

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <概要>

| | |
|-------|----------------------------------|
| 所 属 | 名古屋大学 先端循環器治療学寄附講座 |
| 氏 名 | 柴田 玲 |
| 研究テーマ | 新規アディポサイトカイン「CTRP9」による血管病制御機構の解明 |

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

研究目的) 脂肪組織はアディポネクチンをはじめとする数多くのアディポサイトカインを分泌する内分泌臓器として知られている。申請者は、アディポネクチンの心血管病保護作用に関して検討してきた (*Nat Med.* 2004, *Nat Med.* 2005, *JCI.* 2007, *Hypertension.* 2010, *JBC.* 2011, *JAHA.* 2013 等)。同時に機能未知であるアディポサイトカインの同定と機能解析に関わる探索を行うなかで、マウス脂肪組織に高発現している C1q/TNF-related protein (CTRP)9 に着目した。CTRP9 はアディポネクチンパラログの一つであり、肥満状態で低下することが知られている。しかしながら、CTRP9 の心血管病に対する作用についてはほとんど知られていない。本研究では、CTRP9 に着目し、動脈硬化などの心血管病における意義を明らかとすることとした。

研究成果) 血管リモデリングにおける CTRP9 の役割検討では、CTRP9 の全身投与が、マウス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示した。その結果、CTRP9 は、血管再狭窄の原因である内膜肥厚を有意に抑制した。培養平滑筋細胞を用いた検討では、CTRP9 の添加が、増殖因子刺激に伴う平滑筋細胞の増殖や ERK のリン酸化を抑制した。また、CTRP9 は用量依存性に平滑筋細胞における cAMP の産生を促進し、cAMP 阻害剤や PKA 阻害剤による前処置が、CTRP9 による平滑筋細胞増殖抑制作用やリン酸化 ERK の活性抑制作用を解除した。我々は CTRP9 遺伝子欠損(CTRP9-KO)マウスを作製し検討を行った。CTRP9-KO マウスのベースラインでの体重/血圧/心重量/空腹時血糖など、同週齢の野生型マウスと比較して差は認められなかった。CTRP9-KO マウスに対して心筋虚血再灌流傷害と LPS 投与を行ったところ、CTRP9 KO マウスでは、野生型マウスと比較して、心筋梗塞サイズが有為に増大、TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインが有為に増加していた。また、LPS 投与で見られる心機能低下や炎症性サイトカインの増加も野生型マウスと比較して増悪していた。培養心筋細胞を用いた検討では、LPS 刺激に伴う TNF- α や IL-6 の増加は、CTRP9 添加によって抑制された。CTRP9 の添加により心筋細胞における AMPK のリン酸化が認められ、CTRP9 の炎症性サイトカイン抑制効果はドミナントネガティブ AMPK 処理や siRNA 法による AdipoR1 のノックダウンにて解除された。野生型マウスへの CTRP9 の投与は、LPS 投与後の心機能低下を改善させたが、dnAMPK-TG マウス や AdipoR1-KO マウスでは、CTRP9 投与では、LPS 負荷に伴う心機能低下を改善し得なかった。このように、CTRP9 は、心血管病に保護的作用を有している可能性が高いことが示唆された。

1. Kambara T, Shibata R, 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.
2. 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.* 27:25-33, 2013.

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

| | |
|-------|----------------------------------|
| 所 属 | 名古屋大学 先端循環器治療学寄附講座 |
| 氏 名 | 柴田 玲 |
| 研究テーマ | 新規アディポサイトカイン「CTRP9」による血管病制御機構の解明 |

