

厚生労働科学研究費補助金
循環器疾患等総合研究事業

メタボリックシンドロームにおけるアディポサイトカイン
異常を標的とした心血管合併症治療・予防法の確立
に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 下村 伊一郎

平成18(2006)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- メタボリックシンドロームにおけるアディポサイトカイン異常を標的
とした心血管合併症治療・予防法の確立に関する研究 ----- 1
下村 伊一郎

II. 分担研究報告

1. レプチンの心筋細胞肥大作用・スタチンの心拡張能に対する影響に
関する研究 ----- 3
長谷川 浩二
2. アディポサイトカイン異常から動脈硬化発症とLOX-1に関する研究 ----- 4
沢村 達也
3. アディポサイトカイン血中濃度測定と臨床的評価に関する研究 ----- 6
船橋 徹
4. アディポサイトカイン血中濃度測定と治療効果の検討に関する研究 ----- 8
佐藤 哲子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 10

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 12

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）
総括研究報告書

メタボリックシンドロームにおけるアディポサイトカイン異常を標的とした
心血管合併症治療・予防法の確立に関する研究

主任研究者 下村伊一郎 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

研究要旨

- ・（船橋）私達がこれまで明らかにしてきたアディポネクチンと粥状動脈硬化との関連に加え、本年度の臨床研究では低アディポネクチン血症が冠動脈スパズムとも関連することを示し、低アディポネクチン血症をきたすライフスタイルとして喫煙の影響を示した。
- ・（佐藤）肥満外来患者を対象にした研究により、メタボリックシンドロームの減量または食後高血糖の治療におけるアディポサイトカイン異常の是正効果、動脈硬化進展抑制を検討した。
- ・（沢村）LOX-1遺伝子改変マウスを用いた検討で、生体においてLOX-1を介した酸化ストレスの増大が血管内皮障害、動脈硬化の進展に重要であることが明らかとなった。
- ・（長谷川）レプチンは、*in vitro*において心筋細胞長径の増大を引き起こし、*in vivo*においても左室拡張末期径の増大を引き起こした。また、スタチンの多面的作用の一つとして、糖尿病における心拡張能の改善効果を認めた。
- ・（下村）メタボリックシンドロームにおける酸化ストレスの疾患マーカー・治療標的としての有用性を検討している。上記分担研究の統括を行い、メタボリックシンドロームにおける上記サイトカインネットワーク異常を標的とした心血管病予防法、治療法の開発に取り組んでいる。

研究分担者

長谷川浩二

国立病院機構京都医療センター
展開医療研究部 部長

沢村達也

国立循環器病センター研究所
脈管生理部 部長

船橋徹

大阪大学大学院医学系研究科
内分泌・代謝内科学 講師

佐藤哲子

国立病院機構京都医療センター
臨床代謝栄養室 室長

A. 研究目的

内臓脂肪蓄積による耐糖能異常、高脂血症、高血圧を合併するメタボリックシンドローム（MS）が動脈硬化疾患の基盤である。これらの起こってしまった疾患に対する治療ではなく、内臓脂肪蓄積を上流に包括的に捉えた治療法そして予防法の開発が厚生労働行政上、急務である。我々は、脂肪組織、筋肉からアディポネクチン、ビスファチン、マスキリンといった新規内分泌因子や、酸化LDL受容体LOX-1を発見し、脂肪組織・血管における酸化ストレスの意義を明らかにしてきた。本研究では、メタボリッ

クシンドロームに関わるこれらサイトカインネットワーク異常の心血管病における治療的・予防的意義を明らかにする

B. 研究方法

ヒト臨床研究（血中濃度測定系の開発とMSや動脈硬化性疾患患者での測定・治療介入による変化を検討し、疾患マーカーとしての意義の解明）および動物モデルを用いた治療的意義の解明

（倫理面への配慮）

臨床研究については、厚生労働省及び文部科学省の倫理指針に基づき、大阪大学、京都大学、国立循環器病センター、国立京都

病院でのIRBおよび倫理委員会の承認を得、対象者に対する人権擁護上の配慮を行い、対象者に不利益、危険性がないよう十分配慮し、十分な説明を行っている。動物実験に際しては、当該実験施設に実験計画書を提出し、動物愛護上の配慮を行い倫理上問題のないよう取り計らい、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関しては、国の定める倫理指針に基づき、当該施設での倫理委員会の承認を得て行っている。アディポサイトカインをはじめとする組織由来分泌因子に関しては、“生活習慣病における組織由来分泌因子の意義に関する研究”で既に大阪大学医学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

アディポネクチンと脂肪組織由来酸化ストレスの臨床的意義の検討 (船橋・下村)

喫煙が血中アディポネクチン濃度を下げること(Hypertension2005)、アディポネクチンが心筋虚血・再灌流による心筋障害の抑制的に働くこと(Nature Med 2005)、低アディポネクチン血症が冠動脈攣縮に関わること

(Circ J2005)を明らかにした。また肥満で脂肪組織由来酸化ストレス (Fat ROS)が増加し、Fat ROSがアディポサイトカイン分泌異常の上流因子の一つであることを報告した(J.Clin.Invest.2004)。現在ヒトへ展開し、MSの疾患マーカーとしての意義、薬剤の標的になりうるか検討している。現在までの検討で、酸化ストレス(尿中8-epi-PGF2a)がMS症例において有意に高値を示し、また内臓脂肪蓄積が酸化ストレス産生に強く寄与していることを明らかにしている(投稿準備中)。また、従来の腹部CTによる測定より簡便なインピーダンス法を用いた内臓脂肪測定装置を開発した(Diabetes Care 2005)。

アディポサイトカイン血中濃度測定と治療効果の検討に関する研究 (佐藤)

減量治療により、動脈硬化指数が有意に低下し、アディポネクチンの上昇と有意に相関した。また α -GIによる治療を施行した糖尿病患者においては、血管内のsICAM-1や酸化ストレスマーカーの低下及び動脈硬化指数の改善が認められた(Metabolism2005)。

心筋への高レプチン血症とスタチンの効果 (長谷川)

レプチンが左室拡張末期径の増大を引き起こし、スタチンが糖尿病における心拡張能

の改善効果を有することを明らかにした。動脈硬化発症と酸化LDL受容体LOX-1に関する研究 (沢村)

LOX-1が酸化ストレス産生を通じて血管内皮細胞障害・動脈硬化進展に関わっていることを明らかにした(Circ Res 2005)

D. 考察

血中アディポネクチン濃度、全身酸化ストレスがMSの疾患マーカーとなる可能性がある。今後症例数を増やして検討し、エビデンスを積み上げることが重要である。またMSの包括的管理を目指し、ライフスタイル改善による内臓脂肪蓄積の減少に加えて、アディポサイトカイン異常の是正といった観点からMS治療・予防に最適な薬剤の探索を行っている。またアディポネクチン・酸化ストレス(血管ではLOX1)を標的とした治療法の開発が重要である。

E. 結論

内臓脂肪蓄積およびそれによるアディポサイトカインの分泌異常をMSの疾患マーカーとして早期にとらえ、また治療標的として臨床応用することが、血管病を最終ターゲットとしたMSの包括的な予防および治療に繋がると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1)Ryo M, Funahashi T, Shimomura I, et al:A new simple method for the measurement of visceral fat accumulation by bioelectrical impedance.

Diabetes Care. 28:451-3, 2005.

(2)Maruyoshi H, Funahashi T, Shimomura I, et al:Hypoadiponectinemia is associated with coronary artery spasm in men.

Circ J. 69:1154-6, 2005

2. 学会発表

H17.5.12-5.14第48回日本糖尿病学会学術集会 下村伊一郎：シンポジウム13 『インスリン抵抗性の分子生物学』発表「メタボリックシンドロームの新たな脂肪細胞標的；Fat ROS」など多数。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患総合研究事業）
分担研究報告書

レプチンの心筋細胞肥大作用・スタチンの心拡張能に対する影響に関する研究

分担研究者 長谷川浩二

独立行政法人 国立病院機構京都医療センター 臨床研究センター 展開医療研究部 部長

研究要旨

レプチンは、in vivoにおいて心筋細胞長径の増大を引き起こし、in vivoにおいても左室拡張末期径の増大を引き起こした。また、スタチンの多面的作用の一つとして、糖尿病における心拡張能の改善効果を認めた。

A. 研究目的

今後ますます増加すると考えられるメタボリックシンドローム患者の心血管病変を理解するために、1) 心筋細胞に対するレプチンの直接効果、2) 糖尿病モデル動物を用いたスタチンの心拡張能に対する影響について検討した。

B. 研究方法

1) ラット初代培養心筋細胞を0—500 ng/mlのレプチン存在下に48時間培養し、 β -MHC染色後、心筋細胞面積、長径、短径を計測した。レプチン投与後のMAPキナーゼのリン酸化をウエスタンブロット法にて検討した。STAT3の核移行およびDNA結合能の検討を行った。さらにマウス心筋梗塞モデルを作製し、皮下に浸透圧ポンプを植え込んで、血行動態に対する影響を検討した。2) II型糖尿病モデルラットであるOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat (OLETF)を用いて、スタチンの心臓拡張能の低下に対する影響について検討した。

