

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591142

研究課題名（和文） PPAR γ 血管内皮 KO マウスを用いた PPAR γ の糖尿病合併心血管病抑制
機序の解明研究課題名（英文） The analysis of the function of PPAR γ in endothelium on the attenuation
of the diabetic vascular disease using PPAR γ endothelium specific deficient mice.

研究代表者

足立 雅広 (Adachi Masahiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00419516

研究成果の概要（和文）：

PPAR γ アゴニストは、脂肪分化を促進することで、糖尿病患者のインスリン抵抗性を改善する。また、PPAR γ アゴニストには、心血管系病を抑制する効果が報告されているが、その機序は不明である。本研究では、血管内皮細胞に発現している PPAR γ の心血管病発症進展に対する効果を解明するため、PPAR γ 血管内皮細胞特異的ノックアウト（KO）マウスを作成した。PPAR γ 血管内皮細胞特異的ノックアウト（KO）マウスに高脂肪食を投与すると、コントロールマウスと比較して収縮期血圧の上昇を認めた。高脂肪食投与後の PPAR γ 血管内皮細胞ノックアウトマウスの大動脈において、Egr-1 の発現の亢進と、IL-1 β と IL-6 の発現の増加を認めた。高脂肪食投与後の PPAR γ 血管内皮細胞特異的 KO マウスは、コントロールマウスと比較して、血糖の改善と、肝臓における脂肪の沈着の低下を認めたが、血中中性脂肪と血中遊離脂肪酸の増加を認めた。PPAR γ 血管内皮細胞特異的 KO マウスと、apoprotein E (apoe) KO マウスとを交配して作成したマウスに高脂肪食を投与し、動脈硬化発症について検討したが、コントロールマウスと比較して、動脈硬化巣の形成に有意差を認めなかった。本研究において、血管内皮細胞に発現する PPAR γ の活性化は、血圧の調節、血管の炎症の抑制と、全身の脂質代謝に関与していることが明らかとなったが、動脈硬化モデルマウスにおける動脈硬化巣の形成には有意な影響を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

The synthetic PPAR γ ligands have provided the evidence with the improvement of insulin resistance associated with adipocyte differentiation. The effective role of synthetic PPAR γ ligands on vascular system has been reported, but the mechanism has not been clear. To study the role of PPAR γ expressed in endothelial cell on the process of diabetic vascular disease, the endothelial cell specific PPAR γ knock out (PPAR γ -E-null) mice were produced. PPAR γ -E-null mice fed with high fat diet had significantly elevated systolic blood pressure compared with control PPAR γ -E-wild mice. After high fat diet treatment the expression levels of Egr-1, IL-1 β and IL-6 in the aorta of PPAR γ -E-null mice were elevated compared with PPAR γ -E-wild mice. PPAR γ -E-null mice fed high fat diet showed the improvement of elevated glucose level and fewer fat accumulation in liver whereas PPAR γ -E-null mice showed higher concentration of serum triglyceride and free fatty lipid levels compared with PPAR γ -E-wild mice. PPAR γ -E-null crossed with apoe knock out mice fed with high fat diet showed accelerated atherosclerosis, but there was no significant difference in the rate of atherosclerotic region in aorta between PPAR γ -E-null-apoe KO and PPAR γ -wild-apoe KO mice. In this study it is proved that PPAR γ expressed in endothelial cell regulates inflammation and lipid metabolism whereas PPAR γ expressed in endothelial cell has no significant effect on the progression of atherosclerosis in apoe knock out mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国において、メタボリック症候群の患者は著しい増加傾向を認めている。核内受容体であるperoxisome proliferators activated receptor γ (PPAR γ)のアゴニストであるチアゾリジン誘導体 (TZDs) は、インスリン抵抗性改善作用を持ち、糖尿病治療薬として汎用されている。TZDsは血糖の改善効果だけではなく、2型糖尿病患者における動脈硬化の発症・進展の抑制、降圧効果を有し、TZDs投与にて心血管イベント発症や再発のリスクが低下したという臨床試験の報告がなされている。その機序として、TZDsによる脂肪組織、筋肉組織を介したインスリン抵抗性の是正、アディポサイトカインの産生異常の改善、マクロファージを介する抗炎症作用などが重要であり、TZDsは、脂肪組織やマクロファージを介して間接的に血管病変を抑制すると考えられている。一方、PPAR γ は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞にも発現している。TZDsが、心血管病変発症・進展抑制に関して、心血管系組織に直接作用する可能性が考えられているが、その直接作用の全身に対する作用に対する程度や、作用機序は現在のところ不明である。また、心血管系に発現するPPAR γ が、心血管系の細胞における糖・脂質代謝に関与しており、糖・脂質代謝、炎症、血管病態の相互作用を制御することで、心血管病変の発症・進展に関与している可能性も示唆されている。心血管系組織に対するPPAR γ の作用に関する動物実験は、PPAR γ のheterozygous欠損 (PPAR γ (+/-)) マウスを用いた研究結果が多く報告されているが、全身のPPAR γ が欠失しているため、心血管系に発現するPPAR γ の活性化の直接の作用について検討するためには、心血管系組織特異的にPPAR γ を欠失するマウスを解析する必要がある。血管内皮細胞に発現するPPAR γ の機能について解析するため、我々は、PPAR γ floxマウスと、Tekプロモーターの制御下にCre Recombinaseを発現するトランスジェニックマウスとの交配により、血管内皮細胞特異的にPPAR γ の発現を欠失するconditionalノックアウト (PPAR γ E-null) マウスを作成した。そこで、高脂肪食下で飼育したPPAR γ E-nullマウスを用いて、2型糖尿病における心血管病変の発症進展に対して、血管内皮細胞に発現するPPAR γ の機能を解明する。

