

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461384

研究課題名(和文) 心血管・代謝疾患における分泌型および異所性発現型脂肪酸結合タンパクの役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of secreted form and ectopic expression of fatty acid-binding proteins in cardiovascular and metabolic diseases

研究代表者

古橋 真人 (Furuhashi, Masato)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20563852

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)：脂肪細胞とマクロファージに発現する脂肪酸結合タンパク4 (FABP4)の分泌・作用機構について検討を行った。FABP4はシグナルペプチドがないものの脂肪分解に関連して脂肪細胞から分泌され、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージにおいてFABP4濃度依存性に炎症を惹起し、動脈硬化形成に関連した。また、血清FABP4濃度はインスリン抵抗性や動脈硬化のみならず、心臓拡張能障害やコレステロール代謝に関連するPCSK9濃度と独立して関連し、各種薬剤の投与により有意に低下した。さらに、血管傷害マウスを用いた検討から、FABP4が血管内皮細胞に異所性発現し、新生内膜形成に関連を認めた。

研究成果の概要(英文)：Fatty acid-binding protein 4 (FABP4) is expressed in adipocytes and macrophages. Here we investigated the mechanism of secretion of FABP4 and its functions. FABP4 was secreted from adipocytes despite of the lack of signal peptides. Treatment with FABP4 promoted inflammation in a dose-dependent manner, leading to the development of atherosclerosis. FABP4 concentration was independently associated with not only insulin resistance and atherosclerosis but also cardiac diastolic dysfunction and PCSK9 level. Several drugs, including angiotensin II receptor blockers, a DPP-4 inhibitor, and EPA/DHA, significantly decreased FABP4 levels. Furthermore, ectopic expression of FABP4 was observed in wire-injured endothelial cells, which was associated with neointima formation.

研究分野：循環器、代謝

キーワード：脂肪酸結合タンパク 脂肪細胞 炎症 インスリン抵抗性 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸結合タンパク (Fatty Acid-Binding Protein: FABP)にはこれまでに少なくとも9つのアイソフォームが同定されている (Furuhashi M, et al. *Nat Rev Drug Discov* 2008)。一般に *in vitro* の検討から FABP は細胞内への脂肪酸の取り込みや酸化能および脂肪酸の細胞内輸送に関与すると推測されているが、それぞれのアイソフォームの生体内での機能は明らかにされてはいなかった。近年のノックアウトおよびトランスジェニックモデルの検討から、FABP の生体内での機能が明らかにされつつある。

FABP ファミリーのうち、FABP4 (A-FABP/aP2) は脂肪細胞に非常に高発現しており、脂肪組織における全可溶性タンパクの約 1% を占める。この他、FABP4 がマクロファージにも発現 (脂肪細胞の約 1/10,000 程度) していることが示されている。FABP4 の欠損により高脂肪食負荷あるいは遺伝性肥満モデルにおいてインスリン抵抗性が改善し、動脈硬化モデルにおいてはマクロファージにおける炎症反応の減少と泡沫化の抑制が認められる (Furuhashi M, et al. *Nat Rev Drug Discov* 2008; Furuhashi M, et al. *Int J Inflam* 2011)。我々は、骨髄移植や共培養実験から FABP4 が脂肪細胞とマクロファージにおいて代謝・炎症反応を統合して、インスリン抵抗性と動脈硬化の両者の形成と関連することを見いだした (Furuhashi M, et al. *J Clin Invest* 2008; Maeda K, et al. *Cell Metab* 2005)。さらに、製薬会社との共同研究で FABP4 特異的阻害薬を開発し、マウスにおいてこの阻害薬が糖尿病および動脈硬化を改善させることを明らかにし、新規カテゴリーの治療薬となりうることを示した (Furuhashi M, et al. *Nature* 2007)。

2. 研究の目的

脂肪酸結合タンパク FABP4 (A-FABP/aP2) は脂肪細胞とマクロファージの細胞内において代謝・炎症反応を司り、インスリン抵抗性と動脈硬化の両者と関連することが示されている。最近、シグナルペプチドを持たないものの FABP4 が脂肪細胞から分泌されることが報告され、疫学的な検討から FABP4 の血中濃度がメタボリックシンドロームの病態と関連する可能性が示されたが、FABP4 の分泌機構や血中で FABP4 が生理的活性を持つかどうかについては不明な点が多い。さらに、細胞老化や血管傷害により血管内皮細胞にも FABP4 が異所性に発現することが示されたが、その機序や病態的意義についても明らかではない。本研究の目的は分泌型 FABP4 および異所性 FABP4 発現の心血管・代謝疾患における役割について包括的に解明することである。