C. 研究結果

1) レプチン投与により心筋細胞面積は有意に ($p < 0.01$) 増加したが、細胞横径は増加せず、長径のみの有意な増加を認めた。心筋細胞へのレプチン投与によりERK, p38 MAP kinase, JNKの活性化は認めなかった。しかしレプチン投与 (50 ng/ml) 後5分よりSTAT3がリン酸化され、これに引き続いて、そのDNA結合能が増大することを確認した。JAK2阻害薬であるAG490 (1 μ M) の前投与はレプチンによる心筋細胞長径の増大をほぼ完全に抑制した。また、血圧を上昇させないレベルでの慢性的なレプチン投与により、左室拡張末期径は 4.56 ± 0.12 mm (PBS投与群では 4.13 ± 0.09 mm) に有意に上昇した。

2) OLETFラットはコントロールラットLong-Evans Tokushima Otsuka rat (LETO)に比し、24週齢において拡張能の低下を示した。16週齢から8週間simvastatinを4 mg/kg/day投与したところ、vehicle投与群に対し、有意な拡張能の改善を示した(DT:OLETF (47 ± 9 msec) vs vehicle-treated OLETF (60 ± 9 msec))。

D. 考察

高レプチン血症は心肥大を引き起こす可能性がある。また、スタチンの多面的作用を臨床研究においても検討する必要がある。

E. 結論

レプチンはJAK2/STAT3カスケードの活性化により、心筋細胞長径の増大を引き起こし、心筋梗塞後の左室利モデリングに対する影響を有することが示された。また、スタチンの多面的作用の一つとして、糖尿病における心拡張能の改善効果を認めた。

F. 研究発表

1. 学会発表

第26回日本肥満学会 ロイトン札幌
2005年10月13—14日

レプチンは心筋細胞長径増大作用を有し、心筋梗塞後の代償性肥大を誘導する阿部由希子¹⁾、尾野 亘¹⁾、川村晃久¹⁾、宮本昌一³⁾、森本達也³⁾、和田啓道¹⁾、島津 章²⁾、長谷川浩二¹⁾

¹⁾ 京都医療センター展開医療研究部

²⁾ 京都医療センター

³⁾ 京都大学大学院医学研究科循環器内科

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）
分担研究報告書

アディポサイトカイン異常から動脈硬化発症とLOX-1に関する研究

分担研究者 沢村達也 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨

血管内皮障害におけるLOX-1の重要性を検証するために、LOX-1を内皮細胞に強発現させたトランスジェニック (LOXtg) マウスを作成した。このLOXtgマウスでは、心筋内細動脈にLOX-1の高度な発現を認めた。さらにLOXtgマウスと、ApoE欠損マウス (ApoE KO) と交配させることにより、LOXtg/ApoE KOの遺伝子改変マウスを作成し、高脂血症下での血管病変形成におけるLOX-1の重要性を検証した。LOXtg/ApoE KOマウスは、ApoE KOマウスに比べて、血中脂質プロファイルの差は認めなかったが、抗酸化LDL抗体、抗8-OHdG抗体を用いた検討で、心筋内細動脈に強い染色を認め、血管床での酸化ストレスの亢進が確認された。また、心筋内細動脈のLOX-1の発現に伴って、接着因子ICAM-1、VCAM-1の発現が亢進していた。さらに高脂肪食を負荷することにより、心筋内細動脈に脂肪沈着を伴う血管病変の形成を認めた。以上の結果より、LOX-1が高脂血症下での血管内皮障害に深く関わっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

動脈硬化を基盤とする心血管病は、内皮障害がはじまる炎症性疾患として捉えることができ、その病態形成に酸化ストレスは、重要な役割を果たしている。これまでの基礎的及び、臨床研究にて、アディポサイトカイン異常を伴うメタボリック症候群においては、酸化ストレスが亢進していることが報告されている。亢進した酸化ストレスは、内皮傷害の直接的な要因であり、また一方で低分子リポ蛋白 (LDL) の酸化的修飾により生成された酸化LDLは、酸化LDL受容体であるLOX-1を介して血管病変形成に重要な役割を果たしている。

今回、血管内皮障害におけるLOX-1の役割を検証するために、LOX-1を内皮細胞に強発現するLOX-1トランスジェニック (LOXtg) マウスを作成した。さらに高脂血症モデル動物であるApoEノックアウトマウス (ApoE KO) と交配させることにより、LOXtg/ApoE KOマウスの遺伝子改変マウスを作成し、高脂血症下での血管病変形成におけるLOX-1の重要性を検証した。

B. 研究方法

今回、LOXtg マウス作成にあたり、プロモーターとして preproendothelin 1 を用いた。対照マウスとして C57BL/6 マウスを用いて、常法に従い、LOX-1 トランスジェニックマ

ウス (LOXtg) を作成した。

血管における酸化ストレスの検討として、抗酸化 LDL 抗体、抗 8-OHdG 抗体による免疫組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物遂行にあたっては、国立循環器病センター研究所の動物実験規約を遵守して行い、動物愛護の観点から動物の苦痛緩和には、最大限の配慮を行った。

C. 研究結果

LOXtgマウスでは、心筋組織内細動脈の内皮細胞及び心筋細胞に強い発現が認められた。またLOX-1の発現に伴い、蛍光標識酸化LDLの取込みの亢進を認め、発現したLOX-1が機能的にも作用していることを確認した。

高脂血症条件下におけるLOX-1の役割に解析を目的として、LOXtg/ApoE KOマウスを解析した。LOXtg/ApoE KOマウスとApoE KOマウスの両者間で血中脂質プロファイルの差は認めなかったが、免疫組織学的検討で、LOXtg/ApoE KOマウスでは、LOX-1の発現に伴い、抗酸化LDL抗体、抗8-OHdG抗体による高度な染色性を認め、血管床における酸化ストレスの亢進が確認された。また、LOXtg/ApoE KOマウスでは、内皮細胞に接着因子VACM1、ICAM1の高度な発現亢進と、マクロファージの浸潤を認めた。さらに高脂肪食を負荷することにより、心筋内細動脈に脂

肪沈着を伴う血管病変の形成を認めた。

D. 考察

動脈硬化形成過程は、血管内皮細胞障害から引き金となって進行すると考えられている。これまで細胞レベルでの実験にて、LOX-1へのリガンドの結合がNAD(P)H oxidaseの活性化から活性酸素の産生増強を惹起し、内皮細胞が産生されるNitric Oxideの活性を減弱させ、内皮機能障害を引き起こすことが明らかとなっている。今回の遺伝子改変マウスを使った検討で、LOX-1を介する系が、血管壁の接着因子の発現や炎症細胞浸潤を促すことにより、血管壁における慢性炎症を惹起し、動脈硬化の進展に深く関与していることが、個体レベルにておいても示された。メタボリック症候群に伴う動脈硬化を基盤とした心血管病を炎症性疾患と捉えた時、LOX-1を介する系のさらなる解明が、病態形成の理解につながるだけでなく、新たな治療法、診断法につながることを期待できる。

E. 結論

LOX-1遺伝子改変マウスを用いた一連の検討で、生体においてLOX-1を介した酸化ストレスの増大が血管内皮障害の成因、動脈硬化の進展に、重要な働きを果たしていることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Theriault, J.R., Mambula, S.S., Sawamura, T., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K.: Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett.* 579:1951-1960, 2005.
- (2) Chen, M. and Sawamura, T.: Essential role of cytoplasmic sequences for cell-surface sorting of the lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1). *J Mol Cell Cardiol.* 39:553-561, 2005.
- (3) Sawamura, T.: LOX-1 Unlocked. *Structure (Camb).* 13:834-835, 2005.
- (4) Inoue, K., Arai, Y., Kurihara, H., Kita, T. and Sawamura, T.: Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice. *Circ Res.* 97:176-184, 2005.

(5) Chen, K., Chen, J., Liu, Y., Xie, J., Li, D., Sawamura, T., Hermonat, P.L. and Mehta, J.L.: Adhesion molecule expression in fibroblasts: alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids. *Hypertension.* 46:622-627, 2005.

(6) Cominacini, L., Anselmi, M., Garbin, U., Fratta Pasini, A., Stranieri, C., Fusaro, M., Nava, C., Agostoni, P., Keta, D., Zardini, P., Sawamura, T. and Lo Cascio, V.: Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor- κ B activation in patients with unstable angina. *J Am Coll Cardiol.* 46:799-806, 2005.

(7) Tanigawa, H., Miura, S.I., Zhang, B., Uehara, Y., Matsuo, Y., Fujino, M., Sawamura, T. and Saku, K.: Low-density lipoprotein oxidized to various degrees activates ERK 1/2 through Lox-1.

Atherosclerosis. 2005(in press)

(8) Hinagata, J., Kakutani, M., Fujii, T., Naruko, T., Inoue, N., Fujita, Y., Mehta, J.L., Ueda, M. and Sawamura, T.: Oxidized LDL receptor LOX-1 is involved in neointimal hyperplasia after balloon arterial injury in a rat model.

Cardiovasc Res. 69:263-271, 2006.

(9) Murphy, J.E., Tacon, D., Tedbury, P.R., Hadden, J.M., Knowling, S., Sawamura, T., Peckham, M., Phillips, S.E., Walker, J.H. and Ponnambalam, S.: LOX-1 scavenger receptor mediates calcium-dependent recognition of phosphatidylserine and apoptotic cells. *Biochem J.* 393:107-115, 2006.

