

174. 脂肪酸結合タンパクの新たな臓器間ネットワークの解明

古橋 真人

Key words: 脂肪酸結合タンパク, アディポカイン,
脂肪分解, 左室拡張能障害,
アンジオテンシン II 受容体拮抗薬

札幌医科大学 医学部
循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座

緒言

脂肪酸結合タンパク (fatty acid-binding protein: FABP) は長鎖脂肪酸やエイコサノイドのような疎水性リガンドと結合する約 130 個のアミノ酸から構成される分子量約 14~15 kDa の脂質シャペロンファミリーで、これまでに 9 つのアイソフォームが報告され、高発現もしくは単離された組織や細胞にちなんで、肝型 (L-FABP/FABP1), 腸型 (I-FABP/FABP2), 心臓型 (H-FABP/FABP3), 脂肪細胞型 (A-FABP/FABP4/aP2), 表皮型 (E-FABP/FABP5/malI), 回腸型 (II-FABP/FABP6), 脳型 (B-FABP/FABP7), ミエリン型 (M-FABP/FABP8), 精巣型 (T-FABP/FABP9) と名付けられている¹⁾。FABP の中で FABP4 は脂肪細胞とマクロファージに発現し、炎症および細胞内脂質代謝に深く関わる事が報告されている¹⁻³⁾。我々は、これまでに糖尿病および動脈硬化に対して FABP4 が新規の薬物治療ターゲットになりうることを示した⁴⁾。近年、アミノ酸配列上シグナルペプチドを持たないにもかかわらず、FABP4 が脂肪細胞から分泌されることが報告され⁵⁾、疫学的な検討から FABP4 の血中濃度が肥満、糖尿病、高血圧、動脈硬化などと関連する可能性が示されている。今回、未だ十分には解明されていない FABP4 の分泌機構⁶⁾、心機能との関連⁷⁾、さらには薬剤 (特に降圧薬) による制御⁸⁾ について検討を行った。

方法

1. 経口糖負荷およびファーストフード負荷における FABP4 濃度の推移の検討

健診で 75g 経口糖負荷試験を勧められた 53 名 (男 25/女 28 名, 平均年齢 66.0 歳) を対象に負荷前, 1 時間後, 2 時間後に血糖, インスリンに加え, FABP4 濃度を測定した。さらに, ファーストフード (1,000 kcal 食) 負荷を施行したボランティア男性 20 名 (平均年齢 40.2 歳) を対象に負荷前, 2 時間後, 4 時間後, 6 時間後で血糖, インスリン, 脂質値とともに FABP4 濃度を測定した。FABP4 濃度は Biovendor R&D 社 (FABP4) の ELISA キットを用いて測定した。

2. 3T3-L1 脂肪細胞からの FABP4 の分泌機構の検討

分化させた 3T3-L1 脂肪細胞に各種薬剤を作用させ, 2 時間後の培養液中への FABP4 分泌をウェスタンブロット法で検討した。コントロールとして非分泌蛋白である GAPDH を用いた。薬剤として, 低 (1 mg/ml)・高 (4.5 mg/ml) グルコース, インスリン (0.5 μ g/ml), パルミチン酸 (1 mM), 汎 β 刺激薬イソプロテレノール (1-100 μ M), β 3 刺激薬 CL316243 (1-100 μ M), アデニル酸シクラーゼ (AC) 活性化薬フォルスコリン (20 μ M), cAMP アナログ dibutyryl-cAMP (db-cAMP) (0.5 mM), プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害薬 H-89 (10 μ M), ホルモン感受性リパーゼ (HSL) 阻害薬 CAY10499 (2 μ M), 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) (0.1-10 μ M), プロテインキナーゼ G (PKG) 阻害薬 KT5823 (5 μ M) を使用した。

3. 心機能と FABP4 濃度の検討

当教室が 35 年以上継続している端野・壮瞥町コホート研究において 2011 年に健診を受診した女性 357 名と 2012 年に健診を受診した男性 277 名のうち心エコー検査を施行し得た薬剤内服のない女性 108 名 (平均年齢 60 歳) と男性 82