3. 研究の方法

分泌型 FABP4 の意義や制御機構を解明するために、リコンビナント FABP4 や中和抗体を各種マウスモデル (糖尿病、動脈硬化、高血圧) に投与して効果を判定する。また、脂肪細胞、マクロファージ、Mutant FABP4 を強制発現させた細胞からの FABP4 分泌の制御を様々な薬剤を用いて検討する。さらに、当教室で 35 年以上継続している疫学調査 (端野・壮警町研究) や臨床のサンプルを用いて、血中 FABP4 濃度の意義や病態との関連を検討する。血管内皮細胞における異所性発現型 FABP4 の意義を解明するために、野生型および FABP4 欠損マウスで血管傷害モデルを作成して、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージ、脂肪組織における FABP4 や炎症マーカーの発現と病態との関連について検討する。また、FABP4 阻害薬投与の効果を検討する。FABP4 を過剰発現 / ノックダウンした血管内皮細胞と各種細胞間の共培養実験で相互作用を検討する。

4. 研究成果

1. 分泌型 FABP4 の生理的機能を解明するために、マウスに FABP4 リコンビナントタンパクを投与したところインスリン抵抗性を生じた。一方、高脂肪食マウスに FABP4 中和抗体を投与したところインスリン抵抗性が改善した。FABP4 がアディポカインとして作用することが確認された。
2. FABP4 分泌機序の解明のために、3T3-L1 脂肪細胞からの FABP4 分泌の制御を様々な薬剤 (インスリン、グルコース、脂肪酸、受容体作動薬など) を用いて検討したところ、脂肪分解とともに FABP4 が分泌されることを見出した。また、マクロファージからも FABP4 が分泌されることを確認した。
3. 心臓周囲脂肪組織内の冠動脈狭窄部のプラーク内のマクロファージおよび心臓周囲の脂肪組織内の脂肪細胞とマクロファージに FABP4 の発現が確認された。FABP4 リコンビナントタンパクを血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージに投与したところパルミチン酸の有無で作用の違いが認められた。さらに、パルミチン酸存在下で、FABP4 濃度依存性に炎症惹起が認められた。
4. 野生型マウスで血管傷害モデルを作成したところ、再生された血管内皮細胞に異所性に FABP4 が発現することを確認した。また、血管傷害後の新生内膜の形成は、野生型マウスに比して、有意に FABP4 欠損マウスで低下していた。
5. 疫学調査 (端野・壮警町研究) や臨床のサンプル (心臓カテーテル検査、糖負荷試験、ファーストフード食負荷試験、降圧薬・抗脂質異常薬・抗糖尿病薬投与前後の血

清) を用いて、血清 FABP4 濃度を検討したところ、心エコーで評価した心臓の拡張能障害と関連することを見出した。また、コレステロール代謝に関連する PCSK9 の血中濃度と独立して関連することを見出した。さらに、急性的には糖負荷や高脂肪食負荷により経時的に FABP4 濃度が低下することや慢性的にはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬、DPP4 阻害薬、EPA/DHA 製剤の投与により FABP4 濃度が低下することを見出した。

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 16 件)