2. 学会発表

- (1) 酸化LDL受容体LOX-1は高脂肪食により誘発されるSHR-SPの血管への脂肪沈着に関与する。沢村達也
第41回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
- (2) 酸化LDL受容体LOX-1は高脂肪食により誘発されるSHR-SPの血管壁脂肪沈着に関与する。沢村達也、中野厚史、菅原史明
第15回日本循環薬理学会
- (3) 酸化LDL受容体LOX-1は、SHR-SPラットにおいて高脂肪食により誘発される血管への脂肪沈着に関与する。
沢村達也、中野厚史、菅原史明
第28回日本分子生物学会年会

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）
分担研究報告書

アディポサイトカイン血中濃度測定と臨床的評価に関する研究

分担研究者 船橋徹 大阪大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨

私達がこれまで明らかにしてきたアディポネクチンと粥状動脈硬化との関連に加え、本年度の研究では低アディポネクチン血症が冠動脈スパズムとも関連することを示した。また低アディポネクチン血症をきたすライフスタイルとして喫煙の影響も示した。実験的にはアディポネクチン欠乏が心機能そのものにも影響を与えることが明らかになった。

A. 研究目的

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪蓄積を基盤とし、インスリン抵抗性、動脈硬化惹起性リポ蛋白異常、血圧上昇を合併する易動脈硬化発症状態である。私達はメタボリックシンドロームの病態形成に脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの異常が関わるという全く新しい可能性を示してきた。メタボリックシンドロームが働き盛りの労働者に多い病態であることから、下流の病態のみでなく、内臓脂肪蓄積を上流に捉えた対策が厚生労働行政上、重要であると考え。本研究の目的は、私達が発見したアディポネクチンを中心にアディポサイトカイン測定がメタボリックシンドロームの病態に如何に関与するかのエビデンスを蓄積し、メタボリックシンドロームの予防医学に応用しうるかを検証していくものである。

B. 研究方法

ヒト臨床研究（血中濃度測定系の開発とMSや動脈硬化性疾患患者での測定による疾患マーカーとしての意義の解明）および動物モデルを用いた治療的意義の解明

（倫理面への配慮）

臨床研究については、厚生労働省及び文部科学省の倫理指針に基づき、大阪大学でのIRBおよび倫理委員会の承認を得、対象者に対する人権擁護上の配慮を行い、対象者に対する不利益、危険性がないよう十分配慮する。動物実験に際しては、当該実験施設に実験計画書を提出し、動物愛護上の配慮を行い倫理上問題のないよう取り計らう。アディポネクチンに関しては、“脂肪細胞由来因子を基盤とした生活習慣病に関する研究”で既に大阪大学医学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

ライフスタイルはメタボリックシンドロームの病態発症に最も重要な介入事項であり、病態の上流に位置する内臓脂肪蓄積の大きな要因である。喫煙と内臓肥満の関連は古くから検討されており、ニコチンそのものは体重減少に働くが、内臓脂肪蓄積者ではむしろ喫煙習慣をもつものが多いことが指摘されている。喫煙は心血管疾患のリスクでもあり体内に酸化ストレスを生じる。アディポネクチン血中濃度に与える影響を検討した。喫煙者では肥満度とは独立して血中アディポネクチン濃度が低下していた。禁煙者は非喫煙者との中間の値を示した。喫煙後12時間以内の短期にも血中アディポネクチン濃度は低下した。酸化ストレス産物(H2O2)は脂肪細胞からのアディポネクチン発現を抑制した(Hypertension 2005)。血中アディポネクチン濃度は狭窄病変を有する冠動脈疾患症例の約40%で低下している。アディポネクチンは血管内皮機能にも影響を与えることが明らかになってきた。そこで冠動脈スパズムにより狭心症をきたす異型狭心症例の血中アディポネクチン濃度を検討した。アディポネクチン濃度は冠動脈スパズム症例で低下しており、これは喫煙の影響を除いても有意であった(Circ J 2005)。これらの臨床研究に加え実験的研究によりアディポネクチンの意義を確立していくことも重要である。アディポネクチン欠乏動物の解析により、低アディポネクチン血症状態では、血圧が上昇する心臓後負荷によって強い心筋肥大に続き心拡大、心不全がおこった(Cardiovasc Res 2005)。臨床的にピオグリタゾン本態性高血圧症例において、血中アディポネクチン濃度の上昇、インスリン抵抗性の改善したととも

に、左室拡張能の改善をもたらした (Am J Hypertens 2005)。またアディポネクチン欠乏モデルは、虚血後再還流障害に対し、強い心筋障害をすることが明らかになった (Nat Med 2005)。

D. 考察

喫煙は易血栓性のみでなく、脂肪細胞機能にも影響を与え、アディポネクチン低下の要因ともなると考えられた。本知見は今後の生活指導、啓蒙にも重要と考えられた。また冠動脈スパズムとも関連し、これは心血管疾患最終の発症要因でも繋がると考えられた。心拡張能との関連も実験的に示され、臨床的にもこれを裏付けるデータがでつつある。

E. 結論

低アディポネクチン血症をきたすライフスタイルとして喫煙があげられた。低アディポネクチン血症は冠動脈スパズムとも関連した。また実験的にはアディポネクチン欠乏が心機能そのものにも影響を与えることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Maruyoshi H, Kojima S, Otsuka F, Funahashi T, Kaikita K, Sugiyama S, Sakamoto T, Yoshimura M, Shimomura I, Ogawa H. Hypoadiponectinemia is associated with coronary artery spasm in men.

Circ J. 69:1154-1156, 2005

(2)Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Kida I, Ohishi M, Horio T, Ouchi N, Ohashi K, Kihara S, Funahashi T, Rakugi H, Ogihara T. Association of hypoadiponectinemia with smoking habit in men.

Hypertension. 45:1094-1100, 2005

(3)Horio T, Suzuki M, Suzuki K, Takamisawa I, Hiuge A, Kamide K, Takiuchi S, Iwashima Y, Kihara S, Funahashi T, Yoshimasa Y, Kawano Y.: Pioglitazone improves left ventricular diastolic function in patients with essential hypertension.

Am J Hypertens. 18:949-957, 2005

(4)Liao Y, Takashima S, Maeda N, Ouchi N, Komamura K, Shimomura I, Hori M, Matsuzawa Y, Funahashi T, Kitakaze M. Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism.

Cardiovasc Res. 67:705-713, 2005

(5)Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms.

Nat Med. 11: 1096-1103, 2005

2. 学会発表
多数

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）

分担研究報告書

アディポサイトカイン血中濃度測定と治療効果の検討に関する研究

分担研究者 佐藤哲子

独立行政法人 国立病院機構京都医療センター

臨床研究センター 代謝研究部 臨床代謝栄養研究長

研究要旨

食生活の欧米化に伴い、日本人でも肥満症やメタボリックシンドローム（MS）の発症は年々増加し心血管病のリスクが高くなっている。これには肥満に伴うアディポサイトカインの分泌異常が関わっていると考えられ、本研究では、我が国のMSにおけるアディポサイトカインの異常による心血管病発症の作用機序やその意義について検証する目的で、MSにおける糖脂質代謝、および肥満様式やアディポサイトカインの異常と動脈硬化の進展度など心血管リスクの関連について検討する。

A. 研究目的

本研究では肥満、糖尿病などを含むMSにおけるレプチン・アディポネクチンなど多くのサイトカインネットワークの異常に関して、それぞれのホルモン因子の心血管疾患発症における意義を解明すると同時に、MSにおける減量や各薬物治療によるサイトカイン異常の統合的な是正効果を検討し、心血管合併症予防法とその治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

1) 肥満症におけるMSの特徴：NCEPと日本のMSの基準に準じて当院肥満外来及び国立病院機構ネットワーク施設の肥満症におけるMSの割合、重積度別の糖脂質代謝パラメーターやアディポサイトカイン、炎症性サイトカイン、内臓脂肪量・皮下脂肪量、大動脈脈伝播速度PWV、頸動脈内皮肥厚IMTについて検討した。

2) メタボリックシンドロームの減量または食後高血糖の治療における動脈硬化進展抑制の検討

①当院肥満教室参加のMS症例39例にて、食事療法と運動療法による減量指導6ヶ月間施行。②当院入院中の2型糖尿病を有するMS 30症例において、食後高血糖を標的とした糖尿病薬 α -Glucosidase Inhibitor(α -GI)の3週間投与施行。

①②の治療前後の体組成、糖脂質代謝、ア

ディポサイトカイン、炎症・酸化ストレスマーカー及び血圧に依存しない大動脈脈波伝播速度CAVI(cardio ankle vascular index)を検討した。(倫理面の配慮) 京都医療センターの倫理委員会の承認を得る。

C. 研究結果

1) 肥満症におけるMSの特徴 ①MSの割合：学会(NCEP)が提唱するATP-IIIでは、全肥満者の約68%がMSであったが、2005年に発表された日本のMS新診断基準では46%がMSと減少した。男性の57%、女性の36%がMSであり、日本のMS新診断基準によると肥満男性の方が女性より高率にMSであった。②危険因子保有数別解析：各危険因子保有数が増えるにつれて内臓脂肪量、V/S比が増え、血中レプチン濃度上昇、アディポネクチンの低下が認められた。炎症性サイトカインの中では、特に高感度CRPが有意に上昇していた。動脈硬化の新指標であるCAVI(PWV)も、危険因子の保有数が増えるに従い、有意に上昇していた。③MSと非MSの比較：年齢・皮下脂肪量に有意差がないが、MSでは非MSに比べて、内臓脂肪量、TG、腹囲、HDL-C、FPG、SBP、DBP、BMI、TCHOの順に有意に高値であった。また高感度CRPはMS群で有意に高値であった。

II. MSの治療における動脈硬化進展抑制の検討

MSのうち、減量治療により、CAVI(cardio

ankle vascular index)が有意に低下しており、アディポネクチンの上昇と有意な相関があった。また α -GIによる治療を施行した糖尿病患者においては、食後高血糖、高脂血症、高インスリン血症が有意に改善しており、血管内のsICAM-1や酸化ストレスマーカーの低下及びCAVI (PWV)の改善が認められた。

