

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <概要>

所 属	大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学
氏 名	藤島 裕也
研究テーマ	アディポネクチンの組織集積のメカニズムと、その抗動脈硬化作用の解明

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）

研究の背景および目的

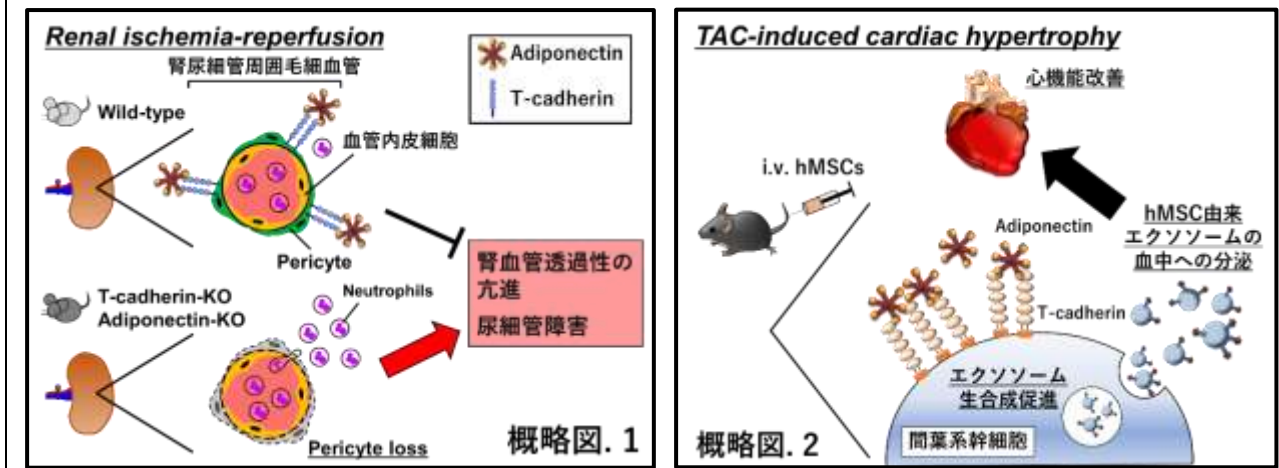
脂肪細胞特異的分泌蛋白アディポネクチン（APN）は臓器保護作用を有することが示されてきたが、その機序は充分には解明されていない。近年我々は、APNが GPI アンカー型蛋白 T-cadherin（T-cad）と特異的かつ高親和性に結合することで心血管組織に集積し存在していること、さらに細胞内に取り込まれた後に細胞外小胞（エクソソーム（Exo））の生合成および分泌を促進することで、細胞からのセラミド搬出を伴い、血管内皮細胞のセラミド蓄積による血管障害を抑制することを見出した。

このような APN/T-cad システムによる Exo 産生促進作用は、全身の病態形成に重要な役割を果たしていることが想定される。本研究では骨格筋や腎臓におけるその意義を明らかにするとともに、間葉系幹細胞治療への応用について検討を行った。

主な研究の成果

- 1) 加齢による筋肉の再生能の低下は、高齢者のサルコペニアやフレイルの誘引となることが知られているが、APNは T-cad を介した Exo 産生依存的に筋肉の再生を促進した。（**Sci Rep 2019**）
- 2) 腎臓では、尿細管周囲毛細血管の pericyte（周皮細胞）が T-cad を高発現しており、APN によって Exo 産生が促進された。また、T-cad あるいは APN の欠損は、腎虚血再灌流障害に対して高度の pericyte loss を惹起し、より進行性の腎尿細管損傷と血管透過性亢進を示した（**概略図. 2**）。（**Am J Physiol Endocrinol Metab in press**）
- 3) 間葉系幹細胞（MSCs）は全身の組織に常在し、組織修復・再生を通じて恒常性維持に機能する一方で、培養 MSCs は細胞医療として様々な疾患に応用されている。APN は静脈投与された MSCs に発現する T-cad を介して Exo 産生を促進し、心不全モデルへの細胞治療効果を促進させた（**概略図. 3**）。（**Mol Therapy 2020**）

以上の成果は、脂肪細胞は APN を介して全身の様々な T-cad 発現細胞の Exo 産生を制御し、全身臓器の恒常性維持の一端を担うという、新しい内分泌・代謝調節機構が提唱するものである。