1. Furuhashi M, Ogura M, Matsumoto M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Omori A, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Harada-Shiba M, Shimamoto K, Miura T. Serum FABP5 concentration is a potential biomarker for residual risk of atherosclerosis in relation to cholesterol efflux from macrophages. *Sci Rep* 7: 217, 2017 (査読有)
2. Furuhashi M, Hiramitsu S, Mita T, Omori A, Fuseya T, Ishimura S, Watanabe Y, Hoshina K, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Ishii J, Miura T. Reduction of circulating FABP4 level by treatment with omega-3 fatty acid ethyl esters. *Lipids Health Dis* 15: 15, 2016 (査読有)
3. Furuhashi M, Fuseya T, Murata M, Hoshina K, Ishimura S, Mita T, Watanabe Y, Omori A, Matsumoto M, Sugaya T, Oikawa T, Nishida J, Kokubu N, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Sawada N, Shimamoto K, Miura T. Local production of fatty acid-binding protein 4 in epicardial/perivascular fat and macrophages is linked to coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 825-834, 2016 (査読有)
4. Furuhashi M, Matsumoto M, Hiramitsu S, Omori A, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Ishii J, Miura T. Possible increase in serum FABP4 level despite adiposity reduction by canagliflozin, an SGLT2 inhibitor. *PLoS ONE* 11: e0154482, 2016 (査読有)
5. Furuhashi M, Omori A, Matsumoto M, Kataoka Y, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Independent link between levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and FABP4 in a general population without medication. *Am J Cardiol* 118: 198-203, 2016 (査読有)
6. Yamamoto T, Furuhashi M, Sugaya T, Oikawa T, Matsumoto M, Funahashi Y, Matsukawa N, Gotoh M, Miura T. Transcriptome and metabolome analyses in exogenous FABP4- and FABP5-treated adipose-derived stem cells. *PLoS ONE* 11: e0167825, 2016 (査読有)
7. 古橋真人. 脂肪酸輸送と臓器障害～脂肪酸結合蛋白 4 (FABP4)を中心に. *The Lipid* 27: 23-31, 2016 (査読無)
8. Mita T, Furuhashi M, Hiramitsu S, Ishii J, Hoshina K, Ishimura S, Fuseya T, Watanabe Y, Tanaka M, Ohno K, Akasaka H, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. FABP4 is secreted from adipocytes by adenyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity* 23: 359-367, 2015 (査読有)
9. Furuhashi M, Mita T, Moniwa N, Hoshina K, Ishimura S, Fuseya T, Watanabe Y, Tanaka M, Yoshida H, Shimamoto K, Miura T. Angiotensin II receptor blockers decrease serum concentration of fatty acid-binding protein 4 in patients with hypertension. *Hypertens Res* 38: 252-259, 2015 (査読有)
10. Furuhashi M, Hiramitsu S, Mita T, Fuseya T, Ishimura S, Omori A, Matsumoto M, Watanabe Y, Hoshina K, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Ishii J, Miura T. Reduction of serum FABP4 level by sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Lipid Res* 56: 2372-2380, 2015 (査読有)
11. Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clin Med Insights Cardiol* 8(S3): 23-33, 2014 (査読有)
12. Fuseya T, Furuhashi M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Mita T, Ishimura S, Watanabe Y, Hoshina K, Tanaka M, Ohno K, Akasaka H, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Elevation of circulating fatty acid-binding protein 4 is independently associated with left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in a general population. *Cardiovasc Diabetol* 13: 126, 2014 (査読有)
13. Okazaki Y, Furuhashi M, Tanaka M, Mita T, Fuseya T, Ishimura S, Watanabe Y, Hoshina K, Akasaka H, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Miura T. Urinary excretion of fatty acid-binding protein 4 is associated with albuminuria and renal dysfunction. *PLoS ONE* 9: e115429, 2014 (査読有)
14. Tanaka M, Furuhashi M, Okazaki Y, Mita T, Fuseya T, Ohno K, Ishimura S, Yoshida H, Miura T. Ectopic expression of fatty acid-binding protein 4 in the glomerulus is associated with proteinuria and renal dysfunction. *Nephron Clin Pract* 128: 345-351, 2014 (査読有)

15. 古橋真人. 脂肪酸結合タンパク4とインスリン抵抗性. *Diabetes Frontier* 25: 83-91, 2014 (査読無)
16. 古橋真人, 伏屋敬博, 美田知宏. 脂肪酸結合タンパク質と動脈硬化. *最新医学* 69: 1658-1664, 2014 (査読無)

〔学会発表〕(計 26 件)