名（平均年齢 66 歳）を対象とした。 血圧測定後に採血を行い、糖脂質値に加え血清 FABP4 濃度を測定した。 また、心エコーで各種指標を計測した。

4. 降圧薬による FABP4 濃度制御の検討

無治療の本態性高血圧患者にアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) であるカンデサルタン (8 mg/day, n = 7:男 3 女 4, 平均 56 歳) を入院下で 2 週間もしくはオルメサルタン (20 mg/day, n = 9: 男 4 女 5, 平均 57 歳) を外来で 12 週間投与した。 さらに、アムロジピン 5 mg/day を少なくとも 4 週間以上服用している高血圧患者で降圧不十分例に対してバルサルタン (80 mg/day, n = 94: 男 49 女 54, 平均 61 歳) もしくはテルミサルタン (40 mg/day, n = 91: 男 46 女 45, 平均 61 歳) を 8 週間投与した。 投与前後で血圧測定と採血を行い、糖脂質値に加え血清 FABP4 濃度を測定した。

5. ARB による FABP4 の分泌制御の検討

3T3-L1 脂肪細胞に 10 μ M の ARB (カンデサルタン, オルメサルタン, バルサルタン, テルミサルタン) を 2 時間もしくは 24 時間添加した際の FABP4 の発現を定量的 RT-PCR で検討した。 また、イソプロテレノールもしくはアンジオテンシン II 刺激の有無における各種 ARB の 2 時間刺激における FABP4 の分泌をウェスタンブロット法で検討した。

結 果

1. 経口糖負荷およびファーストフード負荷における FABP4 濃度の推移の検討

糖負荷により血糖およびインスリンは増加したが、FABP4 濃度は経時的に低下を認めた (図 1 A)。 一方、ファーストフード負荷により血糖は 2 ~ 4 時間後にかけて軽度減少し、6 時間後回復傾向を示した。 インスリン値は 2 時間後をピークに著明に亢進し、その後減少傾向となった。 中性脂肪値は 2 ~ 4 時間後にかけて上昇し、その後プラトーになった。 FABP4 濃度は 2 ~ 4 時間後にかけて経時的に低下を認め、以後回復傾向を示した (図 1 B)。 これらの結果から、血糖、脂質、インスリンの変動が FABP4 の分泌調節に関与する可能性が考えられた。

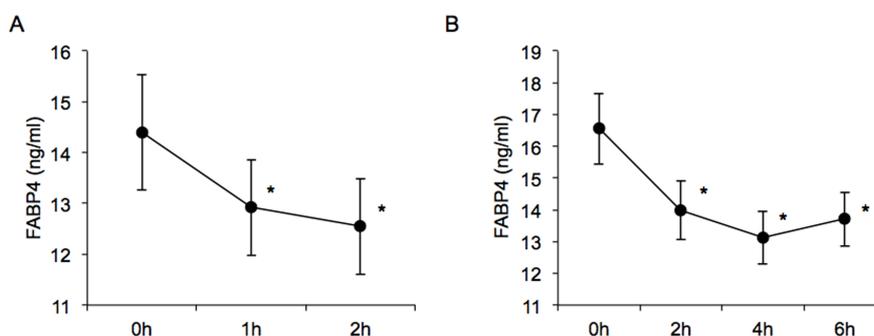


図 1. 負荷試験における FABP4 濃度の経時的变化。

A) 75g 経口糖負荷試験, B) ファーストフード (1,000 kcal 食) 負荷試験. *P < 0.01 vs. 0 h (One-way repeated measures ANOVA).

2. 3T3-L1 脂肪細胞からの FABP4 の分泌機構の検討

グルコース, パルミチン酸, インスリン単独では FABP4 分泌に影響を及ぼさなかったが, イソプロテレノールによる β 受容体刺激や db-cAMP による PKA 活性化により, FABP4 の分泌が増加した (図 2)。