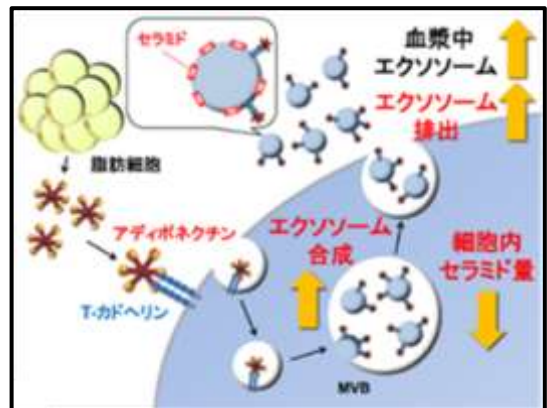
第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <詳細>

所 属	大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学
氏 名	藤島 裕也
研究テーマ	アディポネクチンの組織集積のメカニズムと、その抗動脈硬化作用の解明

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

メタボリックシンドロームの病態基盤として、内臓脂肪蓄積を上流とするアディポサイトカイン分泌異常を介して、動脈硬化症やインスリン抵抗性など様々な病態が生じることが明らかとなっている。アディポサイトカインの中でも、アディポネクチン（APN）については、これまでに数多くの論文報告がなされているが、その作用機序は十分に明らかでない。近年我々は、血液中の高分子多量体 APN が GPI アンカー型膜蛋白である T-cadherin（T-cad）と特異的かつ高親和性に結合にすることで、心血管組織に集積し存在しており、抗動脈硬化作用を発揮することを見出した（**Endocrinology 2015, FASEB J 2017, J Biol Chem 2017**）。

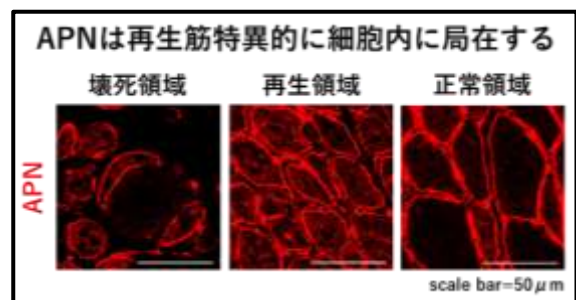
さらに APN は、T-cad 依存性に内分泌小胞であるエクソソーム（Exo）の産生・分泌を促進させ、血中の Exo 量そのものを規定すること、またこのような Exo 分泌による搬出促進作用を介して血管内皮細胞のセラミド蓄積を低下させ血管障害を抑制することを報告した（**JCI Insight 2018**）。このような APN/T-cad システムによる Exo 産生促進作用は、不要物排出のみならず、様々な生理活性タンパクや核酸の細胞間伝達を媒介することで、個々の細胞および全身臓器の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが想定される。



1. APN/T-cad による筋再生作用

骨格筋は高い再生能を有する臓器であるが、加齢による再生能の低下は高齢者の筋量低下および生活の質の低下の一因となりうる。骨格筋は T-cad 高発現臓器であることから、筋再生に着目し、APN の役割を明らかにすることを目的とした。

筋再生はアンジオテンシン II 負荷条件下でカルディオトキシン（CTX）注入により誘導した。前脛骨筋における APN の集積を免疫染色で検討したところ、野生型（WT）マウスの正常筋及び再生筋において APN は筋細胞に集積したが、T-cad 欠損（TKO）マウスでは集積を認めず、APN は T-cad 依存的に骨格筋に集積していた。さらに、WT マウスの再生筋では APN および Tcad は筋細胞内部に局在しており、このような細胞内の APN は多胞体マーカーである CD63 と共局在した。次に、APN の筋再生作用を評価するため、アデノウイルスを用いて APN を強制発現した上で筋再生を惹起した。その結果、CTX 注入 7 日目において、WT マウスでは APN は筋線維面積率を増加させ、壊死組織面積率を減少させた。さらに APN は再生筋マーカーである eMyHC 陽性領域を増加させ、線維化マーカーである Col1a1 遺伝子発現を低下させた。AKO マウスでも同様に、APN は筋線維断面積を増加させ、壊死組織面積率を減少させたが、TKO マウスでは APN によるこのような作用はみられなかった。



C2C12 を用いた細胞実験では、分化時系列に沿って T-cad の発現と APN も集積量の増加が観察された。また、分化誘導後の管状構造を形成する筋管細胞では、特異的に細胞内部に APN の局在を認め、