1. Furuhashi M, Omori A, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Independent link between levels of PCSK9 and FABP4 in a general population without medication. European Society of Cardiology Congress 2016, Rome, Italy.
2. Furuhashi M, Ogura M, Matsumoto M, Yuda S, Muranaka A, Tanaka M, Moniwa N, Ohnishi H, Saitoh S, Harada-Shiba M, Miura T. Serum FABP5 concentration, a Novel Determinant of Cholesterol Efflux from Macrophages, is a Potential Biomarker for Residual Risk of Atherosclerosis. American Heart Association. 2016, New Orleans, U.S.A.
3. Furuhashi M, Fuseya T, Ishimura S, Mita T, Hoshina K, Watanabe Y, Omori A, Matsumoto M, Moniwa N, Tanaka M, Yoshida H, Miura T. Local Production of Fatty Acid-Binding Protein 4 in Epicardial/Perivascular Fat and Macrophages Leads to Coronary Atherosclerosis. 第80回日本循環器学会, 2016年3月18-20日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)
4. 古橋真人, 三浦哲嗣. シンポジウム「エネルギー代謝と心血管病」脂肪酸結合タンパク4 (FABP4)と心血管・代謝疾患. 第89回日本内分泌学会, 2016年4月21-23日, 国立京都国際会館(京都府京都市)
5. 古橋真人, 松本めぐみ, 平光伸也, 大森晶奈, 田中希尚, 茂庭仁人, 吉田英昭, 石井潤一, 三浦哲嗣. SGLT2 阻害薬であるカナグリフロジンによる新規アディポカイン脂肪酸結合タンパク4 (FABP4)の血中濃度への影響. 第59回日本糖尿病学会, 2016年5月19-21日, 国立京都国際会館(京都府京都市)
6. Furuhashi M, Omori A, Matsumoto M, Ohnishi H, Saitoh S, Miura T. Independent link between levels of PCSK9 and FABP4 in a general population without medication. 第48回日本動脈硬化学会, 2016年7月14-15日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
7. 小倉正恒, 古橋真人, 森本めぐむ, 松本めぐみ, 三浦哲嗣, 斯波真理子. 家族性高コレステロール血症における残余リスクマーカーとしての脂肪酸結合タンパク4. 第48回日本動脈硬化学会, 2016年7月14-15日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
8. 古橋真人, 三浦哲嗣. シンポジウム「肥満と血管障害」肥満と心血管・腎・代謝疾患をつなぐ新たな鍵因子: 脂肪酸結合タンパク4 (FABP4). 第37回日本肥満学会, 2016年10月7-8日, 東京ファッションタウン(東京都江東区)
9. Furuhashi M, Fuseya T, Ishimura S, Mita T, Hoshina K, Watanabe Y, Omori A, Tanaka M, Yoshida H, Miura T. Local production of fatty acid-binding protein 4 in the epicardial/perivascular fat and macrophage leads to coronary atherosclerosis. European Society of Cardiology Congress 2015, London, U.K.
10. Ishimura S, Furuhashi M, Mita T, Fuseya T, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Shimamoto K, Miura T. Angiotensin II Receptor Blockers Decrease Serum Concentration of Fatty Acid-Binding Protein 4 in Patients with Essential Hypertension. 第79回日本循環器学会, 2015年4月24-26日, 大阪会議場(大阪府大阪市)
11. 古橋真人, 平光伸也, 石井潤一, 美田知宏, 大森晶奈, 伏屋敬博, 石村周太郎, 渡邊礼, 田中希尚, 吉田英昭, 三浦哲嗣. オメガ-3脂肪酸エチルは新規アディポカイン脂肪酸結合タンパク4の血中濃度を低下させる. 第58回日本糖尿病学会, 2015年5月21-24日, 海峡メッセ下関(山口県下関市)
12. 古橋真人, 平光伸也, 石井潤一, 美田知宏, 大森晶奈, 伏屋敬博, 石村周太郎, 渡邊礼, 松本めぐみ, 田中希尚, 茂庭仁人, 吉田英昭, 三浦哲嗣. シタグリプチンは新規アディポカイン脂肪酸結合タンパク4 (FABP4)の血中濃度を低下させる. 第36回日本肥満学会, 2015年10月2-3日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
13. 古橋真人. シンポジウム「心腎脂肪連関と代謝異常」: 心血管・腎・代謝疾患における脂肪酸結合タンパク4の役割. 第38回日本高血圧学会, 2015年10月9-11日, ひめぎんホール(愛媛県松山市)
14. 古橋真人. シンポジウム「高血圧を老化の観点から紐解く」: 異所性発現型脂肪酸結合タンパク4と老化との関連. 第38回日本高血圧学会, 2015年10月9-11日, ひめぎんホール(愛媛県松山市)
15. Mita T, Furuhashi M, Ota H, Ishimura S, Fuseya T, Watanabe Y, Ohno K, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida H, Shimamoto K, Miura T. Angiotensin II Receptor Blockers Decrease Serum Concentration of Fatty Acid-Binding Protein 4 in Patients with Essential Hypertension. The 25th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. 2014, Athens, Greece.
16. Ishimura S, Furuhashi M, Yuda S, Muranaka A, Mita T, Fuseya T, Akasaka H, Yoshida H, Saitoh S, Miura T. Elevation of circulating fatty acid-binding protein 4 is associated with left ventricular diastolic dysfunction in a