D. 考察

当院肥満外来において約70%に及ぶ症例がMSの基準を満たし、内臓脂肪量、血中アディポサイトカイン濃度、高感度CRPが危険因子の重積に重要であることが示された。MSにおける減量治療により、血中アディポサイトカイン、炎症マーカーhsCRPやMCP-1などが短期間で是正され、動脈硬化進展の予防に繋がり、血中アディポサイトカインが治療のマーカーとして有用であることが証明された。また、MSにおける α -GIによる食後高血糖、食後高脂血症、食後高インスリン血症の改善は、血中サイトカイン異常を是正しており、大血管障害の予防に繋がることが示唆された。

E. 結論

上記結果を踏まえ、今後は(1)当院肥満専門外来および政策医療ネットワーク施設における約500例以上の肥満症を用いて、新しい日本人MS診断基準に合致する患者頻度の検討、非合併患者との臨床像の比較検討、および心血管危険因子、心血管病変の罹患率、動脈硬化症の進展に与える影響について比較検討し、また減量治療中の脂質代謝異常とアディポサイトカイン異常の変化・関連も多施設共同で追跡する。MSにおけるアディポサイトカインのプロファイルと減量や各薬剤治療による心疾患リスクに対する治療効果、予後に与える影響を明らかにし、最適な治療法について検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

N. Satoh, A. Shimatsu, K. Yamada, M. Aizawa-Abe, T. Suginami, H. Kuzuya, Y. Ogawa. An α -glucosidase inhibitor voglibose reduces oxidative stress markers and soluble intercellular adhesion molecule-1 in obese type 2 diabetes. *Metabolism* in press, 2006

2. 学会発表

(1)N. Satoh, A. Shimatsu, K. Yamada, H. Kuzuya: Effect of Eicosapentaenoic Acids on lipoprotein subclasses, Remnant like Particles, Inflammatory markers and Atherosclerosis in obese type 2diabetic patients.

Keystone Symposia 2006.1.21-26 Vancouver

(2) N. Satoh, A. Shimatsu, K. Yamada, Y. Ogawa H. Kuzuya: Voglibose reduces systemic inflammation and oxidative stress generation in obese type 2 diabetes.

American Diabetes Association

2005.6.10-14 San Diego

(3)佐藤哲子、坂根直樹、小谷和彦、小川佳宏、菅波孝祥、山田和範、葛谷英嗣、島津 章:メタボリックシンドロームにおける動脈硬化症の指標としてのレプチン/アディポネクチン比について

第48回日本糖尿病学会年次学術集会

2005. 5. 12-14 神戸

(4)佐藤哲子、坂根直樹、小谷和彦、

小川佳宏、菅波孝祥、山田和範、葛谷英嗣、島津 章:メタボリックシンドロームにおける動脈硬化進展の指標としてのレプチン/アディポネクチン比

第78回日本内分泌学会学術総会

2005. 7. 1-3 東京

(5)佐藤哲子、島津 章、阿部 恵、

小川佳宏、菅波孝祥、山田和範、葛谷英嗣:メタボリックシンドロームにおけるVogliboseの食後高血糖・高脂血症の改善と抗酸化作用

第26回日本肥満学会 2005. 10. 13-14 札幌

(6)佐藤哲子、服部正和、安藤理子、阿部 恵、島津 章、山田和範、葛谷英嗣: α -GIによる食後高血糖・高脂血症の改善、酸化ストレスの軽減と大血管障害予防効果

第42回日本糖尿病学会近畿地方会

シンポジウム3 2005. 11. 05 大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ryo, M, Nakamura, T, Kihara, S, <u>Funahashi, T</u> , <u>Shimomura, I</u> , et al.	A new simple method for the measurement of visceral fat accumulation by bioelectrical impedance.	Diabetes Care.	28 (2)	451-453	2005
Theriault, J.R., Mambula, S.S., <u>Sawamura, T</u> , Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K	Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells.	FEBS Lett	579	1951-1960	2005
Chen, M. and <u>Sawamura, T</u> .	Essential role of cytoplasmic sequences for cell-surface sorting of the lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1).	J Mol Cell Cardiol	39	553-561	2005
<u>Sawamura, T</u> .	LOX-1 Unlocked.	Structure (Camb)	13	834-835	2005
Inoue, K., Arai, Y., Kurihara, H., Kita, T. and <u>Sawamura, T</u> .	Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice.	Circ Res	97	176-184	2005
Chen, K., Chen, J., Liu, Y., Xie, J., Li, D., <u>Sawamura, T</u> , Hermonat, P.L. and Mehta, J.L.	Adhesion molecule expression in fibroblasts: alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids.	Hypertension	46	622-627	2005
Cominacini, L., Anselmi, M., Garbin, U., Fratta Pasini, A., Stranieri, C., Fusaro, M., Nava, C., Agostoni, P., Keta, D., Zardini, P., <u>Sawamura, T</u> . and Lo Cascio, V.	Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor-kappa B activation in patients with unstable angina.	J Am Coll Cardiol	46	799-806	2005
Tanigawa, H., Miura, S.I., Zhang, B., Uehara, Y., Matsuo, Y., Fujino, M., <u>Sawamura, T</u> . and Saku, K.	Low-density lipoprotein oxidized to various degrees activates ERK1/2 through Lox-1.	Atherosclerosis		in press	2005
Hinagata, J., Kakutani, M., Fujii, T., Naruko, T., Inoue, N., Fujita, Y., Mehta, J.L., Ueda, M. and <u>Sawamura, T</u> .	Oxidized LDL receptor LOX-1 is involved in neointimal hyperplasia after balloon arterial injury in a rat model.	Cardiovasc Res	69	263-271	2006
Murphy, J.E., Tacon, D., Tedbury, P.R., Hadden, J.M., Knowling, S., <u>Sawamura, T</u> , Peckham, M., Phillips, S.E., Walker, J.H. and Ponnambalam, S.	LOX-1 scavenger receptor mediates calcium-dependent recognition of phosphatidylserine and apoptotic cells.	Biochem J	393	107-115	2006

Maruyoshi H, Kojima S, Otsuka F, <u>Funahashi T</u> , Kaikita K, Sugiyama S, Sakamoto T, Yoshimura M, Shimomura I, Ogawa H.	Hypoadiponectinemia is associated with coronary artery spasm in men.	Circ J	69	1154-1156	2005
Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Kida I, Ohishi M, Horio T, Ouchi N, Ohashi K, Kihara S, <u>Funahashi T</u> , Rakugi H, Ogihara T	Association of hypoadiponectinemia with smoking habit in men.	Hypertension	45	1094-1100	2005
Horio T, Suzuki M, Suzuki K, Takamisawa I, Hiuge A, Kamide K, Takiuchi S, Iwashima Y, Kihara S, <u>Funahashi T</u> , Yoshimasa Y, Kawano Y.	Pioglitazone improves left ventricular diastolic function in patients with essential hypertension.	Am J Hypertens.	18	949-957	2005
Liao Y, Takashima S, Maeda N, Ouchi N, Komamura K, Shimomura I, Hori M, Matsuzawa Y, <u>Funahashi T</u> , Kitakaze M.	Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism.	Cardiovasc Res	67	705-713	2005
Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, <u>Funahashi T</u> , Ouchi N, Walsh K.	Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms.	Nat Med.	11	1096-1103	2005
<u>N. Satoh</u> , A. Shimatsu, K. Yamada, M. Aizawa-Abe, T. Suginami, H. Kuzuya, Y. Ogawa.	An α -glucosidase inhibitor voglibose reduces oxidative stress markers and soluble intercellular adhesion molecule-1 in obese type 2 diabetics	Metabolism		in press	2006
佐藤哲子	メタボリックシンドロームの運動療法の動機づけは？メタボリックシンドロームを伴った肥満患者に対する運動療法の動機づけについて教えてください 特集：メタボリックシンドローム Q&A	運動療法 Q&Aでわかる 「肥満と糖尿病」	第4巻 第4号	681-683	2005
佐藤哲子	SASの減量法は？睡眠時無呼吸症候群を伴う肥満者を上手に減量させるコツがありましたら教えてください 特集：睡眠時無呼吸症候群 (SAS) Q&A肥満	Q&Aでわかる 「肥満と糖尿病」	第4巻 第3号	497-499	2005

A New Simple Method for the Measurement of Visceral Fat Accumulation by Bioelectrical Impedance

MIWA RYO, MD¹
 KAZUHISA MAEDA, MD^{1,2}
 TOMOHIRO ONDA, PHD³
 MITSUHIRO KATASHIMA, MS³
 AKIKO OKUMIYA, PHD⁴
 MAKOTO NISHIDA, MD¹

TOHRU YAMAGUCHI, MS³
 TOHRU FUNAHASHI, MD¹
 YUJI MATSUZAWA, MD⁵
 TADASHI NAKAMURA, MD¹
 ICHIRO SHIMOMURA, MD¹

We and others (1–9) have shown that the accumulation of visceral fat is associated with multiple risk factor syndrome more closely than with the BMI itself or the amount of subcutaneous fat. In these studies, computed tomography (CT) scan at the umbilical level (10) was used for the assessment of visceral fat area (VFA). However, the method is not cost-effective and/or radiation exposure is problematic; thus, it is often unsuitable for screening large groups of individuals. There is a need for a simple and noninvasive method to assess visceral fat accumulation. The bioelectrical impedance analysis (BIA) method, which is based on the electric resistance difference between the fat and components of other organs (11–14), should meet this need. Conventional BIA approaches have estimated total fat content but not regional fat distribution (11–13). Recently, attempts to assess the amount of abdominal subcutaneous fat by the local BIA method were reported (14). Here, we developed a new technique to specifically evaluate VFA by using the abdominal BIA method.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

