

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592433

研究課題名(和文)閉経後女性の内臓脂肪蓄積機構の解明 メタボローム解析による創薬に向けた基礎的研究

研究課題名(英文)Research on the mechanism of visceral fat accumulation in postmenopausal women.

研究代表者

高橋 一広 (Takahashi, Kazuhiro)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：20292427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：閉経後の内臓脂肪で11beta-HSD1の発現が増加することが明らかになり、ヒトでもエストロゲンは11beta-HSD1の発現を抑制すると考えられた。BMIの増加に伴い脂肪組織内のaromatase発現は増加するが、生理活性の低いE1が優位になるため、局所内のグルココルチコイド活性化を抑制できない可能性が想定された。皮下脂肪では閉経前後で脂肪酸の代謝に差は認められなかったが、閉経群の内臓脂肪で、脂肪酸の代謝産物が有経群に比較して高濃度に存在することが、メタボローム解析で初めて明らかとなった。閉経後の内臓脂肪では、脂肪酸代謝に変化がおきていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cortisol/cortisone ratio and the expression of 11beta-HSD1 mRNA in visceral fat in postmenopausal women were significantly higher than those in premenopausal women. There was a significant correlation between the E1/E2 ratio of visceral fat and body mass index in postmenopausal women. A significant correlation between the cortisol/cortisone ratio and the E1/E2 ratio of visceral fat was observed in postmenopausal women. The expression of 11beta-HSD1 mRNA in visceral fat increases in postmenopausal women, and the E1/E2 ratio in visceral fat may be associated with local glucocorticoid levels after menopause. The concentrations of fatty acid metabolites in the visceral fat of postmenopausal women were significantly higher than those in the visceral fat of premenopausal women. The change in fatty acid metabolism in visceral adipose tissues might be related to metabolic syndrome in postmenopausal women.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：エストロゲン 閉経 内臓肥満 メタボリック症候群 コルチゾール

1. 研究開始当初の背景

女性は閉経後に、メタボリックシンドロームの原因となる内臓脂肪の蓄積が促進することが知られている (Tchenof et al. Clin Endocrinol Metab. 2004;89:3425)。また、過剰なコルチゾール産生によるクッシング症候群は、中心性肥満、高血圧、脂質異常症、糖尿病等メタボリックシンドロームと同様の病態を呈することも知られている。脂肪細胞には不活性型の cortisone から活性型の cortisol に転換する 11 β -hydroxy dehydrogenase (HSD)1 が発現しており、この 11 β -HSD1 は内臓脂肪の増加に伴い発現が増加することや (Montague et al. Diabetes 2000;49:883)、げっ歯類では 11 β -HSD1 の発現にエストロゲンが関与することが報告されている (Tagawa et al. J Endocrinol 2009;202:131)。しかし、ヒトでは 11 β -HSD1 の発現とエストロゲンによる制御については解明されていない。

また、メタボリックシンドロームは内臓脂肪の蓄積に加え、内臓脂肪の慢性炎症が発症基盤であるとも考えられている。脂肪組織内に蓄積するパルミチン酸が、炎症惹起物質の一つであると報告されている。我々は閉経後の脂肪組織において、脂質代謝を含めた代謝機能が変化し、炎症を惹起する物質が増えていると考えた。

閉経後女性における内臓脂肪組織内のエストロゲン環境がコルチゾール代謝経路に及ぼす影響を明らかにすること、および閉経前後の脂質代謝の違いを明らかにすることがメタボリックシンドローム治療創薬開発に有用であると考え研究を開始した。