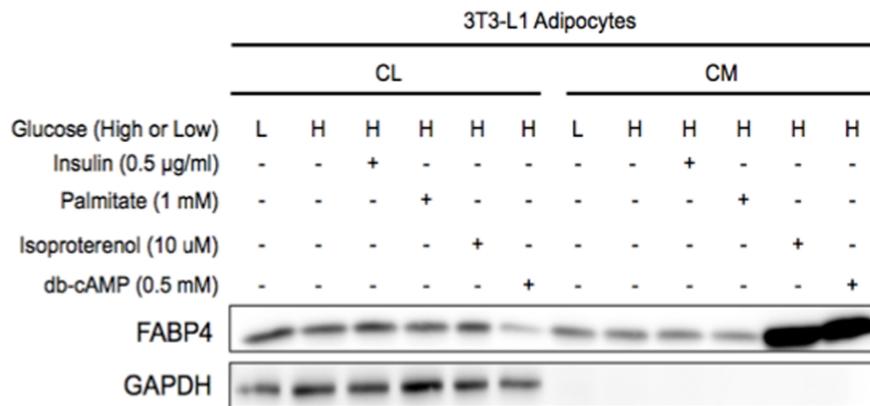


図2. 3T3-L1 脂肪細胞からの FABP4 の分泌.

分化させた 3T3-L1 脂肪細胞に各種薬剤を作用させ、2 時間後の培養液中への FABP4 分泌をウェスタンブロット法で検討した. コントロールとして非分泌蛋白である GAPDH を用いた.

さらに、イソプロテレノールや CL316243 の β 受容体刺激、フォルスコリンによる AC 活性化、db-cAMP による PKA 活性化は脂肪分解の誘導とともに濃度依存性に FABP4 の分泌を増加させ、インスリンや H-89 による PKA の抑制および CAY10499 による HSL の抑制は FABP4 分泌を低下させた (図 3). ANP によるグアニル酸シクラーゼ (GC)-PKG の活性化による脂肪分解誘導も濃度依存性に FABP4 分泌を増加させ、その効果は PKG 阻害薬 KT5823 および CAY10499 により阻害された. このことから、脂肪細胞からの FABP4 分泌は脂肪分解と関連しており、AC-PKA および GC-PKG 経路に制御されていることが明らかになった (図 3).

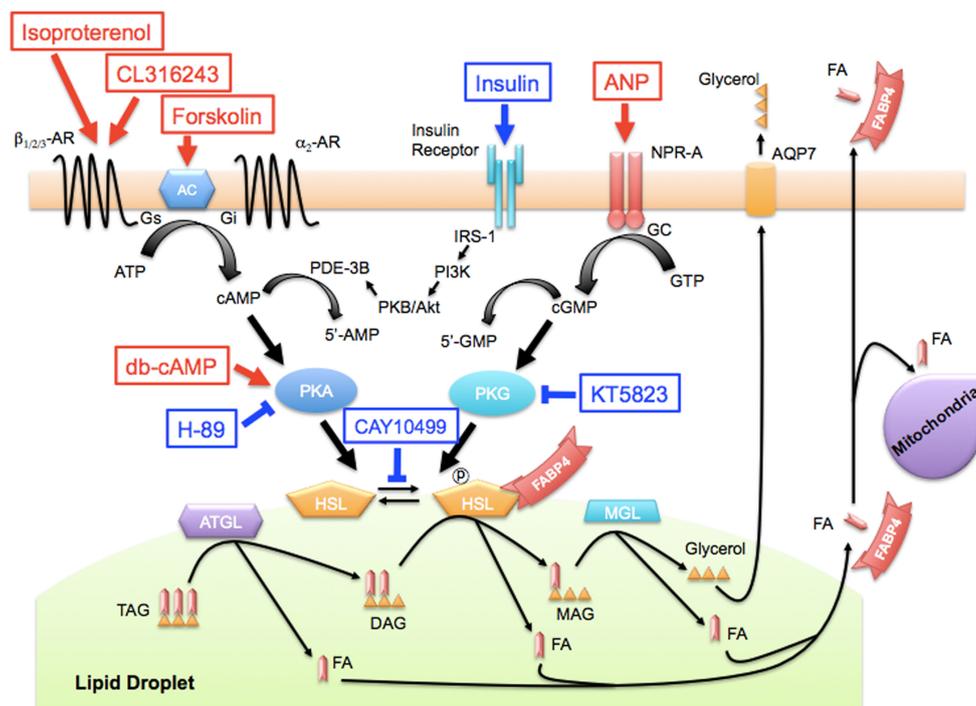


図3. 脂肪分解と関連した脂肪細胞からの FABP4 の分泌.
脂肪分解とともに FABP4 が分泌される.

