

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2013

課題番号：24590690

研究課題名(和文)新規メタボリック症候群ラットモデルにおけるグルココルチコイド受容体の役割の検討

研究課題名(英文) Roles of glucocorticoid receptors in cardiac and adipose tissue pathology in a rat model of metabolic syndrome

研究代表者

永田 浩三 (Nagata, Kohzo)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20378227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：まず、メタボリックシンドローム(MetS)の新規動物モデルであるDah1S.Z-Leprfa/Leprfaラットを用いてMetSにおけるグルココルチコイド受容体(GR)の病態生理学的役割を明らかにした。次に、同モデルを用いて寒冷および拘束ストレスに対する応答を検討した。寒冷ストレスとGR遮断薬であるRU486は肥満に影響しなかったが、拘束ストレスでは、アドレナリン受容体遮断薬であるプロプラノロール感受性に肥満は抑制された。寒冷および拘束ストレスはいずれも高血圧、心筋傷害、内臓脂肪の炎症および糖代謝を増悪させたが、これらの効果はいずれも各々RU486およびプロプラノロールにより有意に改善した。

研究成果の概要(英文)：We first clarified the pathophysiological roles of the glucocorticoid-glucocorticoid receptor (GR) axis in cardiac and adipose tissue pathology of Dah1S.Z-Leprfa/Leprfa (DS/obese) rats as a new animal model of metabolic syndrome (MetS). We next investigated the responses to cold stress and restraint stress in these rats. Cold stress and the GR blocker RU486 did not affect obesity in DS/obese rats. In contrast, restraint stress to DS/obese rats attenuated obesity in a manner sensitive to the beta-adrenergic receptor blocker propranolol. Both types of stress exacerbated hypertension, cardiac injury, adipose tissue inflammation, and glucose metabolism, and all of these effects were ameliorated by RU486 with cold stress and by propranolol with restraint stress.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：メタボリックシンドローム ストレス グルココルチコイド受容体 アドレナリン受容体 心筋傷害
脂肪組織炎症 糖代謝異常

1. 研究開始当初の背景

(1) Dahl 食塩感受性ラットに Zucker ラット由来の肥満遺伝子 (*fa*) を導入した新しいコンジェニックラット (Dahl S.Z-*Lepr^{fa}/Lepr^{fa}*; DS/obese) を入手し、その基本病態と心筋傷害を初めて明らかにし、メタボリックシンドローム (MetS) の新しい動物モデルとして確立した。最近、組織特異的な細胞内グルココルチコイド活性化と代謝疾患の関連が注目されているが、MetS に伴う心筋傷害や脂肪組織の機能異常におけるグルココルチコイド受容体 (GR) の意義については知見が少ない。

(2) ストレスが減量困難性を招いたり心血管リスクを増大させることは知られているが、分子機構には不明な点が多い。また、ストレスに応答して体重が減る人もあれば増える人もあるが、これはストレスの種類によって交感神経系の応答が異なるためであり、ストレス誘導性肥満には内臓脂肪組織のグルココルチコイドの増加が関連しているという報告がある。しかし、肥満病態におけるストレス応答に関する知見は少ない。

2. 研究の目的

(1) DS/obese ラットの基本病態と心筋傷害におけるグルココルチコイド/GR 系の病態生理学的意義を明らかにする。さらに、(2) 同モデルに対して異なる 2 種類のストレス (寒冷、拘束) を負荷し、心臓および脂肪組織のストレス応答における GR と交感神経 アドレナリン受容体 (AR) の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 雄性 DS/obese ラット (MetS 群) を用いて 9 週齢より GR 遮断薬である RU486 を 2 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回皮下投与し、13 週齢に心臓・脂肪の病変、および糖代謝に及ぼす効果を検討した。週齢の一致した DS/lean ラットを対照動物 (CONT 群) として用いた。