2. 研究の目的

産婦人科手術時に摘出された有経女性と閉経後女性の皮下および内臓脂肪を用いて以下を明らかにすることを目的にした。

(1)閉経後に増加する内臓脂肪において、有経時に比較し 11 β -HSD1 の発現および活性型

の cortisol 産生が亢進しているか否かを明らかにすること。

(2)閉経後に増加する内臓脂肪において、有経時と比較して代謝機能に差があるのか否かについて、低分子代謝産物を網羅的に同定・定量するメタボローム解析を行う。

3. 研究の方法

倫理委員会の承認後、手術患者 41 名 (有経 16 名、閉経 25 名) から書面にて同意を得た上で、内臓脂肪である大網および皮下脂肪を摘出後液体窒素により急速凍結を行い、解析まで -80 に保存した。

(1)ステロイド変換酵素 mRNA 発現の定量的解析

液体窒素中で凍結状態のまま脂肪組織 100 mg を粉砕し、RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit を用いて RNA を抽出する。抽出した RNA から、Super Script® First Strand system for RT-PCR を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、7300 Real Time PCR System を用いて real time PCR を行い、11 β -HSD1、11 β -HSD2、17 β -HSD1、17 β -HSD2、aromatase mRNA の発現レベルを解析した。

(2)脂肪組織中のステロイド測定

有経・閉経群各 8 名の脂肪組織中の cortisol、cortisone、estrone (E1)、estradiol (E2)濃度を液体クロマトグラフィ質量分析法で測定した。

(3)有経および閉経後女性内臓脂肪におけるメタボローム解析

脂肪組織を用いてキャピラリー電気泳動質量分析装置 (capillary electrophoresis mass spectrometry, CE-MS) によるメタボローム解析を行った (Soga et al. J Biol Chem 2006)。

(4) THP-1 (ヒト単球性白血病細胞株) をマクロファージに分化させた後、飽和脂肪酸 (パルミチン酸、ペンタデカン酸) 200 μ M を添加し 8 時間培養後、IL-6、IL-8 mRNA の発現を real-time PCR 法で測定した。

4. 研究成果

(1) 皮下脂肪および内臓脂肪面積の比較

有経女性（15人）と閉経後女性（25人）において皮下脂肪と内臓脂肪面積の比較を行ったところ、皮下脂肪面積では差が見られなかったが、内臓脂肪面積は閉経後女性が有経女性に比べて有意に増加していた ($p < 0.05$) (図1)。

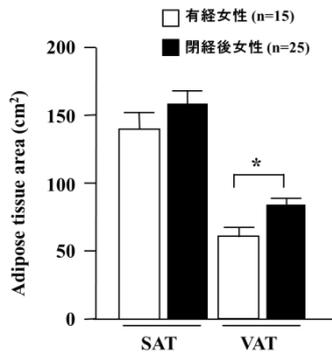


図1 脂肪面積比較

(2) 11β-HSD1 mRNA 発現と cortisol/cortisone 比

皮下脂肪では差が認められなかったが、内臓脂肪において有経女性に比較して閉経後女性で 11β-HSD1 mRNA の発現が有意に ($p < 0.05$) 高値であった (図2A)。脂肪組織中における cortisol、cortisone の濃度比 (cortisol/cortisone) を測定した結果、有経群に比較し閉経群の内臓脂肪で cortisol/cortisone 比が有意に ($p < 0.05$) 高値であった (図2B)。

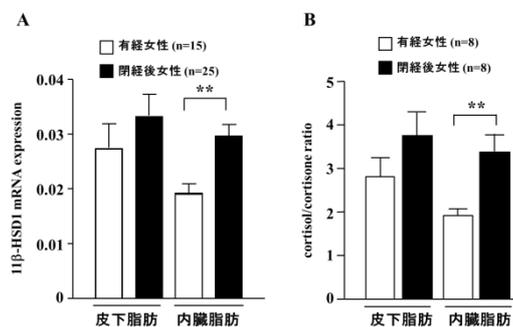


図2. 11β-HSD1 mRNA 発現とcortisol/cortisone比

(3) 閉経後女性の脂肪組織における aromatase 発現

閉経後女性の BMI と脂肪組織中の aromatase 発現との相関を調べた結果、内臓脂肪において BMI の増加とともに、aromatase mRNA の発現が増加していた ($p < 0.05$) (図3)。