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

CD63 と共局在していた。さらに、培養上清中の Exo を段階的超遠心法にて回収し、ウエスタンブロット (WB) にて評価したところ、精製高分子量体 APN 添加により複数の Exo 特異的マーカー蛋白 Exo 分泌が増加し、Exo 産生が促進された。

以上より、APN は T-cad を介して筋再生を促進することが明らかとなった。APN は再生筋において筋細胞内部にも局在化しており、APN のエクソソーム生合成促進機構の関与が示唆された。(Sci Rep 2019)

2. APN の T-cad を介した血管周皮細胞への集積とその腎保護作用

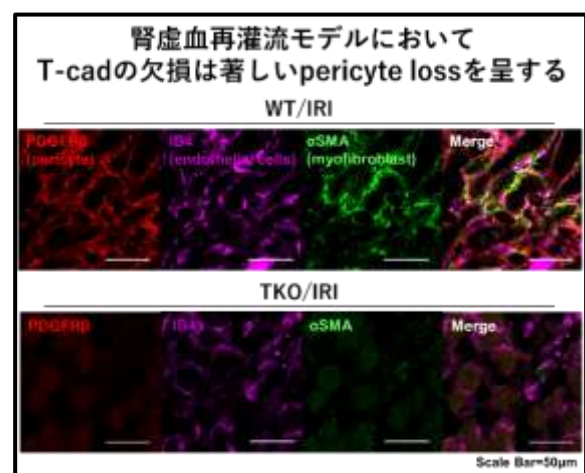
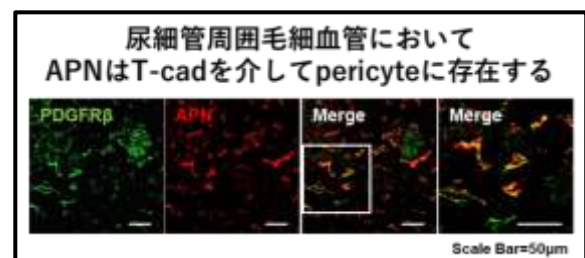
臨床において急性腎障害 (AKI) は、脱水・出血・敗血症・手術等様々な原因で引き起こされ、慢性腎不全 (CKD) への移行や、長期的な死亡率の増加と関連することが知られている。過去に 5/6 腎摘モデルにおいて APN が腎線維化を抑制することを報告しているが (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007)、腎臓における APN/T-cad の詳細な局在や役割については未知であった。

腎臓の whole lysate の WB では、心血管組織と比較すると相対的に少ないものの、APN および T-cad 蛋白の存在を認めた。次に、蛍光免疫染色により WT マウスの腎臓における APN の局在を評価したところ、細動脈の血管内皮と尿細管周囲の毛細血管で APN が検出された。一方で、このような APN のシグナルは、TKO マウスの腎臓では完全に消失していた。興味深いことに、糸球体には APN シグナルは検出されず、単離糸球体での T-cad の mRNA および蛋白発現は著しく低かったことから、少なくとも糸球体の毛細血管には T-cad を介した APN の存在は極めて限定的であると考えられた。続いて、尿細管周囲の毛細血管における T-cad と APN の詳細な局在について検討したところ、T-cad および APN は血管内皮細胞マーカーである CD31 とはほとんど共染せず、血管周皮細胞 (pericyte) マーカーである PDGFRβ と共染された。この結果から、腎尿細管周囲毛細血管においては、APN は主に pericyte に T-cad を介して集積していると考えられた。

腎臓における APN/Tcad の作用を評価するために、WT および AKO、TKO マウスに対して、腎虚血再灌流 (IRI) による急性腎不全モデル (左腎動静脈をクランプ、30 分後に解放) を作製し、24 時間後に解析した。その結果、AKO および TKO マウスの腎髄質では、WT マウスに比して、より高度な尿細管壊死を呈しており、尿細管細胞間隙に多数の好中球浸潤が認められ、活性化好中球と遠位尿細管障害マーカーである NGAL 陽性面積が有意に高値であった。また、AKO・TKO マウスの IRI 腎では、Evans blue dye 静脈注射後の血管外漏出が有意に高値であり、著しい血管透過性亢進がみられた。pericyte は微小血管のバリア機能を維持するために不可欠であり、WT マウスの IRI 腎では PDGFRβ 陽性面積が健常側腎と比較して代償的に増加していたが、AKO および TKO マウスでは、血管内皮に隣接する PDGFRβ 陽性 pericyte が顕著に減少しており、重篤な pericyte loss を呈した。最後に、マウス primary pericyte を用いた in vitro の実験を行ったところ、pericyte には T-cad 蛋白発現が豊富に認められ、APN の集積と APN による Exo 分泌の亢進が確認されたが、これらは siRNA による T-cad のノックダウンによってキャンセルされた。