3. 心機能と FABP4 濃度の検討

FABP4 濃度は年齢, BMI, 血圧, LDL コレステロール, インスリン抵抗性の指標である HOMA-R, 左室中隔と後壁の平均壁厚と正に, HDL コレステロール, 推定糸球体濾過量, 拡張能の指標である側壁の拡張早期僧帽弁輪部移動速度 (e') と有意に負に相関を示したが (図 4), 左室拡張末期径, 左室駆出率, 左室重量係数とは相関を認めなかった. 年齢, 性別, 血圧で補正した重回帰分析では, FABP4 濃度が e' の独立した説明変数であった. このことから, 一般住民において血清 FABP4 濃度の上昇は年齢, 性別, 血圧とは独立して左室拡張能障害と関連する事が示された.

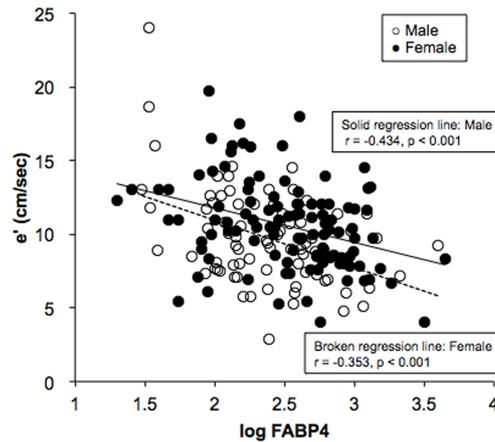


図 4. 拡張早期僧帽弁輪部移動速度 (e') と FABP4 濃度の相関.

端野・壮瞥町コホート研究において薬剤内服のない女性 108 名 (平均年齢 60 歳) と男性 82 名 (平均年齢 66 歳) を対象とし, 拡張早期僧帽弁輪部移動速度 (e') と血清 FABP4 濃度をプロットした.

4. 降圧薬による FABP4 濃度制御の検討

カンデサルタン, オルメサルタン, バルサルタン, テルミサルタンの投与前後で BMI, 血糖, インスリン値, HOMA-R, 脂質値に有意な変化を認めなかったが, いずれも有意に血圧を 7-19%低下させ, 血清 FABP4 濃度を 8-20%減少させた (カンデサルタン: 23.3 ± 2.7 vs. 19.9 ± 1.8 ng/ml, $P = 0.034$; オルメサルタン: 13.8 ± 1.5 vs. 11.1 ± 1.3 ng/ml, $P = 0.012$; バルサルタン: 15.8 ± 0.6 vs. 13.5 ± 0.6 ng/ml, $P < 0.001$; テルミサルタン: 16.5 ± 0.7 vs. 15.1 ± 0.7 ng/ml, $P < 0.001$) (図 5 A-C). FABP4 濃度の変化度は血圧変化度と相関を認めなかった.

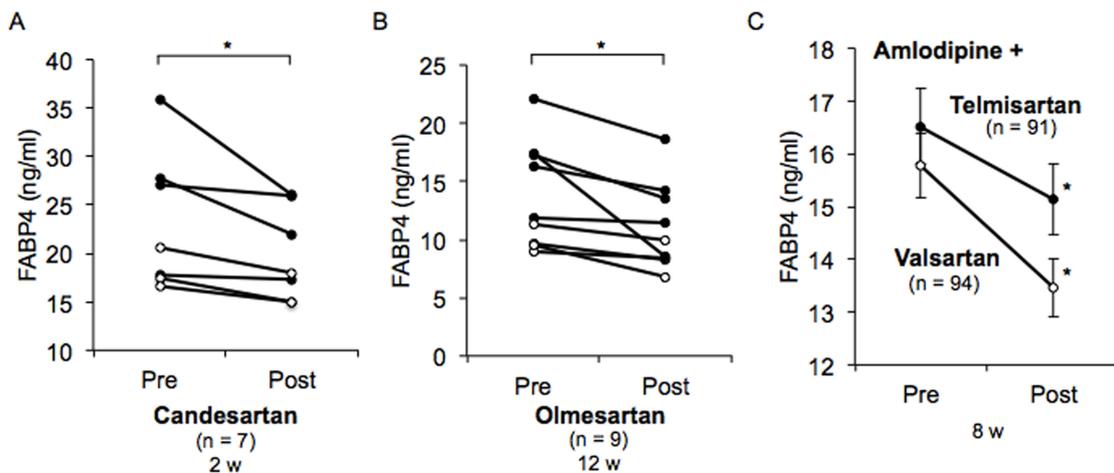


図 5. アンジオテンシン II 受容体拮抗薬による FABP4 濃度の変化.