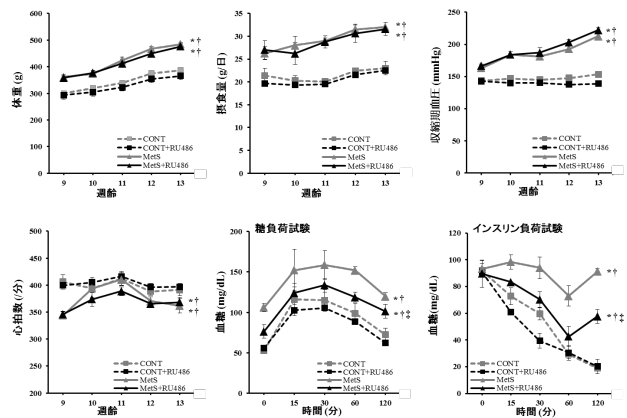
(2) 雄性 DS/obese ラット (MetS 群) を用いて 9 週齢より 4 週間、寒冷ストレス (CS, 1cm の深さの氷冷水) または拘束ストレス (RS, 体格に合致する 3 サイズの特注ストレスケージ) に各々 1 時間 (午前 9 時 ~ 11 時の間) 暴露した。寒冷ストレスの 30 分前に GR 遮断薬として RU486 (2 mg/kg/日) を、また、拘束ストレスの 30 分前に AR 遮断薬としてプロプラノロール (2 mg/kg/日) を各々皮下投与した。13 週齢に (1) と同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 平成 24 年度研究課題の主要データを示す。
 体重、摂食量、血圧および代謝
 ・RU486 は DS/obese および DS/lean ラットの体重、摂食量、および収縮期血圧に影響を及ぼさなかった。DS/obese ラットで低値を示した心拍数は RU486 により影響を受けなかった

(下図)。

・RU486 は DS/obese ラットの空腹時の血糖値および血中インスリン濃度の増加を抑制し、耐糖能異常 (糖負荷試験) およびインスリン抵抗性 (インスリン負荷試験) を有意に改善した (下図)。
 ・RU486 は DS/obese ラットにおいてインスリン基礎分泌能の指標である HOMA- の増加を有意に抑制した。
 ・血中コルチコステロン濃度は 4 群間で有意差を認めず、RU486 により影響されなかった。



心エコー、心カテ所見

・RU486 は DS/obese ラットの左室壁厚、左室径、および左室心筋重量に影響しなかったが、相対壁厚の増加を有意に抑制した。
 ・RU486 は DS/obese ラットの左室収縮機能の増大 (LVFS, LVEF) に影響しなかった。
 ・RU486 は DS/obese ラットにおいて E/A の低下、E 波減速時間 (DcT) の延長、等容弛緩時間 (IRT) の延長、左室弛緩の時定数 (tau) の延長、左室拡張末期圧 (LVEDP) の上昇、および左室拡張期スティフネス (LVEDP/LVDd) の増加によって示される、左室拡張障害の所見をすべて改善した。

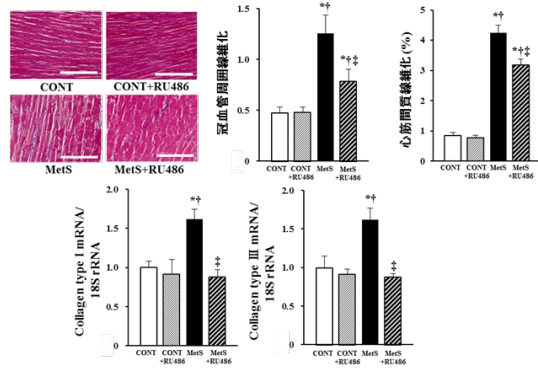
臓器重量

・RU486 は DS/obese および DS/lean ラットの全心重量および左室重量に影響しなかった。
 ・RU486 は DS/obese ラットの肝重量の増加に影響しなかった
 ・脾重量は 4 群間で差を認めなかった。
 ・RU486 は内臓脂肪 (後腹膜脂肪組織) 重量および皮下脂肪 (鼠径部脂肪組織) 重量の増加を有意に抑制した。
 ・RU486 は後腹膜脂肪組織の脂肪細胞の横断面積の増加を有意に抑制した。