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

研究目的) 脂肪組織はアディポネクチンをはじめとする数多くのアディポサイトカインを分泌する内分泌臓器として知られている。申請者は、アディポネクチンの心血管病保護作用に関して検討してきた (*Nat Med.* 2004, *Nat Med.* 2005, *JCI.* 2007, *Hypertension.* 2010, *JBC.* 2011, *JAHA.* 2013 等)。同時に機能未知であるアディポサイトカインの同定と機能解析に関わる探索を行うなかで、マウス脂肪組織に高発現している C1q/TNF-related protein (CTRP)9 に着目した。CTRP9 はアディポネクチンパラログの一つであり、肥満状態で低下することが知られている。しかしながら、CTRP9 の心血管病に対する作用についてはほとんど知られていない。本研究では、CTRP9 に着目し、動脈硬化などの心血管病における意義を明らかとすることとした。

研究方法)

1) 血管リモデリングに対する CTRP9 の役割検討

野生型マウスに対して、アデノウイルス発現系を用いて CTRP9 の全身投与を行った。その後、0.38mm のスチールワイヤーで大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。術後 14 日目に標本を摘出し、hematoxylin and eosin 染色を行い新生内膜/中膜面積比 (I/M ratio) を測定し、新生内膜肥厚を評価した。また、新生内膜における平滑筋細胞の増殖能は、BrdU 取り込み率にて計測した。ヒト大動脈平滑筋細胞を用いて、平滑筋細胞の細胞増殖能を BrdU 取り込み能や MTT アッセイ法などを行うことにより検討した。また遊走能への影響やリン酸化シグナル伝達物質への作用についても評価した。

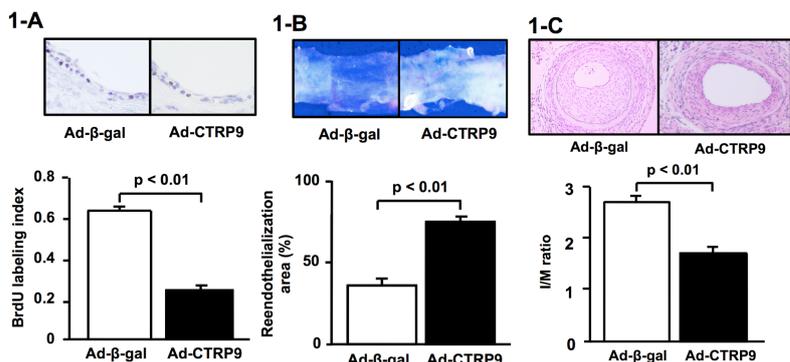
2) CTRP9 遺伝子欠損マウスの作成と心血管病への役割検討

CTRP9 遺伝子欠損マウスを作成し、ベースラインでの表現系の検討を行う。作成した CTRP9 遺伝子欠損マウスを用いて、マウス冠動脈に虚血再灌流傷害を作成し、心筋梗塞サイズを評価した。また、グラム陰性桿菌細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) (10mg/kg) を単回腹腔内注射し、敗血症モデルを作成。胎児培養心筋細胞を用いて、CTRP9 の炎症性サイトカインに対する効果やリン酸化シグナル伝達物質への作用を評価した。

結果)

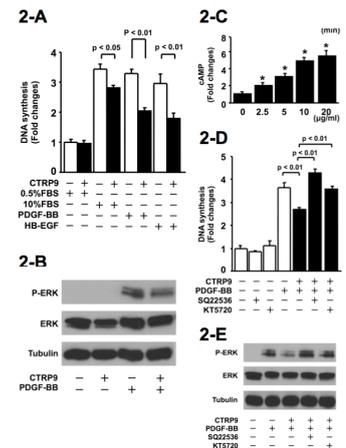
1. 血管リモデリングに対する CTRP9 の役割検討

アデノウイルスを用いた CTRP9 の全身投与は、マウス血管傷害後の平滑筋細胞増殖抑制作用 (図 1-A) や内皮細胞脱落後の修復促進作用 (図 1-B) を示した。その結果、CTRP9 は、血管再狭窄の原因である内膜肥厚を有意に抑制した (図 1-C)。



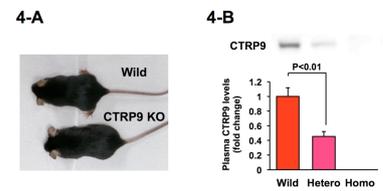
目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