- general population. European Society of Cardiology Congress 2014, Barcelona, Spain.
17. Mita T, Furuhashi M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Ishimura S, Fuseya T, Akasaka H, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Miura T. Elevation of Fatty Acid-Binding Protein 4 May Contribute to Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Dysfunction in a General Population. 第 78 回日本循環器学会, 2014 年 3 月 21-23 日, 東京国際フォーラム他 (東京都千代田区)
 18. Ishimura S, Furuhashi M, Watanabe Y, Hoshina K, Fuseya T, Mita T, Tanaka M, Akasaka H, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Miura T. Circulating Levels of Fatty Acid-Binding Protein Family and Metabolic Phenotype in the General Population. 第 78 回日本循環器学会, 2014 年 3 月 21-23 日, 東京国際フォーラム他 (東京都千代田区)
 19. 石村周太郎, 古橋真人, 美田知宏, 伏屋敬博, 吉田英昭, 三浦哲嗣. 心血管・代謝疾患における脂肪酸結合タンパク 4 の臨床的役割の検討. 第 87 回日本内分泌学会, 2014 年 4 月 24-26 日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
 20. 大野紘平, 田中希尚, 古橋真人, 赤坂憲, 美田知宏, 伏屋敬博, 石村周太郎, 大西浩文, 吉田英昭, 齊藤重幸, 三浦哲嗣. 尿中 FABP4 濃度の臨床的意義の検討. 第 57 回日本腎臓学会, 2014 年 7 月 4-6 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 21. Furuhashi M, Ishimura S, Miura T. シンポジウム「脂質異常による動脈硬化症への新たな細胞分子標的治療研究の幕開け」: Fatty Acid-Binding Protein 4 as a Key Molecule of Inter-Organ Network in Pathogenesis of Atherosclerosis. 第 46 回日本動脈硬化学会, 2014 年 7 月 10-11 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)
 22. 伏屋敬博, 古橋真人, 美田知宏, 茂庭仁人, 渡邊 礼, 大森晶奈, 大野紘平, 田中希尚, 石村周太郎, 吉田英昭, 三浦哲嗣. アンジオテンシン II 受容体拮抗薬による新規アディポカイン脂肪酸結合タンパク 4 濃度の変化. 第 37 回日本高血圧学会, 2014 年 10 月 17-19 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 23. 古橋真人. 学術奨励賞受賞講演: 肥満に関連する心血管・代謝疾患における各種アディポカインと慢性炎症の役割解明. 第 35 回日本肥満学会, 2014 年 10 月 24-25 日, シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)
 24. 美田知宏, 古橋真人, 石村周太郎, 伏屋敬博, 保科京香, 渡邊礼, 大野紘平, 田中希尚, 吉田英昭, 三浦哲嗣. 脂肪酸結合タンパク 4 は AC-PKA および GC-PKG 経路を介して脂肪分解と共に脂肪細胞から分泌される. 第 35 回日本肥満学会, 2014 年 10 月 24-25 日, シーガイアコンベンションセ

ンター (宮崎県宮崎市)

25. 古橋真人. シンポジウム「オルガネラストレスとエピジェネティクス」: 2 型糖尿病と血管傷害における小胞体ストレス. 第 9 回臨床ストレス応答学会, 2014 年 11 月 1-2 日, 岡山大学鹿田キャンパス(岡山県岡山市)
26. 石村周太郎, 古橋真人, 美田知宏, 伏屋敬博, 吉田英昭, 三浦哲嗣. 血管傷害後の新生内膜形成における小胞体ストレスの関与. 第 18 回日本心血管内分泌代謝学会, 2014 年 11 月 21-22 日, 横浜市開港記念会館 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 古橋真人. 疾患モデルの作成と利用 - 脂質異常代謝と関連疾患 <<下巻>>. FABP4 (尾池雄一, 佐々木雄彦, 村上 誠 編集) エル・アイ・シー: 52-59, 2015

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 1 件)
名称: 糸球体障害の検査方法 (尿中 FABP4)
発明者: 古橋真人
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2015-120521, 特開 2017-003529
出願年月日: 2015 年 6 月 15 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
http://web.sapmed.ac.jp/kikaku/digitalbook/research_seeds/FLASH/index.html

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
古橋 真人 (FURUHASHI, Masato)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20563852