心肥大および心筋線維化

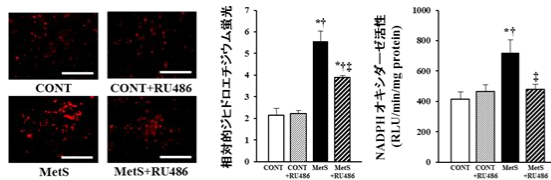
・RU486 は DS/obese ラットの左室心筋細胞横断面積の増加および心筋胎児性遺伝子発現の増大に影響しなかった。

・RU486 は DS/obese ラットの左室心筋冠血管周囲および心筋間質線維化と線維化関連遺伝子発現の増大を有意に抑制した(下図)。

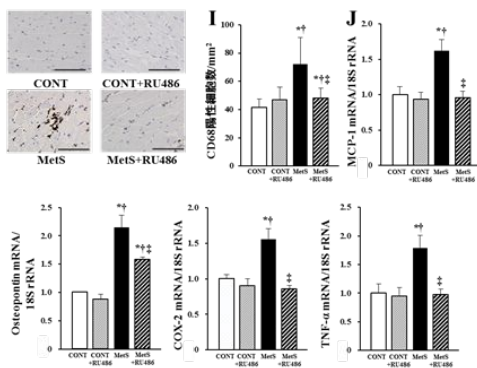


心筋酸化ストレスおよび炎症

・RU486 は DS/obese ラットの心筋における活性酸素(スーパーオキシド)産生の増加および心筋 NADPH オキシダーゼ活性の増加を有意に抑制した(下図)。

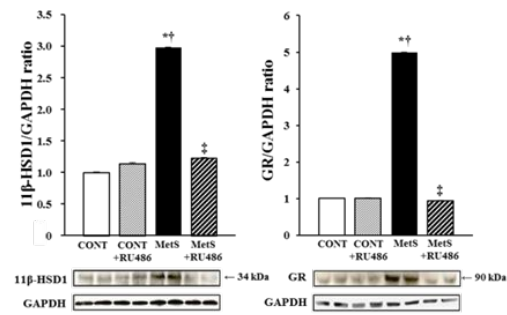
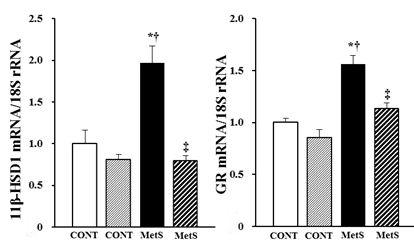


・RU486 は DS/obese ラットの心筋におけるマクロファージ浸潤、ケモカイン(MCP-1)および炎症性サイトカイン(osteopontin, COX-2, TNF- α)の遺伝子発現の増加を有意に抑制した(下図)。



心筋グルココルチコイド系およびレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系

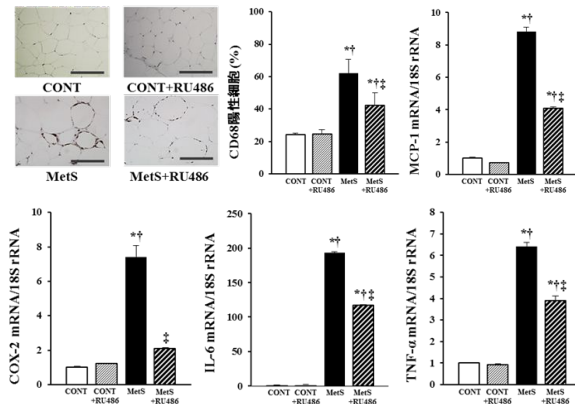
・RU486 は DS/obese ラットの心筋における 11 β -HSD1 と GR の遺伝子発現およびタンパク質発現の増加を有意に抑制した(下図、右上図)。



・RU486 は DS/obese ラットの心筋 ACE, ミネラルコルチコイド受容体(MR), およびその下流遺伝子である Sgk1 の発現増加を有意に抑制した。

脂肪組織の炎症とグルココルチコイド系

・RU486 は DS/obese ラットの内臓脂肪(後腹膜脂肪組織)におけるマクロファージ浸潤、ケモカイン(MCP-1)および炎症性サイトカイン(COX-2, IL-6, TNF- α)の遺伝子発現の増加を有意に抑制した(下図)。