A) カンデサルタン 2 週間投与前後, B) オルメサルタン 12 週間投与前後, C) アムロジピン投与下におけるバルサルタンもしくはテルミサルタン 8 週間投与前後. * $P < 0.05$ (Wilcoxon signed-rank test).

5. ARBによるFABP4の分泌制御の検討

3T3-L1 脂肪細胞への各種 ARB (カンデサルタン, オルメサルタン, バルサルタン, テルミサルタン) およびアンジオテンシン II の添加はイソプロテレノールの有無にかかわらず FABP4 の分泌に有意な変化をもたらさなかった。一方, FABP4 の発現に関しては, 24 時間刺激では PPAR γ 活性化作用をもつテルミサルタンで有意に増加させたが, 2 時間刺激では有意な差を認めなかった。

考 察

FABP4 欠損マウスを用いた検討から, FABP4 は脂肪細胞とマクロファージのそれぞれにおいて代謝・炎症反応を統合してメタボリックシンドロームの進展に重要な役割を果たすことが報告されている^{1,3,9)}。FABP4 の欠損により遺伝および高脂肪食由来の肥満モデルでインスリン抵抗性が改善し, 動脈硬化モデルとの掛け合わせにおいてはプラーク形成が抑制される。これらの所見から FABP4 は新規の薬物治療のターゲットになる可能性が示唆される。実際に我々は以前マウスにおいて糖尿病および動脈硬化の治療薬として FABP4 特異的阻害薬の有効性を報告した⁴⁾。

FABP4 はアミノ酸配列上明らかなシグナルペプチドを持たないため, 非分泌タンパク質と考えられていたが, 最近 FABP4 が脂肪細胞から分泌されることが報告され⁵⁾, その血中濃度が肥満, 糖尿病, 高血圧, 動脈硬化など様々なメタボリックシンドロームの病態と関連する可能性が示されている。さらにはアディポカインとして直接インスリン抵抗性の形成に関与することが報告されている⁵⁾。その他, 心筋細胞, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞への影響も示されている。

今回の検討から, 脂肪細胞からの FABP4 の分泌は AC-PKA および GC-PKG 経路を介した HSL の活性化による脂肪分解と関連することが示された⁶⁾。FABP4 は HSL とタンパク質間相互作用を介して, その活性化を制御することが報告されていることから, 脂肪細胞内で FABP4 は脂肪分解の制御のみならず, 産生された脂肪酸の担体として脂肪酸の細胞内利用促進や細胞外への放出に関与することが示唆される。

端野・壮瞥町研究における一般住民の無治療の健診受診者において心機能と FABP4 濃度との関連を検討したが, FABP4 濃度は左室拡張末期径, 左室駆出率, 左室重量係数とは相関を認めず, 拡張能の指標である e' と有意な負の相関を認め, FABP4 濃度の上昇が年齢, 性別および血圧とは独立して左室拡張能障害と関連する事が示された⁷⁾。心機能低下例をほとんど含まない健診症例でも関連が認められたことから, 心収縮能が保たれた心不全 (HFpEF) の初期段階での診断に有用な新規のバイオマーカーになる可能性が示唆され, カットオフ値の設定も含めた今後の解析が期待される。