以上より、腎臓において APN は、T-cad を介して尿細管周囲毛細血管の pericyte に存在しており、急性腎障害モデルにおける血管透過性亢進を抑制することで、腎保護効果を発揮することが初めて示された。

(Am J Physiol Endocrinol Metab in press)



研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

3. APN/T-cad の幹細胞治療への応用

腎臓で T-cad 発現と APN 集積が観察された pericyte は、内皮細胞の支持細胞として血管構造の維持や微小循環の調節に重要な役割を果たすだけでなく、組織常在性の間葉系幹細胞 (MSCs) としての側面も有していることが近年報告されている。また、近年急速に臨床応用が進められている間葉系幹細胞移植療法の治療効果は、主に MSCs の産生する Exo を介することが想定されており、心不全や移植片対宿主病など多彩な疾患に対して臨床的治療効果が示されている。そこで、APN/T-cad システムによる Exo 産生制御が、MSCs の治療効果に及ぼす影響について検討した。

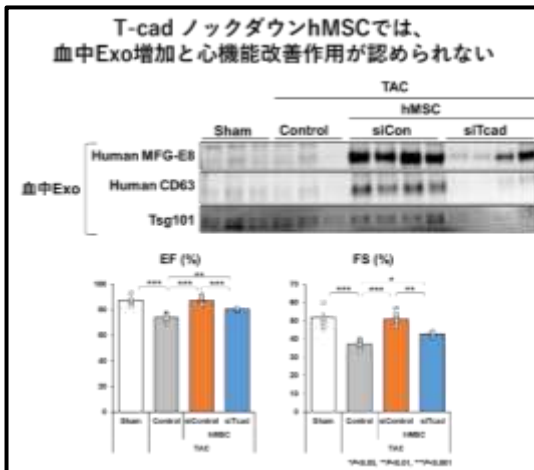
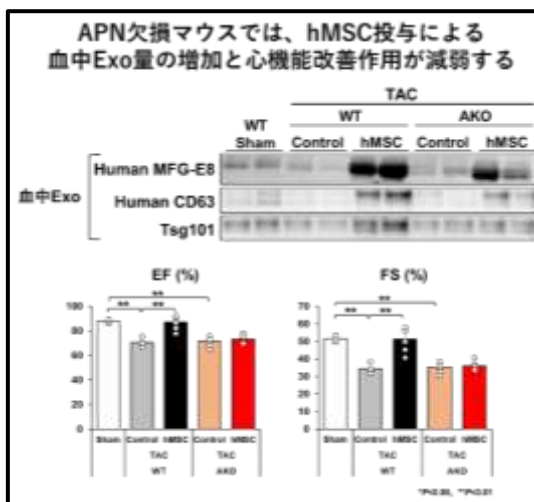
ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hMSCs) において T-cad 蛋白の発現が確認され、細胞への APN の集積を認めた。またこの時、APN の濃度依存的に培養上清中の Exo マーカー蛋白が増加したが、T-cad のノックダウンで低下したことから、APN は T-cad 依存的に hMSCs の Exo 産生を促進させることが明らかとなった。

続いて、本細胞が治療効果を有するかを明らかにするため、大動脈縮窄 (TAC) による圧負荷心不全モデルを用いて検討を行った。WT マウスでは、TAC 2 週間後の時点で左室駆出率、左室内径短縮率が低下したが、MSCs の尾静脈投与により著明に心機能が改善した。また、血中 Exo を抽出し WB により検討したところ、hMSCs の投与により複数のヒト Exo マーカーが多量に検出され、hMSCs 由来の Exo が血中で顕著に増加していた。一方で AKO マウスでは、このような MSCs 投与による血中 Exo の増加は認められず、TAC による心機能低下は改善されなかった。さらに、T-cad をノックダウンした hMSCs (siTcad-MSCs) を WT マウスの TAC モデルに投与したところ、血中 Exo の増加が認められず、心機能の改善も限定的であった。最後に、このような hMSCs の治療効果が Exo を介したものであるかを、Exo 生合成の中心的複合体 ESCRT の機能蛋白である Alix をノックダウンすることで検討した。その結果、Alix をノックダウンした hMSCs (siAlix-MSCs) の投与では、siTcad-MSCs と同様に血中 Exo の増加が認められず、有意な心機能の改善も示さなかった。