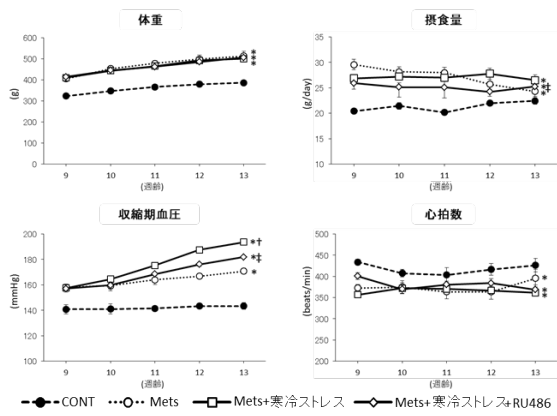
【考察】

MetS の心筋傷害および脂肪組織の機能異常の病態生理にグルココルチコイド/GR 系の活性化が寄与していることを明らかにした。GR 遮断は MetS の治療に有用である可能性が示唆された。MetS の病態形成におけるグルココルチコイド/MR 系の関与については報告があるが、グルココルチコイド/GR 系の関与についての知見は希少であり、今回の結果は画期的である。インスリン抵抗性や 2 型糖尿病におけるグルココルチコイド/GR 系の活性化につながる制御メカニズムは未だあまり解明されていない。今後は MetS と関連する心血管合併症の病態におけるグルココルチコイドとアルドステロン、GR と MR の役割を明らかにすべくさらなる研究が必要である。

(2)平成 25 年度研究課題の主要データを示す。寒冷ストレス(CS)

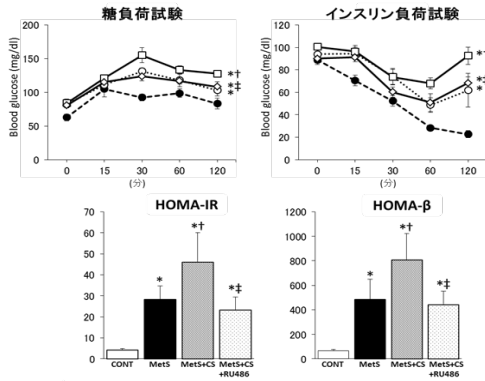
体重、摂食量、血圧・心拍数

・CS と RU486 は DS/obese ラットの体重、摂食量、心拍数に影響しなかったが、RU486 感受性に高血圧を増悪させた(次頁左上図)。



糖代謝

・CS は MetS ラットの耐糖能異常およびインスリン抵抗性を増悪させた。これらの効果は RU486 により有意に改善した(下図)。
 ・CS によりさらに増大した MetS ラットのインスリン基礎分泌能は RU486 により有意に低下した(下図)。



心エコー、心カテ所見

・CS により増大した MetS ラットの左室壁厚、左室心筋重量、および相対壁厚の増加は RU486 により有意に抑制された。
 ・CS による MetS ラットの左室収縮機能の増大(LVFS, LVEF)は RU486 により抑制された。
 ・CS により MetS ラットの E/A, DcT, IRT, tau, LVEDP, および LVEDP/LVDD によって示される左室拡張能指標はいずれも増悪したが、RU486 により有意に改善した。

臓器重量

・CS により MetS ラットの全心重量および左室重量は増加したが、RU486 により有意に抑制された。
 ・CS および RU486 は MetS ラットの肝重量、膵重量、内臓脂肪(後腹膜、精巣上体、腸間膜)および皮下脂肪(鼠径部)重量に影響しなかった。

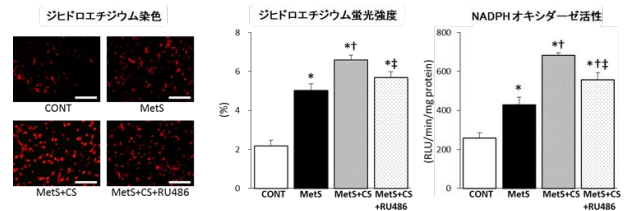
心肥大および心筋線維化

・CS は MetS ラットの左室心筋細胞横断面積および心筋胎児性遺伝子発現をさらに増大させた。この効果は RU486 により有意に抑制された。
 ・RU486 は CS により増大した MetS ラットの