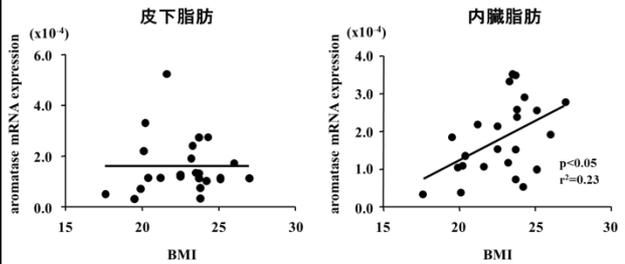


図3. 閉経後女性の脂肪組織におけるaromatase発現

また閉経後女性の内臓脂肪において、BMI と estrone/estradiol (E1/E2) 比が正の相関 ($p < 0.05$) を示し (図4A)、エストロゲン変換酵素の mRNA 発現量比 (17β-HSD1 (E1 E2)/17β-HSD2 (E2 E1)) は BMI と逆相関して ($p < 0.05$) いた (図4B)。また、E1/E2 比の増加とともに、cortisol/cortisone 比が有意に ($p < 0.05$) 増加していた (図4C)。

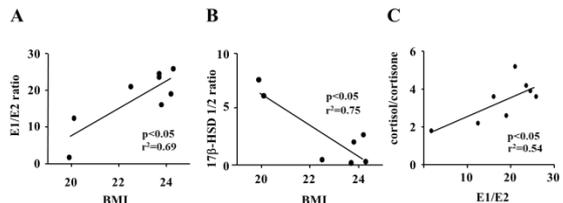


図4. 閉経後女性のBMIと内臓脂肪中のステロイド比

(4) 飽和脂肪酸の代謝産物であるヘプタン酸 (C7:0)、オクタン酸 (C8:0)、ペラルゴン酸 (C9:0) の濃度が有経女性に比較して、有意に ($p < 0.05$) 増加していた (図5)。

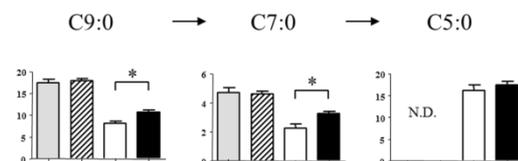


図5. 閉経後女性の内臓脂肪メタボローム解析

(5) 長鎖飽和脂肪酸であるペンタデカン酸

及びパルミチン酸は、マクロファージにおける IL-6, IL-8 mRNA の発現を有意に ($p < 0.05$) 増加させた (図 6)。

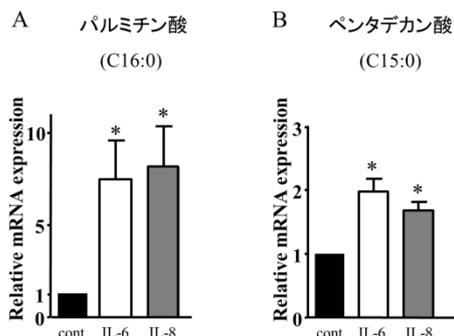


図6.飽和脂肪酸のTHP-1細胞におけるサイトカイン発現誘導

有経女性と閉経後女性の皮下脂肪及び内臓脂肪の蓄積状態を調べた結果、閉経後に内臓脂肪の蓄積が増加することが確かめられた (図 1)。閉経後の内臓脂肪では、不活性型の cortisone から活性型の cortisol へ変換する 11β -HSD1 mRNA の発現が亢進し、cortisone/cortisol 比も増加していた (図 2)。げっ歯類では 11β -HSD1 発現にエストロゲンが関与することが報告されているが、ヒトにおいても閉経によりエストロゲンが減少したことで 11β -HSD1 mRNA の発現が亢進したと推測される。