The study subjects were 59 healthy volunteers and 32 inpatients with suspected cardiovascular disease at Osaka University Hospital. Waist circumference (Wc) at the umbilical level was measured in the late exhalation phase while standing. All subjects underwent the abdominal BIA method to estimate VFA. The voltage occurring at the flank to the flow of current between the umbilicus and the back correlates significantly with VFA and is unaffected by subcutaneous fat area. The voltage becomes larger as visceral fat accumulates even in the subjects with the same Wc because the electric resistance of intra-abdominal fat is greater than that of fat-free mass, and the density of the equipotential lines between two electrodes becomes denser (15) (Fig. 1A). The voltage correlates with the ratio of VFA to the total cross-sectional area of the abdomen, which can be approximated by using Wc^2 (Fig. 1B). Thus, the VFA can be expressed as

$$VFA = a_0 + a_1Vo'Wc^2 \quad (1)$$

where a_0 and a_1 are constants and Vo' is the voltage measured at the flank. Equation 1 means that the distance between two measuring electrodes on the flank must change in proportion to Wc . The voltage Vo' used in equation 1 can be approximately related to the voltage Vo measured with the electrodes with a fixed distance in the form of

$$Vo' = bWcVo \quad (2)$$

where b is a constant. Hence, substituting equation 2 into equation 1, we obtain

$$VFA = a_0 + a_1'VoWc^3 \quad (3)$$

where a_1' is a constant. Then, we calculate presumed VFA by using linear regression equation for volunteers and patients. The correlation between presumed VFA and VFA determined by CT and the effects of posture and respiration on abdominal BIA were investigated. The usefulness of abdominal BIA on evaluating metabolic syndrome was also investigated. Factors characteristic for the metabolic syndrome were defined as follows. Hypertriglyceridemia: serum triglyceride concentration ≥ 150 mg/dl and/or on medication; low HDL cholesterol: serum HDL cholesterol concentration < 40 mg/dl; hypertension: systolic blood pressure ≥ 130 mmHg and/or diastolic blood pressure ≥ 85 mmHg and/or having received antihypertensive medication; and high fasting glucose: serum glucose concentration ≥ 110 mg/dl and/or having received antidiabetic medication. In the Japanese subjects, the best combination of sensitivity and specificity for detecting subjects with multiple risk factors was VFA level ≥ 100 cm² (3). All statistical analysis was performed with Stat View J 5.0 (SAS). The χ^2 test and Mann-Whitney's U test were used to compare the risk factors between two groups: the high and normal VFA groups.

RESULTS — The VFA presumed by abdominal BIA correlated significantly with VFA determined by CT ($r = 0.88$, $P < 0.0001$) (Fig. 1C). This correlation

From the ¹Department of Internal Medicine and Molecular Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; the ²Medical Center for Translational Research, Osaka University Hospital, Suita, Osaka, Japan; the ³Kao Corporation, Tokyo, Japan; the ⁴Area of Nursing Science, Course of Health Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; and ⁵Sumitomo Hospital, Osaka, Japan.

Address correspondence and reprint requests to Miwa Ryo, MD, Department of Internal Medicine and Molecular Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: ryomw@gaia.eonet.ne.jp.

Received for publication 9 November 2004 and accepted 10 November 2004.

Abbreviations: BIA, bioelectrical impedance analysis; CT, computed tomography; VFA, visceral fat area; Wc, waist circumference.

A table elsewhere in this issue shows conventional and Système International (SI) units and conversion factors for many substances.

© 2005 by the American Diabetes Association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

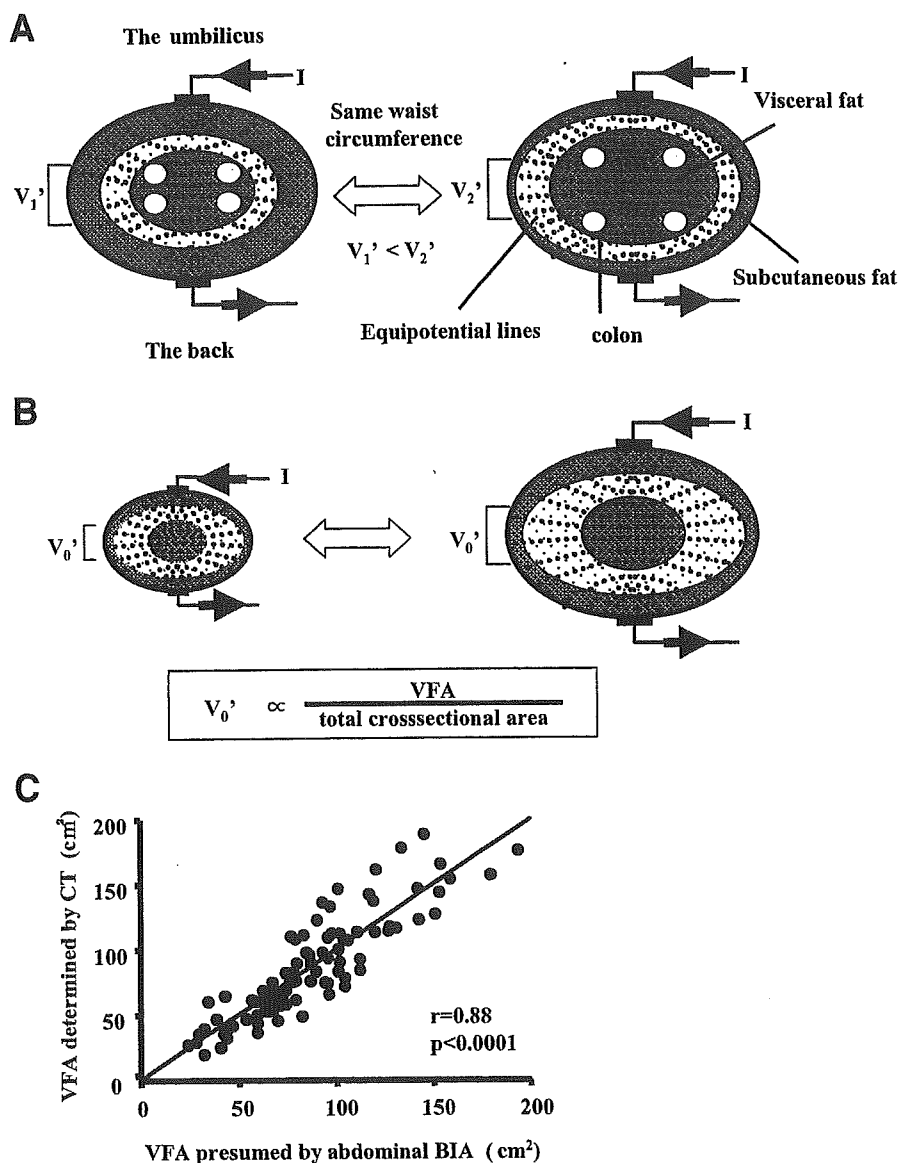


Figure 1—Abdominal bioelectrical impedance analysis (BIA) method. (A) The electric current (I) flows across the abdomen between the umbilicus and the back. Equipotential lines, form inside the peritoneal cavity, penetrate the visceral fat and emerge on the body surface at the flank. The voltage (V_1' , V_2') measured at the flank becomes large with accumulation of visceral fat. (B) The voltage (V_0') measured at the flank correlates with the ratio of visceral fat area (VFA) to the total cross-sectional area of the abdomen. (C) Correlation between VFA presumed by abdominal BIA and VFA determined by computed tomography (CT) ($n = 91$). Voltage measurement condition was the standing-late exhalation.

was significantly stronger than those between VFA determined by CT and Wc ($r = 0.77$), BMI ($r = 0.62$), and percent body fat \times weight ($r = 0.73$ – 0.76) measured by the conventional BIA method based on induction between both hands (HBF-302; Omron, Kyoto, Japan) and both feet (TF-701; Tanita, Tokyo, Japan). In considering the reproducibility and correlation, the best measurement condition was the standing posture and late ex-

halation in both sexes (data not shown). The high VFA group (presumed VFA ≥ 100 cm^2) showed a higher prevalence of hypertriglyceridemia (48.3 vs. 12.9%, $P < 0.001$), low HDL cholesterol (17.2 vs. 11.3%), high fasting glucose (13.8 vs. 9.7%), and hypertension (24.1 vs. 22.6%) than the normal VFA group (< 100 cm^2). The number of risk factors was also significantly higher in the high VFA group than the normal VFA group

(no risk factor: 37.9 vs. 61.3%, single risk factor: 24.1 vs. 22.6%, two risk factors: 24.1 vs. 12.9%, and three risk factors: 13.8 vs. 3.2%, $P < 0.05$).

CONCLUSIONS— Conventionally, Wc is a well-used anthropometric measure for the assessment of visceral fat. Furthermore, the criteria for the metabolic syndrome according to National Cholesterol Education Program (16) include Wc. In fact, Wc correlates with VFA determined by CT (3,9,17). However, these parameters are considerably variable among individuals. It has been reported (3), for example, that men with Wc between 85.0 and 86.0 cm had VFA in the range of 67 and 137 cm^2 in a Japanese population. Furthermore, in premenopausal women, Wc underestimates visceral fat amount because of the accumulation of abdominal subcutaneous fat (18). For the above reason, we decided to develop a new method that is simple and accurately measures VFA.