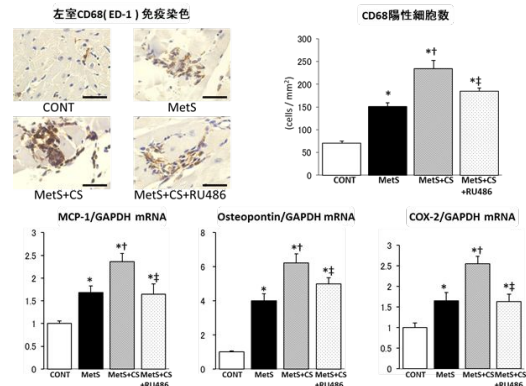
左室心筋線維化と線維化関連遺伝子発現の増大を有意に抑制した。

心筋酸化ストレスおよび炎症

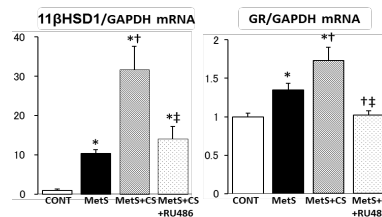
・CS により MetS ラット心筋の活性酸素(スーパーオキシド)産生量および NADPH オキシダーゼ活性のさらなる増加が認められた。この効果は RU486 により有意に抑制された(下図)。



・RU486 は CS による MetS ラット心筋のマクロファージ浸潤、ケモカイン(MCP-1)および炎症性サイトカイン(osteopontin, COX-2)の遺伝子発現のさらなる増加を有意に抑制した(下図)。



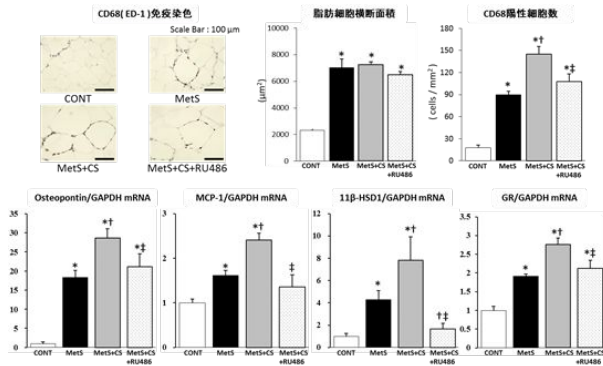
心筋グルココルチコイド系およびレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系
 ・CS による MetS ラットの心筋 11 β -HSD1 と GR の遺伝子発現のさらなる増加は RU486 により有意に抑制された(下図)。



・RU486 は CS による MetS ラットの心筋 AT_{1A} 受容体、MR、および Sgk1 発現のさらなる増加を有意に抑制した。

脂肪組織の炎症とグルココルチコイド系

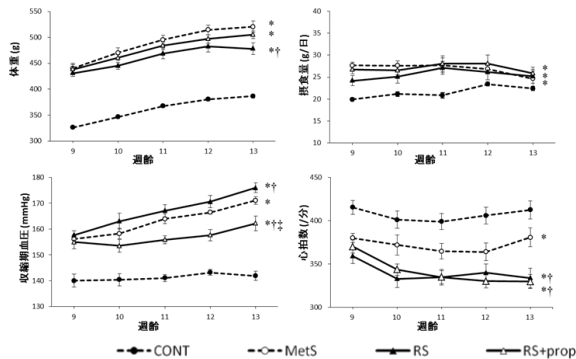
・CS は MetS ラットの内臓脂肪(後腹膜脂肪組織)の脂肪細胞の横断面積には影響しなかったが、マクロファージの浸潤をさらに増大させた。RU486 は脂肪細胞のサイズには影響しなかったが、脂肪組織のマクロファージの浸潤と炎症性サイトカインの遺伝子発現を有意に抑制した(次頁左上図)。



拘束ストレス(RS)