閉経後は脂肪組織中における aromatase により副腎皮質由来のアンドロゲンがエストロゲンに変換されることが知られている。この aromatase の発現量は肥満度の増加とともに増加することが知られており、我々の研究でも閉経後女性の内臓脂肪における aromatase mRNA の発現は BMI の増加とともに増加することが明らかになった (図 3)。閉経後は 11β -HSD1 mRNA の発現が亢進することを見出したが、同じ閉経後であっても肥満度が増加すれば aromatase mRNA の発現が亢進するため局所のエストロゲン濃度が増加する可能性が考えられた。そうすると肥満になるほど局所のエストロゲンが増加し、脂肪蓄積に関与する 11β -HSD1 の発現が抑制されるという、

奇異な現象が生じてしまう。そこで我々は肥満によって aromatase の発現が亢進しエストロゲンが増加しても、低活性型の estrone (E1) が活性型の estradiol (E2) にもまして産生されているのではないかと推測した。実際に E1/E2 比を測定してみると、BMI の増加とともに E1/E2 比が増加、つまり E2 に対して相対的に E1 産生が亢進していることが示された。また、E2 から E1 への変換を行う 17β -HSD2 が 17β -HSD1 に比較して相対的に増加していることが示された (図 4)。つまり、閉経後はエストロゲンの減少により局所的に cortisol の産生が増加するために脂肪蓄積が亢進すること、また、肥満により aromatase の発現が増加するが局所的には 17β -HSD2 の発現が亢進するため、エストロゲンの産生が増加したとしても、より低活性の E1 が E2 に比べて優位になるため cortisol 産生および脂肪蓄積の増加を阻止できない状態であると推察された。

メタボローム解析の結果、皮下脂肪では閉経前後で脂肪酸の代謝に差は認められなかったが、閉経群の内臓脂肪で、脂肪酸の代謝産物が有経群に比較して高濃度に存在することが、明らかとなった (図 5)。そして増加した脂肪酸はマクロファージに作用し、炎症惹起物質である IL-6 および IL-8 の産生を促すことが明らかになった (図 6)。

閉経後の内臓脂肪では、エストロゲン欠乏によるコルチゾール産生の増加による脂肪蓄積の亢進、および脂肪酸代謝の変化による炎症の惹起がメタボロームシンドローム発症に関与する可能性が示唆された。

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 2 件)

Yamatani H, Takahashi K, Yoshida T, Takata K, Kurachi H. Association of estrogen with glucocorticoid levels in visceral fat in postmenopausal women.

Menopause 査読有 2013;20(4):437-42

Yamatani H, Takahashi K, Yoshida T, Soga T, Kurachi H. Differences in fatty acid metabolism of visceral adipose tissue in postmenopausal women. Menopause 査読有 2014;21(2):170-176

〔学会発表〕(計 3件)

山谷日鶴, 高橋一広, 竹原 功, 松村創平, 須藤 毅, 吉田隆之, 倉智博久. 閉経後の内臓脂肪におけるグルココルチコイド活性化制御機構の解析. 第 64 回日本産科婦人科学会 神戸ポートピアホテル (神戸市) 2012.4.13-15

Yamatani H, Takahashi K, Urushiyama K, Sudo T, Ohta T, Soga T, Kurachi H. Deterioration in fatty acid metabolism of visceral adipose tissue in postmenopausal women. 第 65 回日本産科婦人科学会 ロイトン札幌 (札幌市) 2013.5.10-12

Yamatani H, Takahashi K, Yoshida T, Kurachi H. Association of estrogen with glucocorticoid levels in visceral fat in postmenopausal women. The 5th Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation. Keio Plaza Hotel Tokyo, Japan 2013.10.18-20.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 一広(TAKAHASHI Kazuhiro)

山形大学医学部・准教授

研究者番号 : 20292427

(2)研究分担者

倉智 博久(KURACHI Hirohisa)

山形大学医学部・教授

研究者番号 : 40153366

山谷 日鶴(YAMATANI Hizuru)

山形大学医学部・医員

研究者番号 : 40550637