以上より、APN は hMSCs に発現する T-cad を介して Exo 産生能を有し、心不全モデルに対する幹細胞医療への治療効果に影響し得ることが明らかとなった。(Mol Ther 2020)

今後の課題と展望

本研究の結果により、脂肪細胞から分泌された APN は、T-cad 発現細胞の Exo 産生を制御し、臓器保護作用の一端を担うだけでなく、全身の組織常在性 MSCs を介した病態形成にも関与することが示唆される。現在、各種臓器・細胞の T-cad の役割を明らかにするため、T-cad flox マウスを準備している。今後は既存の組織・細胞種特異的 Cre マウスと掛け合わせることで、血管内皮細胞や心筋細胞、骨格筋細胞、組織常在性幹細胞を初めとした細胞種特異的な T-cad 欠損マウスを作製し、各細胞の Exo 産生能および臓器保護作用について APN が果たす役割を明らかにする予定である。



第7回万有医学奨励賞 – 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	大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学
氏 名	藤島 裕也

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	Tsugawa-Shimizu Y, <u>Fujishima Y</u> , Kita S, Minami S, Sakaue TA, Nakamura Y, Okita T, Kawachi Y, Fukuda S, Namba-Hamano T, Takabatake Y, Isaka Y, Nishizawa H, Ranscht B, Maeda N, Shimomura I. Increased vascular permeability and severe renal tubular damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking adiponectin or T-cadherin. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2020 Dec 7. (in press). (査読あり)
2	Nakamura Y, Kita S, Tanaka Y, Fukuda S, Obata Y, Okita T, Nishida H, Takahashi Y, Kawachi Y, Tsugawa-Shimizu Y, <u>Fujishima Y</u> , Nishizawa H, Takakura Y, Miyagawa S, Sawa Y, Maeda N, Shimomura I. Adiponectin Stimulates Exosome Release to Enhance Mesenchymal Stem-Cell-Driven Therapy of Heart Failure in Mice. Mol Ther. 2020 Oct 7;28(10):2203-2219. (査読あり)
3	Masuda S, <u>Fujishima Y</u> , Maeda N, Tsugawa-Shimizu Y, Nakamura Y, Tanaka Y, Obata Y, Fukuda S, Nagao H, Kita S, Nishizawa H, Shimomura I. Impact of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D on hepatic diacylglycerol accumulation, steatosis, and insulin resistance in diet-induced obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019 Feb 1;316(2):E239-E250. (査読あり)
4	Tanaka Y, Kita S, Nishizawa H, Fukuda S, <u>Fujishima Y</u> , Obata Y, Nagao H, Masuda S, Nakamura Y, Shimizu Y, Mineo R, Natsukawa T, Funahashi T, Ranscht B, Fukada SI, Maeda N, Shimomura I. Adiponectin promotes muscle regeneration through binding to T-cadherin. Sci Rep. 2019 Jan 9;9(1):16. (査読あり)
② <論文 PDF 添付なし>	

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	2019 年 5 月 26 日	発表学会名：第 62 回日本糖尿病学会学術総会、発表者名：藤島 裕也、演題：アディポネクチンの組織集積のメカニズムと、その抗糖尿病作用および臓器保護作用の解明
2	2019 年 5 月 9 日	発表学会名：第 92 回日本内分泌学会学術総会、発表者名：藤島 裕也、演題：肥満脂肪組織におけるコリントランスポーター発現とコリン代謝動態の変化
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	2020 年 10 月 3 日	Kawachi Y, <u>Fujishima Y</u> , Nishizawa H, Nakamura T, Akari S, Murase T, Saito T, Miyazaki Y, Nagao H, Fukuda S, Kita S, Katakami N, Doki Y, Maeda N, Shimomura I. Increased plasma xanthine oxidoreductase activity induced by NAFLD/NASH conditions and its possible involvement in vascular neointimal proliferation. JCI Insight. (in revision).（査読あり）