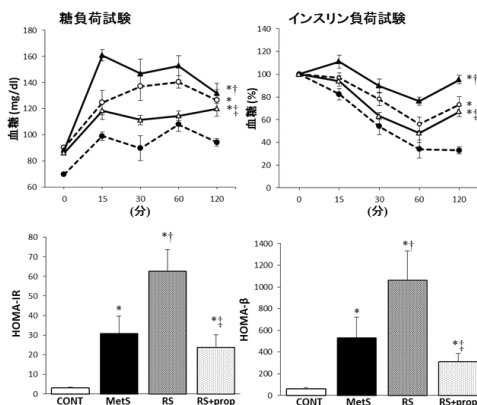
体重、摂食量、血圧・心拍数

・RS はプロプラノロール感受性に MetS ラットの体重増加の抑制と収縮期血圧の上昇をもたらしたが、摂食量には影響しなかった(下図)。



糖代謝

・RS は MetS ラットの耐糖能異常およびインスリン抵抗性を増悪させたが、これらの効果はプロプラノロールにより有意に改善した。
・RS によりさらに増大した MetS ラットのインスリン基礎分泌能はプロプラノロールにより有意に低下した(下図)。



心エコー、心カテ所見

・RS により増大した MetS ラットの左室壁厚と左室心筋重量の増加はプロプラノロールにより有意に抑制された。
・RS は MetS ラットの左室収縮機能(LVFS, LVEF)に影響を及ぼさなかった。
・RS により MetS ラットの DcT、IRT、tau、

および LVEDP/LVDD によって示される左室拡張能指標はいずれも増悪したが、プロプラノロールにより有意に改善した。

臓器重量

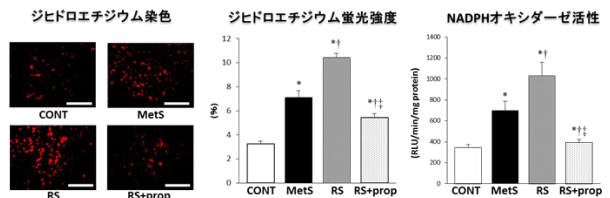
・RS により MetS ラットの全心重量および左室重量は有意に増加したが、プロプラノロールにより有意に抑制された。
・RS およびプロプラノロールは MetS ラットの肝重量、内臓脂肪(後腹膜、精巣上体、腸間膜)および皮下脂肪(鼠径部)重量に影響しなかった。
・脾重量は4群間で差を認めなかった。

心肥大および心筋線維化

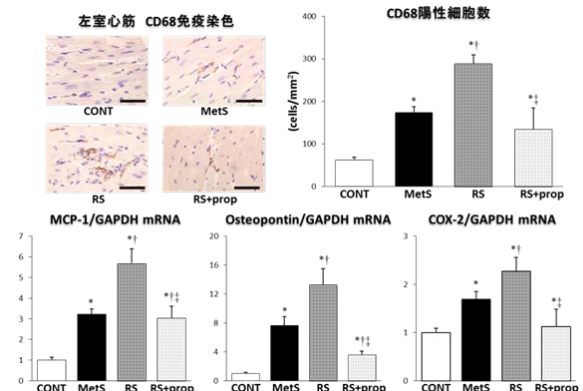
・RS は MetS ラットの左室心筋細胞横断面積および心筋胎児性遺伝子発現をさらに増大させたが、プロプラノロールにより有意に抑制された。
・プロプラノロールはRSにより増大した MetS ラットの左室心筋線維化と線維化関連遺伝子発現の増大を有意に抑制した。

心筋酸化ストレスおよび炎症

・RS により MetS ラット心筋の活性酸素(スーパーオキシド)産生および NADPH オキシダーゼ活性のさらなる増加が認められた。この効果はプロプラノロールにより有意に抑制された(下図)。



・プロプラノロールはRSによる MetS ラット心筋のマクロファージ浸潤、ケモカイン(MCP-1)および炎症性サイトカイン(osteopontin, COX-2)の遺伝子発現のさらなる増加を有意に抑制した(下図)。

