

主論文の要旨

**C1q/TNF-Related Protein 9 Promotes Revascularization
in Response to Ischemia *via* an eNOS-Dependent Manner**

〔 C1q/TNF-Related Protein (CTRP) 9の虚血組織における
eNOS 依存性血管新生促進効果の検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 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)

山口 淑郎

【緒言】

心血管疾患において血管新生療法は、虚血によりもたらされる組織傷害に対する有効な治療法として期待される。C1q/TNF-related protein (CTRP) 9 は、主として脂肪組織より分泌される生理活性物質の一つで、心筋虚血などの心血管疾患および耐糖能異常などの代謝疾患に対する防衛的作用が報告されている。しかし、血管内皮細胞に対する機能は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、虚血組織の血管新生過程における CTRP9 の作用を検証し、その詳細な機序について解析を行った。

【方法・結果】

CTRP9 欠損および野生型マウスに対し、片側の大腿動脈を結紮・除去した下肢虚血モデルを作成した。経時的に血流ドップラー画像を撮影し、虚血肢血流の変化および血流改善の程度を評価した結果、CTRP9 欠損マウスでは野生型マウスと比較し、血流改善が有意に抑制されていた (Figure 1A, B)。また、虚血肢の内転筋組織を用いて、血管内皮細胞表面に集中して発現する CD31 に対する免疫染色を行い、微小血管密度を評価した。CTRP9 欠損マウスでは野生型マウスと比較し、筋組織中の CD31 陽性細胞の有意な減少を認めた (Figure 1C, D)。

次に、CTRP9 の補充が、虚血肢血流改善の促進に寄与するか検証するため、アデノウイルスベクターを用いて検討した。CTRP9 欠損および野生型マウスに対し、下肢虚血作成の 5 日前に CTRP9 発現アデノウイルス (Ad-CTRP9) を経内頸静脈的に投与した。それぞれの対照群には β ガラクトシダーゼ発現アデノウイルスを投与した。下肢虚血作成 14 日後に虚血肢血流および微小血管密度を評価した結果、CTRP9 欠損および野生型マウスどちらにおいても、Ad-CTRP9 投与群で対照群と比較し虚血肢血流の有意な増加および CD31 陽性細胞の有意な増加を認めた (Figure 2A, B)。

CTRP9 の血管内皮細胞に対する作用を、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用いて検討した。HUVECs による基底膜マトリックス上での脈管様管腔の形成能を検証した結果、ヒト組換え CTRP9 の添加により脈管様管腔の形成が有意に増加した (Figure 3A)。また、Boyden chamber assay による遊走能の検証の結果、CTRP9 の添加は HUVECs の遊走細胞数を有意に増加させた (Figure 3B)。

こうした結果に基づき、CTRP9 の血管新生促進効果に関する詳細なメカニズムの解析を行った。まず、血管新生に関与する細胞内シグナル伝達物質の活性化における CTRP9 の効果を、HUVECs を用いて検証した。ウェスタンブロット法にて細胞内シグナルタンパク質のリン酸化を評価した結果、CTRP9 添加により AMP 活性化キナーゼ (AMPK)、Akt、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) のリン酸化は促進された (Figure 4A, B)。また、CTRP9 欠損マウスは野生型マウスと比較し、虚血肢内転筋組織中のリン酸化 AMPK、Akt、eNOS の有意な減少を認めた (Figure 4C, D)。

さらに、CTRP9 による eNOS のリン酸化促進のシグナル経路における、AMPK および Akt の関与を検証するため、阻害剤を用いた細胞実験を行った。HUVECs に対し、AMPK の活性化阻害剤である Compound C、また Akt の上流に存在するシグナル伝達

物質である PI3 キナーゼの活性化阻害剤である LY294002 を予め作用させた。その結果、CTRP9 添加による eNOS のリン酸化の促進効果が、それぞれの阻害剤作用下で抑制された (Figure 5A, B)。これらの実験結果より、AMPK と Akt は、eNOS の上流に存在するシグナル伝達物質である可能性が示唆された。

最後に、CTRP9 の血管新生促進効果における eNOS の役割を検証した。NOS 阻害剤である L-NAME を HUVECs に作用させた結果、CTRP9 添加による脈管様管腔形成能および遊走能の促進効果は認められなかった (Figure 5C, D)。さらに、eNOS 欠損マウスに対し Ad-CTRP9 を投与した結果、野生型マウスで見られた虚血肢の血流改善の促進効果は見られなかった (Figure 5E)。また、野生型マウスで認めた Ad-CTRP9 投与による微小血管密度の上昇も、eNOS 欠損マウスの虚血肢筋組織では認められなかった (Figure 5F)。これらの結果より、CTRP9 による血管新生促進効果は、eNOS を介していると考えられた。

【考察】

本研究における主要な知見は以下である。

- (1) CTRP9 の欠損は、マウス虚血肢の血流改善を減弱させた。
- (2) CTRP9 の全身投与は、マウス虚血肢の血流改善を促進させた。
- (3) CTRP9 の添加は、HUVECs の脈管様管腔形成能および遊走能を促進させた。
- (4) CTRP9 の添加は、AMPK および Akt を介したシグナル経路により、HUVECs における eNOS のリン酸化を促進させた。
- (5) CTRP9 添加による HUVECs の脈管様管腔形成能および遊走能の促進効果は、eNOS の阻害により解除された。
- (6) eNOS 欠損マウスでは、CTRP9 の投与による虚血肢血流改善の促進効果は見られなかった。

これらの結果より、CTRP9 は虚血組織において、血管内皮細胞内の血管新生促進に関与するシグナル経路を直接的に刺激し、血流改善を促進しうることが示された。eNOS の活性化は虚血肢における血管新生の促進に有効と知られているが、本研究により eNOS は、血管内皮細胞内のシグナル伝達物質として、CTRP9 の血管新生促進効果において重要な役割を担うことが示された。

【結論】

CTRP9 は、eNOS 依存性のシグナル経路により、血管内皮細胞機能を制御し、虚血組織における血管新生を促進することを示した。CTRP9 は、心血管疾患に対する治療において、有効な標的分子になりうることが期待される。