

主論文の要旨

Adipose-derived factor CTRP9 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation

脂肪由来分泌因子 CTRP9 は
平滑筋細胞の増殖と新生内膜形成を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

植村 祐介

【背景】

肥満は2型糖尿病などの生活習慣病に関与し、結果として動脈硬化や血管内治療後の再狭窄といった血管障害を引き起こす。脂肪組織は、様々なアディポサイトカインを分泌する内分泌臓器として機能しており、肥満状態では、炎症惹起性のアディポサイトカインが増加する一方、アディポネクチンをはじめとする抗炎症作用を持ち、疾患保護的に働くアディポサイトカインが減少する。その結果、各臓器での肥満関連疾患に影響を与えることが報告されている。

Clq/TNF-related proteins (CTRP)は、C末端に球状のClqドメインとコラーゲン領域をもつアディポネクチンのパラログであり、CTRP9は其中でも、アディポネクチンとアミノ酸相同性が最も高い。CTRP9の機能については肥満マウスにおける血糖低下作用、内皮依存性の血管弛緩作用、虚血再灌流モデルにおける心筋保護作用などが報告されている。CTRP9の血中濃度は肥満マウスにおいて低下していることから、CTRP9が肥満関連疾患に影響を与えることが考えられるが、血管リモデリングにおける役割は未だ分かっていない。今回、CTRP9が新生内膜形成や血管平滑筋細胞の増殖にどのように作用しているかを検討した。

【結果】

CTRP9 全身投与による血管傷害後の内膜肥厚抑制効果 (Fig1)

アデノウイルス発現系を用いて CTRP9 をマウスに静脈内投与し、3日後に大腿動脈をワイヤーで擦過して、血管傷害モデルを作製した。静注5日後に、血漿中の CTRP9 濃度は約5倍に増加していた。術後21日目に、ヘマトキシリンエオジン染色で傷害血管の内膜中膜比を測定したところ、CTRP9 投与群で有意に低下していた。また、術後7日目の BrdU 染色では、新生内膜中の BrdU 陽性細胞は CTRP9 投与群で有意に減少していた。このことから、CTRP9 投与は、血管傷害後の新生内膜形成と細胞増殖を有意に抑制することが示唆された。

傷害血管の再内皮化も、新生内膜形成に関与していることから、術後10日目にエバンスブルー染色を行い、再内皮化を検討したところ、CTRP9 投与群で有意に再内皮化が促進されていた。

また、食餌誘発性肥満マウスやアディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいても、CTRP9 投与は、血管傷害後の内膜中膜比を有意に抑制した。

増殖因子によって刺激された血管平滑筋細胞の増殖・遊走に対する CTRP9 の抑制効果 (Fig2)

血管平滑筋細胞に対し、10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum; FBS)、血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor; PDGF)-BB、heparin-binding EGF like growth factor (HB-EGF)の増殖因子で刺激すると、血管平滑筋の細胞数やDNA合成は増加するが、CTRP9 蛋白の前投与によりこれらは有意に抑制された。同様に、増殖因子によって亢進した平滑筋細胞の遊走も、CTRP9 により有意に抑制された。

cAMP/PKA 経路を介した CTRP9 の平滑筋細胞増殖抑制効果 (Fig3, 4, 5)

細胞内 cAMP の上昇は、平滑筋細胞の休止に関与していることが報告されているため、CTRP9 が血管平滑筋細胞における cAMP に与える影響を検討した。その結果、CTRP9 は時間依存的・用量依的に細胞内 cAMP 濃度を上昇させた。

アデニルシクラーゼ阻害剤である SQ22536 と、その下流である PKA の阻害剤 KT5720 を用いて、cAMP/PKA 経路を阻害したところ、PDGF-BB 刺激による DNA 合成を抑制する CTRP9 の効果は解除された。このことから、CTRP9 は cAMP 依的に平滑筋細胞の増殖を抑制していることが示唆された。

CTRP9 の内皮機能改善効果や心筋細胞保護効果は、アディポネクチン受容体の一つである AdipoR1 を介していることが報告されている。siRNA を用いて平滑筋細胞における AdipoR1 を抑制したが、CTRP9 による cAMP 増加作用や、細胞増殖抑制効果には変化がなかった。

細胞外調節キナーゼ(extracellular signal-regulated kinase; ERK)は cAMP の細胞増殖

抑制効果を介するシグナルであることが報告されているため、ERK のリン酸に対する CTRP9 の効果を検討した。PDGF-BB によって亢進した ERK のリン酸化は CTRP9 により有意に抑制された。さらにこの ERK リン酸化抑制効果は、cAMP/PKA 経路阻害剤の前処置により解除された。

CTRP9 は血管内皮細胞や心筋細胞において、AMPK シグナルを刺激すると報告されている。平滑筋細胞においても、AMPK リン酸化は CTRP9 添加後にわずかではあるが亢進していた。しかしながら、ドミナントネガティブ AMPK を発現したアデノウイルスを用いて、AMPK の活性を阻害しても、CTRP9 の平滑筋細胞増殖抑制効果には変化が認められなかった。

【考察】

今回我々は CTRP9 が血管傷害後の新生内膜形成を抑制し得るアディポサイトカインであることを報告した。また、CTRP9 が平滑筋細胞の増殖を抑制する機序として、cAMP/PKA のシグナルを介していることを明らかにした。

動脈硬化や血管内治療後再狭窄などの血管障害によって引き起こされる血管リモデリングでは、平滑筋細胞の増殖・遊走は重要な現象である。今回我々は *in vitro* の検討において CTRP9 が濃度依存的に平滑筋細胞における cAMP 濃度を上昇させ、cAMP/PKA 経路の阻害にて CTRP9 の平滑筋細胞増殖抑制効果が解除されることを示した。また、*in vivo* において CTRP9 が傷害血管における細胞増殖を抑制することにより内膜肥厚を抑制し得ることを示した。このことから、CTRP9 が cAMP/PKA シグナルを介して傷害血管における血管リモデリングを制御していることが示唆された。

CTRP9 は血管内皮細胞や心筋細胞において AdipoR1 を介した AMPK シグナルの活性化を起こすことが報告されている。しかし、AMPK 活性化の阻害や AdipoR1 遺伝子発現の抑制は、平滑筋細胞における CTRP9 の増殖抑制効果や cAMP 上昇作用に対して有意な変化はなく、CTRP9 の平滑筋細胞増殖抑制効果は、AMPK シグナルや AdipoR1 を介していないことが示唆された。

CTRP9 は CTRP ファミリーの中で最もアディポネクチンと相同性が高い。アディポネクチンもまた、血管リモデリングを抑制することが報告されている。しかしながら、アディポネクチンが平滑筋細胞増殖を抑制する機序としては、AMPK シグナルを介していることから、CTRP9 とは細胞レベルでのメカニズムが異なっていると考えられた。また、*in vivo* において CTRP9 はアディポネクチンと互いに影響し合うことが報告されているが、アディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいても、CTRP9 の投与により新生内膜形成は抑制され、血管リモデリングに対する CTRP9 の抑制効果に、アディポネクチンは必ずしも必要ではないことが示された。

【結論】

CTRP9 投与は cAMP/PKA 経路を介した平滑筋細胞増殖抑制効果により傷害血管における新生内膜形成を抑制することが明らかとなった。肥満状態において進行する血管障害に対し、CTRP9 を増加させる治療戦略が有用である可能性が示唆された。