2. 研究の目的

(1) PPAR γ -E-null マウスとコントロールのPPAR γ -E-wild マウスに、2% NaCl 水を60日間投与し、tail cuff 法にて収縮期血圧を測定したが、両群マウス間に血圧の有意差は認めなかった。しかし、高脂肪食を投与下においては、高脂肪食投与30日の時点で、PPAR γ E-null マウスはPPAR γ E-wild マウスと比較して収縮期血圧が有意に高値となった。血管内皮細胞に発現するPPAR γ の欠失が血管のホメオスターシス機構の障害をきたし、血管病態に関与していると考えられる。その機序について遺伝子レベルにおいて解明する。

(2) 心血管系に発現するPPAR γ が、心血管系の細胞における糖・脂質代謝に関与し、全身の糖・脂質代謝に影響を与えている可能性が考えられている。2型糖尿病の状態において、血管内皮細胞に発現するPPAR γ が、全身の糖・脂質代謝に与える影響を解明し、それにより心血管病変の発症進展に関与する可能性について検討する。

(3) 2型糖尿病の患者において、動脈硬化症は重要な合併症である。TZDsは、動脈硬化の発症・進展を抑制すると報告されている。PPAR γ と動脈硬化に関する研究は、全身のheterozygous欠損 (PPAR γ (+/-)) マウスを用いた報告

が多いが、同マウスでは、TZDsの脂肪、筋肉に対する効果の間接的作用を評価している可能性が高い。本研究において、PPAR γ -E-nullマウスと動脈硬化モデルマウスのapoeノックアウトマウスとを交配したPPAR γ □□□□□□□□-apoe KOマウスの動脈硬化形成を解析することで、血管内皮細胞に発現するPPAR γ が動脈硬化病変形成に直接関与するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) PPAR γ -floxマウスとTek-Cre-transgenicマウスとの交配により、PPAR γ 血管内皮細胞conditionalノックアウト(PPAR γ -E-null)マウスとコントロールのPPAR γ F/Fマウスを作成する。

(2) PPAR γ 血管内皮細胞conditionalノックアウト(PPAR γ □E-null)マウスとコントロールのPPAR γ F/Fマウスの大動脈よりmRNAを調整しcDNAを合成する。DNAマイクロアレイ法を用いて、血管内皮細胞のPPAR γ の欠失により変化する遺伝子群を網羅的に検索する。発現に差を認めた重要な遺伝子を検索し、Real time PCR法にてmRNAの発現量を比較する。

(3) PPAR γ 血管内皮conditionalノックアウト(PPAR γ -E-null)マウスとコントロールのPPAR γ F/Fマウスに、6週齢から12週間高脂肪食を投与する。ipGTT試験、ITT試験にて糖代謝について検討する。血中中性脂肪、血中遊離脂肪酸を測定する。肝臓、脂肪組織、大動脈、腎臓を単離し、組織学的検索を行う。また、これらの組織において、代謝、炎症、酸化ストレス関連因子の発現について、RT-PCR法を用いて比較検討を行う。

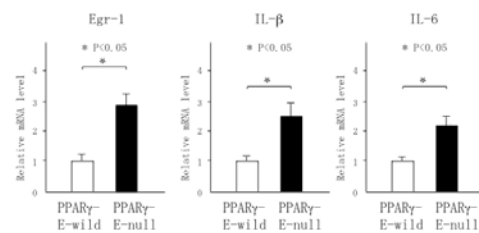
(4) PPAR γ 血管内皮conditionalノックアウト(PPAR γ -E-null)マウスとapoe-KOマウスとの交配で得られたPPAR γ E-null-apoe-KOマウスと、コントロールのPPAR γ E-wild-apoe-KOマウスに、4週齢から高脂肪食を投与する。高脂肪食を12週間投与後に、PPAR γ E-null-apoe-KOマウスとPPAR γ E-wild-apoe-KOマウスの大動脈を単離し、動脈硬化病変の発症頻度を、動脈硬化巣占有率にて評価する。また、腎臓を単離し、炎症、酸化ストレス関連因子の発現について、RT-PCR法を用いて比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) PPAR γ -E-nullマウスとPPAR γ F/Fマウスの血管組織における遺伝子の発現の相違を検討するために、両群の大動脈を用いて、DNAマイクロアレイ法にて、約60000個の遺伝子発現の違いについて検討した。PPAR γ -E-nullマウスにおいて、血圧の上昇を認めており、心血管病の発症進展に関連があると考えら