培養平滑筋細胞を用いた検討では、CTRP9 の添加が、増殖因子刺激に伴う平滑筋細胞の増殖(図 2-A)や ERK のリン酸化(図 2-B)を抑制した。また、CTRP9 は用量依存性に平滑筋細胞における cAMP の産生を促進した(図 2-C)。cAMP 阻害剤や PKA 阻害剤による前処置は、CTRP9 による平滑筋細胞増殖抑制作用(図 2-D)やリン酸化 ERK の活性抑制作用(図 2-E)を解除した。また、アディポネクチン遺伝子欠損マウスに CTRP9 を投与しても、血管傷害後の内膜肥厚は抑制された。以上から、CTRP9 は平滑筋細胞に直接作用し、平滑筋細胞増殖抑制作用を発揮することが明らかとなった。その機序は、一部、アディポネクチンと異なる部分があることもわかった。CTRP9 は血管傷害に伴うリモデリングを抑制するアディポサイトカインであると考えられ、血管治療後の再狭窄予防において、予防薬や治療薬の有用な標的分子になりうると考えられた(Uemura, Shibata et al *FASEB J*, 2013)。

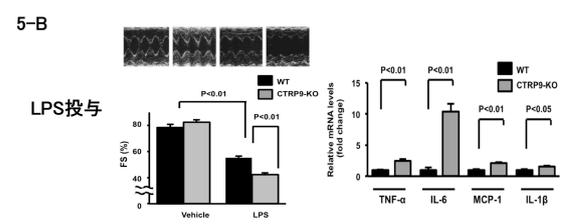
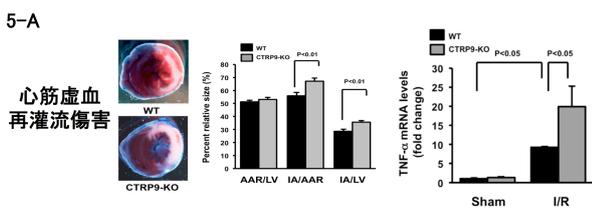


2) CTRP9 遺伝子欠損マウスの作成と心血管病への役割検討

申請者らは、CTRP9 遺伝子欠損(CTRP9 KO)マウスを作製し得た(図 4-A)。ウエスタンブロット法にて、マウスの血中 CTRP9 濃度を確認したところ、CTRP9 KO マウスでは、CTRP9 は検出されなかった(図 4-B)。CTRP9 KO マウスのベースラインでの表現系の検討を行ったところ、ベースラインでの体重/血圧/心重量/空腹時血糖などは、同週齢の野生型マウスと比較して有意な差は認められなかった。

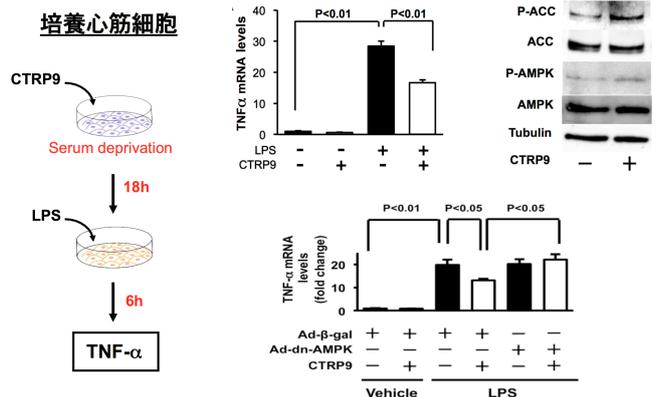


CTRP9 KO マウスに対して、1) 心筋虚血再灌流傷害モデルと 2) LPS 投与による敗血症モデルの作成を行った。心筋虚血再灌流後 24 時間の心筋梗塞サイズの評価を行ったところ、CTRP9 KO マウスでは、WT マウスと比較して、心筋梗塞サイズが有為に増大していた(図 5-A)。また、炎症性サイトカインの一つ TNF- α の有為な増加を伴っていた(図 5-A)。LPS 投与 6 時間後の心エコーによる心機能評価では、CTRP9 KO マウスでは、LPS で見られる心機能低下(左室内径短絡率の低下)がさらに増悪し、TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインの有為な増加を認めた(図 5-B)。



次に、ラット胎児心筋細胞を用いてさらに詳細に CTRP9 の役割に関して検討した。LPS 刺激による、心筋細胞の TNF- α 発現レベルの上昇は、CTRP9 による前処置にて有意に抑制された(図 6)。CTRP9 の添加は、心筋細胞にて AMPK のリン酸化を増強し、ドミナントネガティブ AMPK を発現したアデノウィルスを用いて AMPK シグナルを遮断すると、CTRP9 の抗炎症効果は、減弱した(図 6)。

図6

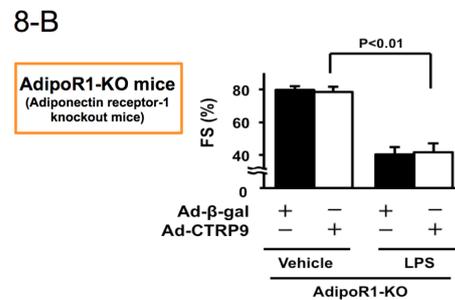
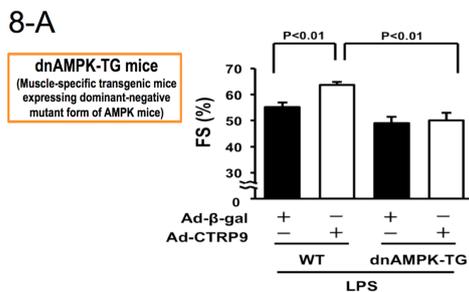
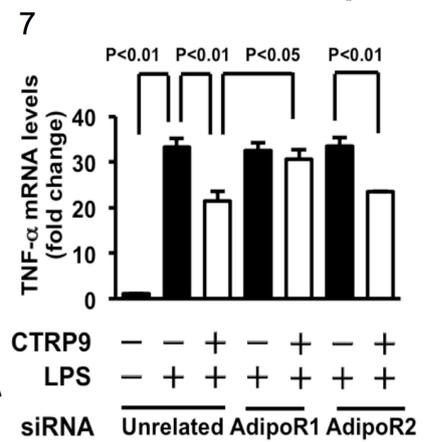


目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

さらに CTRP9 の抗炎症作用に対するアディポネクチンの関与を siRNA 法にて検討を行った。その結果、アディポネクチンレセプター1(AdipoR1)を抑制することで、CTRP9 の LPS 添加にともなう TNF- α 抑制効果は解除された(図 7)。このように、CTRP9 の心保護効果は、AdipoR1-AMPK メカニズムを介して発揮されることが示唆された。

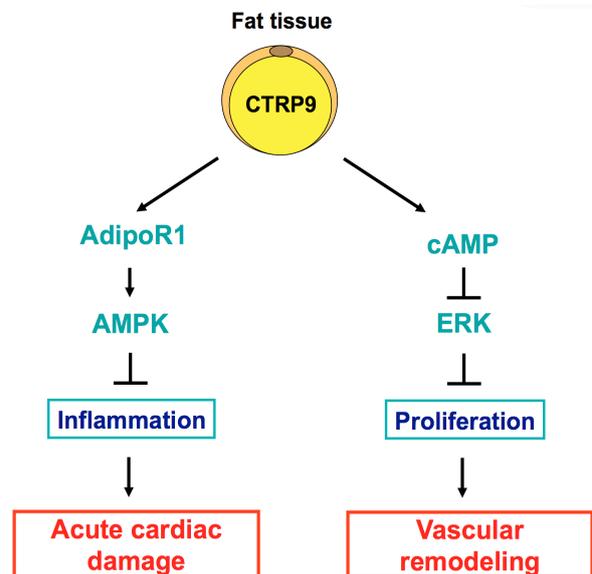
最後に、in vivo における CTRP9 の AdipoR1-AMPK 経路への関与を検討した。ドミナントネガティブ AMPK を筋肉特異的に過剰発現させたマウス(dnAMPK-TG マウス)、LPS 投与にともなう心機能低下に対する CTRP9 の保護的効果は解除された(図 8-A)。また、AdipoR1-KO マウスを用いた検討においても、PS 投与にともなう心機能低下に対する CTRP9 の保護的効果は解除された(図 8-B)。

(Kambara, Shibata et al *Mol Cell Biol*, 2015)。



考察と今後の課題)

肥満、糖尿病を中心とした生活習慣病、動脈硬化関連疾患の病態には、様々な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や動脈硬化などの生活習慣病で低下していることが知られている。また、アディポネクチンパラログの一つとして注目されている CTRP9 も、生活習慣病や心血管病に保護的作用を有している可能性が高いことが本研究助成にて明らかになった(右図)。その作用の一部は、アディポネクチンと異なる独自の作用でもある。今後、CTRP9 の更なる機能解析、発現作用調節機構が明らかになることで、肥満や糖尿病それに伴う動脈硬化関連疾患の包括的理解と治療法の開発につながるものと考えられる。



Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

| | |
|------------|--------------------|
| 所 属 | 名古屋大学 先端循環器治療学寄附講座 |
| 氏 名 | 柴田 玲 |

| 1. 論文発表実績 | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 | |
| ① <論文 PDF 添付あり> | |
| 1 | Kanemura N, Shibata R, Ohashi K, Ogawa H, Hiramatsu-Ito M, Enomoto T, Yuasa D, Ito M, Hayakawa S, Otaka N, Murohara T and Ouchi N. C1q/TNF-related protein 1 prevents neointimal formation after arterial injury. <i>Atherosclerosis</i> . 2017;257:138-145. |
| 2 | Hiramatsu-Ito M, Shibata R, 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. <i>Cardiovasc Res</i> . 2016;110:107-17. |
| 3 | Kambara T, Shibata R, 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. <i>Mol Cell Biol</i> . 2015;35:2173-85. |
| 4 | Uemura Y, Shibata R, 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 and Ouchi N. Adipose-derived protein omentin prevents neointimal formation after arterial injury. <i>FASEB J</i> . 2015;29:141-51. |
| | |
| | |
| ② <論文 PDF 添付なし> | |
| 1 | Ouchi N, Ohashi K, Shibata R and Murohara T. Protective Roles of Adipocytokines and Myokines in Cardiovascular Disease. <i>Circ J</i> . 2016;80:2073-80. |
| 2 | Matsuo K, Shibata R, 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. <i>J Mol Cell Cardiol</i> . 2015;79:195-202. |
| 3 | Yamaguchi S, Shibata R, 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. <i>Sci Rep</i> . 2015;5:16295. |
| | |

| 2. 学会発表実績 | | |
|--|----------------|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 | | |
| | 発表時期 | 発表学会名、発表者名、演題 |
| 1 | 2016年10月 仙台 | 第39回日本高血圧学会総会(シンポジウム)、柴田玲、下肢重症虚血肢に対する脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた血管新生療法 |
| 2 | 2016年9月 岡山 | 第23回心血管インターベンション治療学会(CVIT)中国四国治療会(特別講演)、柴田玲、心血管病における再生医療-脂肪が下肢切断を救う |
| 3 | 2016年5月 上海(中国) | The 10th Oriental Congress of Cardiology(シンポジウム)、Shibata R、Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia by implantation of adipose-derived regenerative cells. |
| 4 | 2015年4月 大阪 | 第79回日本循環器学会学術集会(シンポジウム)、柴田玲、大内乗有、室原豊明、C1q/TNF-related protein 9 actions in the cardiovascular system. |
| | | |
| | | |
| 3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める) | | |
| | 投稿/発表時期 | 雑誌名、学会名等 |
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| | | |
| | | |