Our new method using BIA is quite simple and noninvasive for evaluation of visceral fat amount. The time required for measurement is only a few minutes, and the instrument is inexpensive and portable. This method requires no advanced skills on the part of the operator, and, on the other hand, subject cooperation is minimal. Excellent correlation was observed in the estimation of visceral fat accumulation between abdominal BIA method and CT. Indeed, the prevalence of multiple risk factors was significantly higher in the high VFA group than in the normal VFA group.

Collectively, the abdominal BIA method should become a useful instrument in routine clinical practice for the evaluation of visceral fat accumulation associated with the metabolic syndrome.

Acknowledgments— We are grateful to Dr. Kazuo Maki and Masaki Fukuhara of Kao Corporation for their assistance in developing the visceral fat-measuring apparatus and Dr. Masahiko Takahashi and Dr. Kikuko Hotta for their great help in measuring VFA by the abdominal BIA method at Osaka University Hospital.

References

1. Nakamura T, Tokunaga K, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, Islam AHMW, Keno Y, Kobatake T, Nagai Y,

- Fujioka S, Tarui S, Matsuzawa Y: Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. *Atherosclerosis* 107:239–246, 1994
2. Matsuzawa Y, Nakamura T, Shimomura I, Kotani K: Visceral fat accumulation and cardiovascular disease. *Obes Res* 3 (Suppl. 5):645S–647S, 1995
 3. The Examination Committee of Criteria for “Obesity Disease” in Japan, Japan Society for the Study of Obesity: New criteria for “obesity disease” in Japan. *Circ J* 66:987–992, 2002
 4. Pascot A, Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Nadeau A, Prud'homme D, Tremblay A, Lemieux S: Contribution visceral obesity to the deterioration of the metabolic risk profile in men with impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 43:1126–1135, 2000
 5. Pascot A, Despres JP, Lemieux I, Almeras N, Bergeron J, Nadeau A, Prud'homme D, Tremblay A, Lemieux S: Deterioration of the metabolic risk profile in women. *Diabetes Care* 24:902–908, 2001
 6. Fujimoto WY, Bergstrom RW, Boyko EJ, Chen KW, Leonetti DL, Newell-Morris L, Shofer JB, Wahl PW: Visceral adiposity and incident heart disease in Japanese-American men: the 10-year follow-up results of the Seattle Japanese-American Community Diabetes Study. *Diabetes Care* 22:1808–1812, 1999
 7. Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L: Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* 23:465–471, 2000
 8. Hatashi T, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Newell-Morris L, Kahr SE, Fujimoto WY: Visceral adiposity and the prevalence of hypertension in Japanese Americans. *Circulation* 108:1718–1723, 2003
 9. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T: Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J* 68:975–981, 2004
 10. Yoshizumi T, Nakamura T, Yamane M, Isram AHMW, Menju M, Yamasaki K, Arai T, Kotani K, Funahashi T, Yamashita S, Matsuzawa Y: Abdominal fat: standardized technique for measurement at CT. *Radiology* 211:283–286, 1999
 11. Lukaski HC, Johnson PE, Bolonchuk WW, Lykken GI: Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. *Am J Clin Nutr* 41:810–817, 1985
 12. Lukaski HC, Bolonchuk WW, Hall CB, Siders A: Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *J Appl Physiol* 60:1327–1332, 1986
 13. Nakadomo F, Tanaka K, Hazama T, Maeda K: Validation of body composition assessed by bioelectrical impedance analysis. *Jpn J Appl Physiol* 20:321–330, 1990
 14. Scharfetter H, Schlager T, Stollberger R, Felsberger R, Hutten H, Hinghofer-Szalkay H: Assessing abdominal fatness with local bioimpedance analysis: basics and experimental findings. *Int J Obes* 25:502–511, 2001
 15. Geddes LA, Baker LE: The specific resistance of biological material: a compendium of data for the biomedical engineer and physiologist. *Med Biol Eng* 5:271–293, 1967
 16. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486–2497, 2001
 17. Rankinen T, Kim SY, Perusse L, Despres JP, Bouchard C: The prediction of abdominal visceral fat level from body composition and anthropometry: ROC analysis. *Inter J Obes* 23:801–809, 1999
 18. Kotani K, Tokunaga K, Fujioka S, Kobatake T, Keno Y, Yoshida S, Shimomura I, Tarui S, Matsuzawa Y: Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int J Obes* 18:207–212, 1994

Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells

Jimmy R. Thériault^a, Salamatu S. Mambula^a, Tatsuya Sawamura^b,
Mary Ann Stevenson^a, Stuart K. Calderwood^{a,*}

^a Department of Radiation Oncology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School,
21-27 Burlington Avenue, Boston, MA 02215, USA

^b Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishirodai, Suita, Osaka, Japan

Received 20 December 2004; revised 2 February 2005; accepted 14 February 2005

Available online 2 March 2005

Edited by Masayuki Miyasaka

Abstract Extracellular HSP70 has been found to participate in both innate and adaptive immune responses. However, little is known about the molecular mechanisms that mediate this process. Previous reports suggest that HSP70 interacts with antigen presenting cells (APC) through a plethora of surface receptors. In this study, we have examined the relative binding of potential HSP70 receptors and found high affinity binding to LOX-1 but not other structures with a role in HSP70-APC interactions such as LRP/CD91, CD40, TLR2, TLR4 or another c-type lectin family member (DC-SIGN) closely related to LOX-1. In addition to APC, HSP70 can avidly bind to non-APC cell lines, especially those from epithelial or endothelial background.
© 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Heat shock protein 70; LOX-1; Toll-like receptor; CD40; Endothelial

1. Introduction

Heat shock protein 70 (HSP70) has been well characterized as an intracellular molecular chaperone involved in nascent and damaged intracellular protein refolding [1,2]. However, a novel extracellular role has been ascribed to this protein since HSP70-derived tumor preparations can elicit *in vivo* tumor rejection [3,4]. HSP70 has been shown to capture antigenic peptides and trigger their cross-presentation through immune effector cells [5]. HSP70 also mediates both cytokine expression and maturation of antigen presenting cell (APC) [5–9]. This HSP70 extracellular function is also conserved among several other HSP family members including gp96/GRP94, calreticulin and HSP60 [4]. Although, HSP70 shows exciting potential as an adjuvant molecule, the mechanism(s) through which it exerts this function remains elusive. Previous studies have demonstrated that the anti-tumoral immune function of HSPs is activated through receptor-mediated endocytosis because of the low level (nanomolar) of HSPs needed to see an immune response and the saturability of

the process [10,11]. A growing number of surface receptors for HSPs such as scavenger receptors LOX-1, CD94 and scavenger receptor A (SR-A), the LDL-receptor-related protein/ α 2-macroglobulin CD91 receptor, the Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 and CD40 have been associated with endocytosis/phagocytosis and/or are involved in the induction of the pro-inflammatory response [12–16].

SRs are membrane endocytic receptors recognizing modified or altered molecules such as lipoproteins and polyanionic ligands [17–19]. Delneste et al. [12] have shown convincingly that LOX-1, a class E SR, is an important HSP70 binding structure present on the surface of dendritic cells (DC). This type II calcium-dependent SR also belongs to c-type lectin domain receptor family comprising other members, such as DC-SIGN, CD94 and DECTIN-1 [20,21]. LOX-1 has been associated with functions related to immunity including leukocyte homing as the tethering receptor responsible for leukocyte adhesion rolling on endothelial cells [22]. LOX-1 also binds and internalizes oxidized LDL (ox-LDL), an important process involved in atherosclerosis [23]. Interestingly, another c-type lectin receptor found on Natural Killer (NK) cells CD94 can bind HSP70 and the endoplasmic reticulum (ER) resident Gp96 interacts to SR-A illustrating the importance of SRs in HSP-mediated immune function [14].

LRP/CD91 has also been proposed as a HSP70 receptor [15]. LRP/CD91 is a multifunctional plasma membrane receptor recognizing as well as SR family members various ligands, such as lipoproteins, bacterial toxins and more specifically α 2-macroglobulin [24]. LRP/CD91 is synthesized as a 600-kDa precursor processed into 515-kDa (α) and 85-kDa (β) subunits [24]. The 85-kDa subunit (β) possesses a transmembrane domain and binds the extracellular 515-kDa subunit (α) through non-covalent interactions [25]. The HSP70 binding site on CD91 has been mapped to the first part of the α subunit and HSP70/CD91 interaction can be competed by α 2-macroglobulin and receptor-associated protein (RAP) [15,16,26]. LRP/CD91 binding is evidently not restricted to HSP70 but encompasses other HSPs (gp96/GRP94, calreticulin and HSP90) [15]. Interestingly, CD91/calreticulin complexed with surfactant proteins (SP-A and SP-D) associated with foreign debris can initiate phagocytosis and pro-inflammatory response in lungs [27].

HSP70-peptide complex binding is followed by antigen cross-presentation in APC. HSP70-peptide complexes

*Corresponding author. Fax: +1 617 632 0635.

E-mail address: scalderw@bidmc.harvard.edu (S.K. Calderwood).

proceed through specific routes for peptide representation on the cell surface by major histocompatibility complex (MHC) receptor (cross-presentation) [10,11]. Such peptides are taken up into the ER through ABC family transport system that involves the transporters associated with antigen processing (TAP)-TAP1 and TAP2 proteins. TAP1 and TAP2 form a complex that transports peptides across the ER membrane and delivers them to MHC class I (MHCI) protein complexes [28,29]. These MHC I complexes are transported to the cytoplasm via a vesicular system and displayed on the cell surface where they are subject to surveillance by cytotoxic, CD8+ lymphocytes [30].

In parallel with cross-presentation, HSP70 can initiate a potent innate immune response [6,8,31]. After HSP70 binding to APC, a pro-inflammatory response is generated through the activation of various immune processes, such as cytokine production (IL-1 β , TNF- α and IL-6, etc.), costimulatory molecule expression (MHC class II and CD86) and nitric oxide (NO) release. Our group and others have demonstrated that two members of the Toll-like receptor family TLR2 and 4 activate HSP-mediated pro-inflammatory cytokine production via the MyD88/IRAK/NF- κ B signal transduction pathway in a CD14-dependent fashion [6–8]. Extracellular HSP70 also stimulates intracellular calcium mobilization. Artificial depletion of the calcium content using intracellular Ca²⁺ chelator BAPTA-AM interferes with the I κ B α /NF- κ B pathway leading to cytokine expression inhibition. In addition to TLRs, other HSP70 signaling receptors, such as CD40 have shown some pro-inflammatory activity [32]. CD40 plays an essential role in the development of HSP70-induced autoimmune form of diabetes [33]. In this particular context, HSP70 promotes cytokine production through a CD40-dependent mechanism but induces functional maturation of bone marrow-derived DC in the absence of a “standard” phenotypic maturation [33].

In this study, the relative binding affinity of known and unknown HSP70 receptors, such as LOX-1, DC-SIGN, LRP/CD91, TLR2, TLR4 and CD40 in HSP70–cell surface interaction has been evaluated using stable transfectants overexpressing these receptors in non-APC cells. Among the receptors proposed to specifically bind HSP70, only c-type lectin receptor LOX-1 showed significant HSP70 binding affinity. Intriguingly, endothelial/epithelial cells possessed membrane HSP70 receptor(s) suggesting a role of HSP70 in other cellular function(s) than anti-tumor immune response.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

THP-1, RAW 264.7, wild-type K562 and K562 overexpressing human DC-SIGN were grown in RPMI 1640 medium 10% FBS supplemented with 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin [34]. IMR90 were cultured in minimal essential medium (MEM) 15% FBS with 2 mM glutamine. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were maintained in endothelial basal medium-2 (EBM-2) supplemented with Clonetics™ SingleQuot[®] (Cambrex/Bio-wittaker). The melanoma A375, wild-type HEK293 (293), HEK293 overexpressing human TLR2 or 4 (293-TLR2, 293-TLR4) (G418), HEK293 overexpressing the PMX empty vector (293 EV Ley) (G418), HEK293 overexpressing murine CD40 (293 CD40 Ley) (G418), HeLa, HeLa S3 and MCF-7 were grown in DMEM 10% FBS [8,35]. Prostate cancer cells PC-3, Chinese Hamster Ovary (CHO), CHO overexpressing human LOX-1 (CHO-LOX-1), CHO

LRP null, CHO LRP null overexpressing the second extracellular binding region of the alpha subunit of human LRP linked to the beta subunit (LRP2) (aa. 787–1164 + 3765–4525) (G418) or the fourth region of the alpha subunit fused with the beta subunit (LRP4) (aa. 3274–4525) (G418) were maintained in F-12 (Ham) nutrient mixture with 10% FBS [36]. In the case of CHO-LOX-1, clonal selection was kept with 10 μ g/ml blasticidin S. For all stable transfectants using G418 as a selecting agent, cells were incubated with G418 at a final concentration of 0.4 μ g/ml. Each experiment was carried out in cell lines grown in exponential conditions.

2.2. Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages

Isolation of peritoneal macrophages was done as previously described [37]. Briefly, peritoneal macrophages were isolated from 6–10-week-old C57BL/6 background mice. The mice were injected intraperitoneally with 3 ml of thioglycollate, and after 4 days peritoneal exudate cells were harvested by lavage with 10 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and penicillin/streptomycin.

2.3. Alexa 488-labeled purified HSP70 preparation

Human melanoma cells A375-MEL or mouse MISA cells have been used as starting material for HSP70–peptide complexes (HSP70.PC) preparation because high endogenous HSC70 and/or HSP70 levels were detected in these cell types. HSP70.PC purification was executed as previously reported [38]. Briefly, a 10-ml cell pellet of tumor cells was homogenized in 40 ml hypotonic buffer (10 mM NaHCO₃, 0.5 mM PMSF, pH 7.1) by Dounce homogenization. The homogenate was first centrifuged at 10000 \times g for 30 min and the supernatant was recentrifuged for 60 min at 100000 \times g. The sample buffer was changed to buffer D (20 mM Tris–acetate, 20 mM NaCl, 15 mM β -mercaptoethanol, 3 mM MgCl₂, and 0.5 mM PMSF, pH 7.5) using PD-10 column (Amersham-Biosciences). The sample was applied directly to a 5-ml ADP–agarose column (Sigma–Aldrich) which was equilibrated with buffer D. HSP70.PC was eluted from ADP–agarose column with 3 mM ADP in buffer D. The sample buffer was changed to FPLC buffer (20 mM sodium mono- and diphosphate, 20 mM NaCl, pH 7.0) with PD-10 column. The supernatant was applied to a DEAE anion exchange column equilibrated with FPLC buffer (Amersham-Biosciences). HSP70.PC was eluted with the FPLC buffer containing 150 mM NaCl. All proteins were quantitated with Bradford assay. Alexa 488 labeling on HSP70.PC was carried out according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes, USA). BSA was used as negative control. No degradation of the HSP70.PC purified preparation was observed by Coomassie staining and the presence of HSP70 in the preparation was confirmed by Western blotting using a mouse monoclonal antibody specific against HSP70 (SPA-810, Stressgen).

2.4. HSP70.PC binding assay

Non-trypsinized cells (2×10^5) were washed twice in PBS containing 0.5% FBS, 0.05% NaN₃ and 1 mM CaCl₂ (PFNC) and incubated with 150 nM Alexa 488-labeled BSA or HSP70.PC for 30 min on ice with gentle shaking. The cells were washed in PFNC twice and Alexa 488-labeled HSP70.PC binding was monitored by flow cytometry (Becton Dickinson). For blocking experiments, cells were pre-incubated with 120 μ g/ml of anti-human LOX-1 (JTX92) (Dr. Sawamura) for 30 min at 37 °C and then washed twice with PFNC before HSP70.PC binding assessment.

3. Results

3.1. Exogenous HSP70.PC can specifically bind to APC

As mentioned earlier, HSP70 anti-tumoral immune function is probably activated through its interaction with a surface membrane receptor [10]. Our group and others have demonstrated that exogenous HSP70 can bind to the surface of human monocytes, splenocytes and DC [6,15,39]. We have analyzed by flow cytometry HSP70 binding to a human pre-monocytic cell line (THP-1), to mature murine macro-

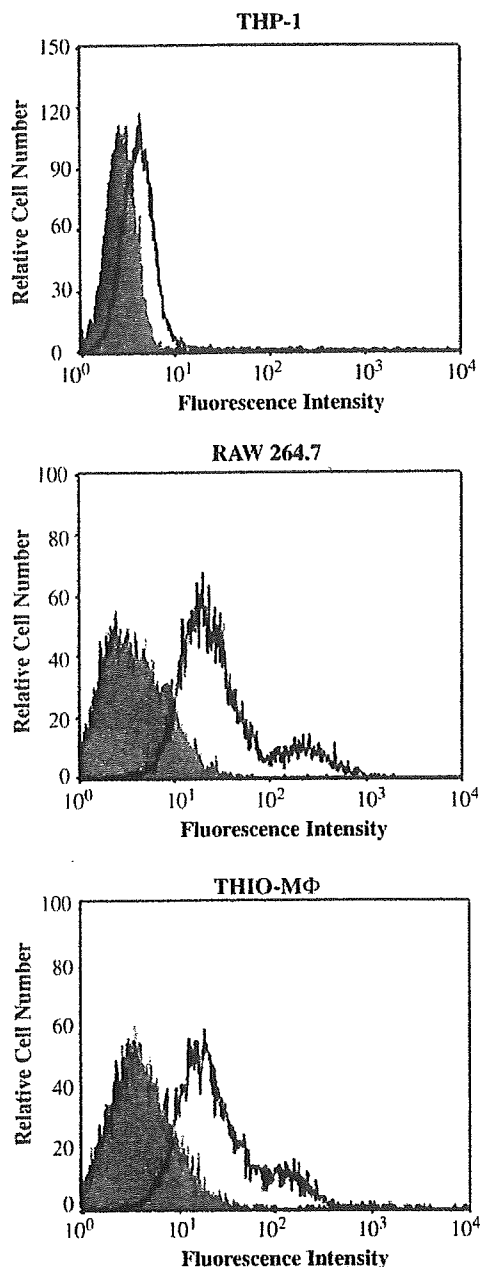


Fig. 1. Exogenous HSP70.PC specifically binds to monocytes and macrophages. Pre-monocytic THP-1, mature macrophages RAW 254.7 or thioglycollate-elicited peritoneal macrophages were incubated with Alexa 488-labeled BSA or HSP70.PC at a concentration of 10 μ g/ml (150 nM) on ice for 30 min with gentle shaking. HSP70.PC binding was monitored by flow cytometry (FL1). Shaded gray and thick black line histograms corresponded, respectively, to BSA and HSP70.PC binding. Experiments were carried out three times with similar results.

phages (RAW 264.7) and to thioglycollate-elicited peritoneal macrophages using human HSP70.PC (Fig. 1). HSP70 binding intensity differed between each cell type reflecting probably differences in HSP70 receptor(s) expression. Interestingly, at least two peaks were generated when HSP70.PC was associated with RAW 264.7 cells and thioglycollate-elicited macrophages suggesting the possibility of multiple HSP70 receptors on macrophages (Fig. 1).

3.2. Absence of association between HSP70.PC and LRP/CD91 or TLR 2, 4 or CD40

It has been suggested that HSP70 can interact directly with LRP/CD91 [15]. Nonetheless, some skepticism has been directed to the involvement of CD91 in HSP binding since independent studies conducted by Berwin et al. [40] showed that CHO cells, which express CD91, do not bind gp96. LRP/CD91 is composed of more than 4500 amino acids making difficult the expression of the full-length protein in an artificial system (stable transfection). To overcome this problem, LRP/CD91 mini-receptors have been prepared in CHO LRP null line to avoid the possibility of background binding to endogenous LRP/CD91 [41]. LRP/CD91 ligands mainly interact with the second and/or the fourth binding domain present on its alpha subunit (CHO LRP 2 and LRP 4) [41]. A residual HSP70.PC binding was seen on wild-type CHO (CHO-K1) suggesting the presence of endogenous HSP70 receptors. Surprisingly, no sign of high affinity HSP70.PC binding was observed in CHO-LRP 2 and 4 (Fig. 2). Also, there was no significant difference in HSP70.PC binding between wild-type CHO cells (CHO-K1) and CHO cells devoid of a functional LRP/CD91 gene suggesting that LRP/CD91 was not the high affinity HSP70 receptor present on CHO (Fig. 2).

The HSP70-induced pro-inflammatory response has been functionally related to TLR2 and/or TLR4 in collaboration with CD14 suggesting these molecules as potential HSP70 receptors [6–8]. Previous experiments have ruled out the possibility that CD14 is a HSP70 receptor since no interaction is observed between HSP70 and CD14-overexpressing CHO cells [12]. Moreover, a specific neutralizing anti-CD14 antibody (clone MY4) does not inhibit HSP70 binding to APC [42]. In order to determine whether TLR2 and TLR4 are HSP70 important receptors, we have stably transfected expression vectors encoding those receptors in HEK293 cells. Such cells showed enhanced activation of NF- κ B activity when challenged with *E. coli* LPS or mammalian HSP70 indicating efficient expression of the proteins in HEK293 [8]. Intriguingly, wild-type HEK293 cells can significantly bind exogenous HSP70 showing that HSP70 binding was not restricted to APC (Fig. 3A). Nonetheless, no greater association was obtained when human TLR2 or TLR4 was overexpressed in these cells (Fig. 3A).

Concerning CD40, HSP70 binding to this molecule was reported to be ADP-dependent requiring only the HSP70 ATPase domain [32]. This interaction was evidently further stabilized with the presence of HSP70 peptide substrate. Nevertheless, in our studies, HSP70.PC binding assessment to HEK293 embryonic kidney cells overexpressing the murine form of CD40 revealed no significant interaction between HSP70.PC and CD40 even when HSP70 binding assays were carried out at high concentrations (up to 50 μ g/ml) (Fig. 3B) (data not shown). Surface expression of CD40 was confirmed in these cells using an anti-CD40 antibody in Western Blotting and by flow cytometry signifying that CD40 does not play a major role as a HSP70 receptor (data not shown) [35]. The HSP70 binding affinity of HEK293 overexpressing an empty vector was significantly reduced in comparison from the one obtained with wild-type HEK293 (Figs. 3A and B). It is possible that the provenance of these cell lines, different culture conditions or selection of stably overexpressing clone has favored the establishment of different HEK293 cell populations

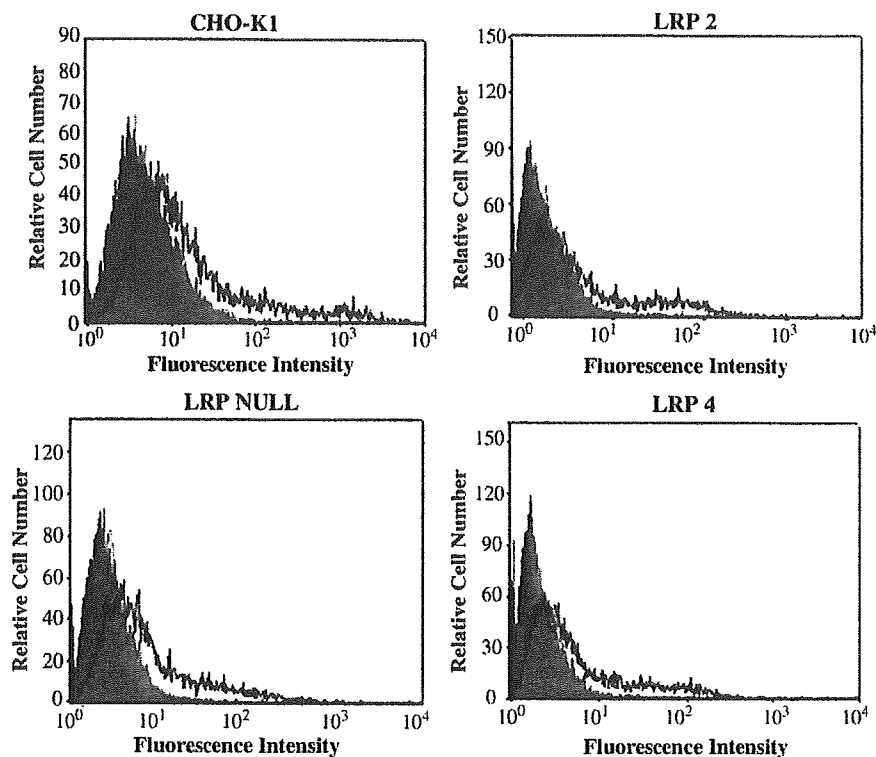


Fig. 2. Extracellular HSP70.PC does not interact with LRP/CD91. Wild-type CHO, CHO devoid of a functional LRP/CD91 gene (LRP NULL) or overexpressing the second or the fourth LRP/CD91 binding domain present on the alpha subunit (LRP 2 or LRP 4) were subjected to a HSP70 binding assay as mentioned in Section 2. Shaded gray and thick black line histograms corresponded to BSA and HSP70.PC binding, respectively. Experiments were carried out three times with similar results.

expressing variable amounts of endogenous HSP70 receptor(s). However, in each cell population, independent controls were carried out, indicating minimal high affinity binding of HSP70 to TLR2, TLR4 and CD40 (data not shown).

3.3. C-type lectin receptor LOX-1 interacted with HSP70.PC

We next examined the role of SR LOX-1 which has been previously associated with HSP70.PC binding capacity [12]. We observed abundant HSP70.PC-LOX-1 interaction in stable transfectant overexpressing the human LOX-1 receptor on CHO (Fig. 4) [36]. CD94, another member of c-type lectin receptor family member expressed on NK cells, possesses some HSP70 binding affinity [13]. Since the extracellular domains of both proteins comprise almost exclusively the c-type lectin domain, we wanted to determine if other c-type lectin family member such as DC-SIGN could interact with HSP70. As illustrated in Fig. 4, no clear HSP70 binding was seen on the lymphoblastic cell line K562 when human DC-SIGN was overexpressed at the HSP70 concentration tested suggesting that DC-SIGN was not a high affinity HSP70.PC binding molecule [34]. These experiments indicate some specificity in the interaction of the c-type lectin family with HSP70.PC.

3.4. HSP70.PC binding to endothelial/epithelial cells

Since significant HSP70 binding to HEK293 embryonic kidney cells was observed, we examined whether this observation could be extended to other non-APC cell types. In fact,

previous studies had suggested that extracellular HSP70 might have properties independent of the immune response, in for instance, cytoprotection in neuronal cells [43]. To explore the extent of this possibility, HSP70 binding assays using HSP70.PC at a concentration of 10 μ g/ml were performed on various cell lines including endothelial/epithelial, melanoma cells and fibroblasts. Extracellular HSP70.PC bound avidly to human endothelial cells HUVEC, prostate cancer PC-3 cells and HeLa cells while binding to human fibroblasts IMR90, breast cancer cells MCF-7 or melanoma cells A375 was minimal (Figs. 5A and B). As observed for HEK293, HeLa coming from two different backgrounds (HeLa S3 or HeLa) appeared to bind with different avidity to HSP70.PC (Fig. 5A).

HSP70 binding to HUVEC correlates with previous reports showing surface expression of the c-type lectin receptor LOX-1 on endothelial cells [44]. As our studies indicate that LOX-1 is an effective HSP70 receptor, we tested whether LOX-1 could account for HSP70.PC binding to HUVEC. We performed an inhibition experiment using an anti-human LOX-1 blocking antibody (JTX92) on CHO LOX-1 and HUVEC cells. As seen in the Fig. 5C, HSP70.PC binding to CHO LOX-1 was inhibited by approximately 70% by the JTX92 antibody but not a specific control antibody against DC-SIGN (data not shown). Nevertheless, JTX92 antibody had no effect on HSP70.PC binding to HUVEC indicating that LOX-1 does not play a major role in HSP70-HUVEC binding. Interestingly, HSP70.PC binding to PC-3 and HeLa was also not affected by pre-incu-