れる遺伝子について検討した。PPAR γ -E-nullマウスの血管では、PPAR γ F/Fマウスと比較して、Early growth response-1 (Egr-1)の発現が有意に増加していた(図1)。また、PPAR γ -E-nullマウスの血管では、炎症性サイトカインであるIL-6、IL-1 β の発現が有意に上昇していた(図1)。p47phoxの増加を認めしたが、その他の酸化ストレスに関するSODや、NADPH oxidaseの発現は、両群に有意差を認めなかった。Egr-1は、炎症性因子の発現の誘導や、細胞の増殖、アポトーシスに関係する重要な因子である。Egr-1の発現の亢進に伴い、IL-6、IL-1 β の発現が上昇した可能性が考えられる。高脂肪食の投与下で、PPAR γ -E-nullマウスの血管にて、Egr-1の発現が増加していたことは、血管内皮細胞に発現するPPAR γ の内因性リガンドによる活性化が、血管の炎症や内皮細胞の増殖の抑制に直接関与していると考えられる。Egr-1はPPAR γ 活性化による血管の炎症の抑制や内皮細胞増殖の抑制の標的遺伝子と考えられ、新しいPPAR γ のアゴニストの開発に関しても、指標となる重要な遺伝子となると考えられる。

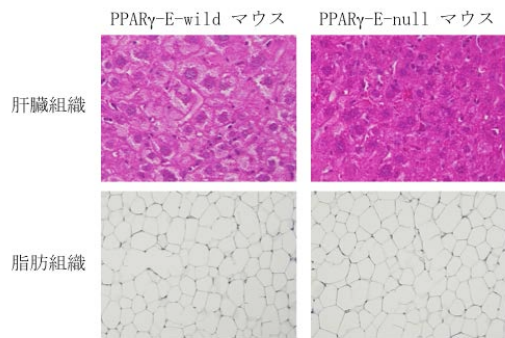
図1 高脂肪食投与後のPPAR γ -E-nullマウスとPPAR γ -E-wildマウスの血管におけるEgr-1、IL-1 β とIL-6の発現の比較



(2) PPAR γ -E-nullマウスとPPAR γ -E-wildマウスに、90日間の高脂肪食を投与後に、ipGTT試験を行ったところ、PPAR γ -E-nullマウスは、PPAR γ -E-wildマウスと比較して、負荷後の血糖値が有意に低下していた。両群マウスの脂肪組織は、組織学的に相違を認めず(図2)、脂肪組織の分化に関しては、両群マウス間に相違はないと考えられた。PPAR γ -E-nullマウスの肝臓において、PPAR γ -E-wildマウスと比較して、肝細胞内における脂肪の沈着が軽度であり(図2)、脂肪肝形成の抑制を認めた。PPAR γ -E-nullマウスは、PPAR γ -E-wildマウスと比較して、血中中性脂肪と血中遊離脂肪酸が増加していた。(血中中性脂肪: PPAR γ -E-wildマウス 84.9 \pm 7.9mg/dl、PPAR γ -E-nullマウス 117.6 \pm 11.7mg/dl、血中遊離脂肪酸: PPAR γ -E-wildマウス 1.12 \pm 0.08mEq/L、PPAR γ -E-nullマウス

0.90±0.09mEq/L)。RT-PCR 法による解析にて、PPAR γ -E-null マウスの大動脈では、PPAR γ -E-wild マウスと比較して、CD36 の発現が、24%低下していた。血管内皮細胞に発現する PPAR γ の欠失により、血管内皮や肝臓への脂質の取り込みの低下をきたしたことが、血中中性脂肪と血中遊離脂肪酸が増加した原因と考えられる。血管内皮細胞に発現する PPAR γ の活性化が、全身の糖代謝、脂質代謝に影響を与えることが証明された。血管内皮細胞における PPAR γ の活性化の消失により、血中中性脂肪と遊離脂肪酸が増加することが、心血管病の発症、進展に関与している可能性が考えられた。

図2 高脂肪食投与後の PPAR γ -E-null マウスと PPAR γ F/F マウスにおける肝臓と脂肪脂肪組織 (H. E. 染色)