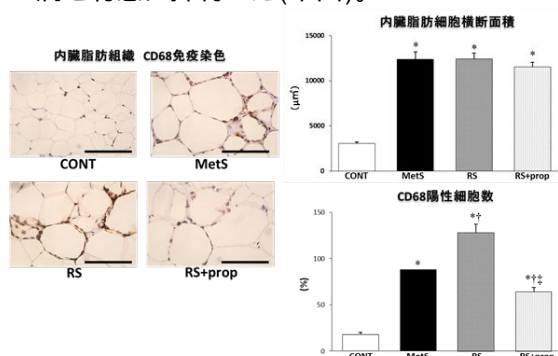


心筋グルココルチコイド系およびレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系
・RS による MetS ラットの心筋 11β-HSD1 と GR の遺伝子発現のさらなる増加はプロプラ

ノロールにより有意に抑制された。
 ・プロプラノロールはRSによるMetSラットの心筋ACE、AT_{1A}受容体、MR、およびSgk1発現のさらなる増加を有意に抑制した。

脂肪組織の炎症

・RSはMetSラットの内臓脂肪(後腹膜脂肪組織)の脂肪細胞の横断面積には影響しなかったが、マクロファージの浸潤をさらに増大させた。プロプラノロールは脂肪細胞のサイズには影響しなかったが、マクロファージの浸潤を有意に抑制した(下図)。



交感神経系

・RSにより24時間尿中ノルエピネフリン排泄量が増加したが、この増加はプロプラノロール投与により有意に抑制された。

【考察】

DS/obeseラットモデルを用いてMetSにおける寒冷および拘束ストレスに対する応答を検討した。本研究の結果、2種類のストレス(寒冷、拘束)のMetS病態に及ぼす影響の相違が明らかとなり、寒冷ストレス応答におけるGRの役割および拘束ストレス応答におけるARの役割が明らかとなった。これまでの研究では、正常の小動物を用いてストレス応答が検討されており、肥満動物を用いたストレス応答の解析は知る限りにおいて初めてである。ストレスに対する体重・脂肪形成の応答の違いはストレスの種類による交感神経系の応答の差異に起因し、内臓脂肪のグルココルチコイドレベルが関連するという報告がある。今後は、2種類のストレス負荷に対するグルココルチコイド系と交感神経系の応答の違いおよび心筋傷害と脂肪組織の機能異常におけるGRとARの役割をさらに明らかにすることで、ストレスによるMetS病態の悪化の予防・治療法の開発につなげたい。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. Kai Nagasawa, Natsumi Matsuura, Yuji Minagawa, Yuuri Takeshita, Sae Ohura, Takuya Hattori, Shogo Watanabe, Toyoaki Murohara, Kohzo Nagata. Glucocorticoid receptor blockade ameliorates cold stress-induced exacerbation of cardiac and adipose tissue pathology in a rat model of metabolic syndrome. 第78回日本循環器学会学術集会。東京。2014年3月21-23日。
2. Natsumi Matsuura, Kai Nagasawa, Yuji Minagawa, Sae Ohura, Yuuri Takeshita, Takuya Hattori, Shogo Watanabe, Toyoaki Murohara, Kohzo Nagata. Restraint stress attenuates obesity and deteriorates cardiac and adipose tissue pathology via α -adrenergic receptors in rats with metabolic syndrome. 第78回日本循環器学会学術集会。東京。2014年3月21-23日。
3. 竹下 侑里、高橋 圭司、大浦 彩依、松浦 菜摘、長澤 快、服部 拓哉、渡辺彰吾、伊藤 裕美、室原 豊明、永田 浩三 : RU486を用いたグルココルチコイド受容体遮断はメタボリックシンドロームラットの脂肪組織炎症と心筋傷害を軽減する。第36回日本高血圧学会総会。大阪。2013年10月24~26日。

[その他]

ホームページ等

<http://nagata-lab.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

永田 浩三 (KOHZO NAGATA)
 名古屋大学・医学系研究科・教授
 研究者番号 : 20378227

(3)連携研究者

上山 純 (JUN UEYAMA)
 名古屋大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号 : 00397465

橋本 克訓 (KATSUNORI HASHIMOTO)
 名古屋大学・医学系研究科・助教
 研究者番号 : 70324423

伊藤 裕美 (HIROMI ITO)
 名古屋大学・医学系研究科・助教
 研究者番号 : 20610752