学会年会: 2015年3月18日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
2. 柴田玲、大内乗有、室原豊明: C1q/TNF-related protein 9 actions in the cardiovascular system: 第79回日本循環器学会学術集会: 2015年4月24日 ABCホール (大阪府大阪市)
3. 柴田玲、室原豊明: 炎症と再生におけるアディポサイトカインの役割: 第14回日本抗加齢医学会総会: 2014年6月6日 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 分子改変体アディポネクチン及び分子改変体アディポネクチンを含む医薬組成物
 発明者: 柴田玲 室原豊明 上藤洋敬 新川武 瀬脇智満 岩田効志
 権利者: 名古屋大学
 種類: 特許
 番号: 2016-192912 (JP)
 出願年月日: 2016年9月30日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: iPS細胞由来血管前駆細胞シート及びその作成方法
 発明者: 室原豊明、本多裕之、柴田玲、石井正和、鬼頭哲太郎、鈴木博彦
 権利者: 名古屋大学
 種類: 特許
 番号: 特許第6048839号
 取得年月日: 2015年6月17日
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

1. 内臓脂肪って健康に悪いだけじゃないの?: ATグループ健康保険組合けんぽだより: 2016年1月号: 研友企画出版: P3
2. 長生きホルモンは脂肪細胞が分泌していた: 雑誌NHKためしてガッテン: 2016春Vol.30号 2016年3月16日
3. 壁に張りつくだけで血糖値がスルッと下がる: 健康: 2016年8月号: P145-153

4. 脂肪から下肢の血管新生、実現へ
着々:m3.com:2016年10月12日配信

市民公開講座等

1. 究極のアンチエイジング 医学の実践—
メタボを学んで歯も健康に:第32回年次大会
市民フォーラム(日本臨床歯周病学会):2014
年6月21日 名古屋国際会議場
2. 暮らしの中のアンチエイジング-長寿ホル
モンの秘密:日本食品安全協会市民公開講
座:2016年6月12日 関西大学千里山キャン
パス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 玲 (SHIBATA REI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
寄附講座准教授
研究者番号:70343689

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

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