今回検討したすべての ARB (カンデサルタン, オルメサルタン, バルサルタン, テルミサルタン) の投与で FABP4 濃度が有意に低下したことから, この作用は ARB のクラスエフェクトであることが考えられる⁸⁾。しかしながら, *in vitro* の検討からは FABP4 低下作用はアンジオテンシン II 受容体の抑制を介さない二次的な効果であることが示された⁸⁾。 β 刺激により FABP4 分泌が促進されることから^{5,6)}, ARB による FABP4 低下の一部の機序として, ARB による交感神経系抑制を介して間接的に脂肪細胞からの FABP4 分泌を低下させる事が考えられた。また, FABP4 濃度は単にメタボリックマーカーとしてだけでなく, 予後規定因子であることが示されており¹⁰⁾, ARB による FABP4 濃度の低下は ARB による心血管イベント抑制の一部機序になる可能性が示唆された。

メタボリックシンドロームの病態に密接に関連する新規のアディポカイン FABP4 は, 脂肪分解と関連して脂肪細胞から分泌される。今回, 無治療の一般住民の対象から FABP4 濃度が独立して左室拡張能と関連することが示された。また, ARB のクラスエフェクトとして FABP4 濃度が低下することが明らかとなり, 血圧低下を超えたプレイオトロピック作用として心血管イベント抑制に関与する可能性が示唆された。他の薬剤による FABP4 濃度への影響を含め更なる検討が望まれる。

文 献

- 1) Furuhashi, M. & Hotamisligil, G. S. : Fatty acid-binding proteins role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7** : 489-503, 2008.
- 2) Furuhashi, M., Ishimura, S., Ota, H. & Miura, T. : Lipid chaperones in metabolic inflammation. *Int. J. Inflamm.* **2011** : 642612, 2011.

- 3) Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K. & Miura, T. : Fatty acid-binding protein 4 (FABP4) : pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clin. Med. Insights Cardiol.*, **8** : 23-33, 2014.
- 4) Furuhashi, M., Tuncman, G., Görgün, C. Z., Makowski, L., Atsumi, G., Vaillancourt, E., Kono, K., Babaev, V. R., Fazio, S., Linton, M. F., Sulsky, R., Robl, J. A., Parker, R. A. & Hotamisligil, G. S. : Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty acid-binding protein FABP4. *Nature*, **447** : 959-965, 2007.
- 5) Cao, H., Sekiya, M., Ertunc, M. E., Burak, M. F., Mayers, J. R., White, A., Inouye, K., Rickey, L. M., Ercal, B. C., Furuhashi, M., Tuncman, G. & Hotamisligil, G. S. : Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab.*, **17** : 768-778, 2013.
- 6) Mita, T., Furuhashi, M., Hiramitsu, S., Ishii, J., Hoshina, K., Ishimura, S., Fuseya, T., Watanabe, Y., Tanaka, M., Ohno, K., Akasaka, H., Ohnishi, H., Yoshida, H., Saitoh, S., Shimamoto, K. & Miura, T. : FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity*, **23** : 359-367, 2015.
- 7) Fuseya, T., Furuhashi, M., Yuda, S., Muranaka, A., Kawamukai, M., Mita, T., Ishimura, S., Watanabe, Y., Hoshina, K., Tanaka, M., Ohno, K., Akasaka, H., Ohnishi, H., Yoshida, H., Saitoh, S., Shimamoto, K. & Miura, T. : Elevation of circulating fatty acid-binding protein 4 is independently associated with left ventricular diastolic dysfunction in a general population. *Cardiovasc. Diabetol.*, **13** : 126, 2014.
- 8) Furuhashi, M., Mita, T., Moniwa, N., Hoshina, K., Ishimura, S., Fuseya, T., Watanabe, Y., Tanaka, M., Yoshida, H., Shimamoto, K. & Miura, T. : Angiotensin II receptor blockers decrease serum concentration of fatty acid-binding protein 4 in patients with hypertension. *Hypertens. Res.*, **38** : 252-259, 2015.
- 9) Furuhashi, M., Fucho, R., Görgün, C. Z., Tuncman, G., Cao, H. & Hotamisligil, G. S. : Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J. Clin. Invest.*, **118** : 2640-2650, 2008.
- 10) Furuhashi, M., Ishimura, S., Ota, H., Hayashi, M., Nishitani, T., Tanaka, M., Yoshida, H., Shimamoto, K., Hotamisligil, G. S. & Miura, T. : Serum fatty acid-binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal disease. *PLoS ONE*, **6** : e27356, 2011.