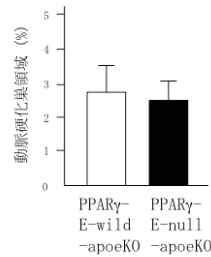


(3) PPAR γ E-null-apoe KO マウスと、PAR γ F/F マウス-apoe KO マウスに、4 週齢から 8 週間高脂肪食を投与した。8 週後に、大動脈を取り出し、動脈硬化巣について検討した。大動脈の面積に対する、動脈硬化巣面積の占有率は、PPAR γ E-null-apoe KO マウスと PAR γ F/F マウス-apoe KO マウス間に有意な差を認めなかった。(図 3)。RT-PCR 法にて、PPAR γ E-null-apoe KO マウスの大動脈において、PAR γ F/F マウス-apoe KO マウスと比較して、Agt1ar の発現が 1.6 倍増加していた。また、8 週間高脂肪食投与後に、腎臓を摘出し組織学的に検索した結果、糸球体の面積、形態、尿細管の面積、形態に関して、両群のマウスに相違を認めなかった。PPAR γ E-null-apoe KO マウスの腎臓において、NOX-4 の発現が有意に増加していたが、collagen type IV の発現は、両群に有意差を認めなかった。

急速に動脈硬化を発症する動脈硬化モデルマウスである apoe KO マウスにおいては、血管内皮細胞の PPAR γ の活性化の消失にて、動脈硬化巣形成と腎臓組織に変化を認めなかった。

図3 PPAR γ -E-null-apoe KO マウスと

PPAR γ F/F-apoe KO マウスにおける大動脈における動脈硬化巣領域の占有率



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) Wang L, Nomura M, Goto Y, Tanaka K, Sakamoto R, Abe I, Sakamoto S, Shibata A, Enciso PL, Adachi M, Ohnaka K, Kawate H, Takayanagi R. Smad2 protein disruption in the central nervous system leads to aberrant cerebellar development and early postnatal ataxia in mice. *J BiolChem*. 286:18766-18774, 2011

(2) Pham NM, Wang Z, Morita M, Ohnaka K, Adachi M, Kawate H, Takayanagi R, Kono S. Combined effects of coffee consumption and serum ©-glutamyltransferase on serum C-reactive protein in middle-aged and elderly Japanese men and women. *Clin Chem Lab Med*. 49:1661-1667, 2011

(3) Ohnaka K, Kono S, Inoguchi T, Yin G, Morita M, Adachi M, Kawate H, Takayanagi R. Inverse associations of serum bilirubin with high sensitivity C-reactive protein, glycated hemoglobin, and prevalence of type 2 diabetes in middle-aged and elderly Japanese men and women. *Diabetes Res Clin Pract*. 88:103-110, 2010

(4) Kawate H, Ohnaka K, Adachi M, Kono S, Ikematsu H, Matsuo H, Higuchi K, Takayama T, Takayanagi R. Alendronate improves QOL of postmenopausal women with osteoporosis. *Clin Interv Aging*. 26:123-131, 2010

(5) Ikeda M, Maki T, Yin G, Kawate H, Adachi M, Ohnaka K, Takayanagi R, Kono S. Relation of coffee consumption and serum liver enzymes in Japanese men and women with reference to effect modification of alcohol use and body mass index. *Scand J Clin Lab Invest*. 70:171-179, 2010

(6) Ohnaka K, Yamamoto K, Nakamura K, Adachi M, Kawate H, Kono S, Takayanagi R. Association of single nucleotide polymorphisms in secreted frizzled-

related protein 1 gene with bone mineral density in Japanese women. Geriatr Gerontol Int. 9:304-309, 2009

(7)Yoshida D, Toyomura K, Fukumoto J, Ueda N, Ohnaka K, Adachi M, Takayanagi R, Kono S. Waist circumference and cardiovascular risk factors in Japanese men and women. J Atheroscler Thromb. 16 :431-441, 2009

〔学会発表〕（計2件）

(1)Masahiro Adachi : Absence of Angiotensin II type 1a receptor ameliorates fatty liver and improves adipocyte differentiation in leptin deficient mice. 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010):2010年3月28日: Kyoto, Japan

(2)足立雅広: PPAR γ 大腸上皮特異的 KO マウスを用いた大腸上皮 PPAR γ の腸炎後腫瘍発生の抑制作用についての検討: 第84回日本内分泌学会学術総会: 2011年4月21日: 神戸

〔図書〕（計2件）

(1)足立雅広: 副甲状腺疾患: 新老年医学 第3版 東京大学出版会: 1053-1057, 2010年

(2)足立雅広: 循環器医のための知っておくべき電解質異常 高カルシウム血症: メディカルビュー社: 213-215, 2011年

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

該当事項なし

○取得状況（計0件）

該当事項なし

〔その他〕

ホームページ等

該当事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 雅広 (Adachi Masahiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 00419516

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし