

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591057

研究課題名(和文)肥満における動脈周囲脂肪組織の挙動と粥状硬化巣の病勢との関連に関する研究

研究課題名(英文)Role for periarterial adipose tissue in atherosclerosis in obesity

研究代表者

大森 浩二 (Ohmori, Koji)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：00263913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満者では、動脈周囲の肥大化した脂肪組織に由来する血管の成長因子(VEGF)と炎症性物質が動脈外膜側から血管壁に侵入して粥状硬化を進めるとされている。

成熟脂肪細胞において、抗動脈硬化作用のあるバルサルタンで1型アンジオテンシン受容体の基礎活性を抑制すると、インターロイキン-6(炎症性)の産生分泌が減り、アディポネクチン(抗炎症性)のそれが増加した。一方、やはり抗動脈硬化作用のあるエイコサペントエン酸はG蛋白共役受容体120と核内受容体PPAR-との統合的機序を介してVEGFの分泌をむしろ増加させた。以上の知見は動脈周囲脂肪組織内の他の細胞の振る舞いを包括する機序解明の一助となる。

研究成果の概要(英文)：It is hypothesized that periarterial adipose tissue releases vascular endothelial growth factor (VEGF) and proinflammatory cytokines into vascular wall from adventitial side to grow the atherosclerotic plaques. In this study employing mature adipocytes, block of constitutive activity of angiotensin II type-1 receptor by valsartan decreased production of interleukin-6 and increased that of adiponectin. However, another putative anti-atherosclerotic fatty acid, eicosapentaenoic acid promoted the production of VEGF through an integrated mechanism including G-protein coupled receptor 120 and peroxisome-proliferator activated receptor-gamma. These findings provide for the comprehensive understanding of the "out-side-in" mechanisms for atherosclerosis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈硬化 肥満 脂肪細胞 血管内皮成長因子 アディポサイトカイン vasa vasorum 細胞培養 レポーターアッセイ

1. 研究開始当初の背景

肥満者においては、動脈周囲の脂肪組織の肥大に伴う新生血管が外膜側から動脈壁内に侵入し、粥状硬化巣の成長を促進することが示唆されてきた。すなわち脂肪組織の肥大は、脂肪細胞の肥大に加えて脂肪細胞の増殖も貢献しており、増殖に必要な血流確保のために脂肪組織内で内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) が増加し、動脈周囲の血管新生において重要な役割を担うことが報告されている^①。この新生血管が動脈の外膜側から血管壁に侵入する vasa vasorum を発達させかつ、炎症惹起性のアディポサイトカインを供給、あるいは、破綻して血管壁内で出血を招来し、動脈硬化巣を増大させるという説がある^②。報告者らも培養脂肪細胞の成熟・肥大過程において VEGF-A の発現が増加し、それが脂肪細胞の活性を高めるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ: Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ : PPAR- γ によって増強することを確認している (図 1)。しかし、その修飾因子については十分に明らかにされていなかった。

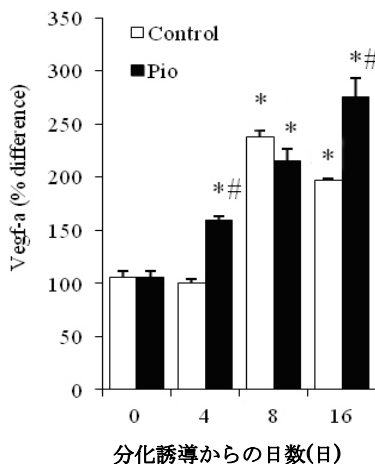


図1 脂肪細胞による VEGF-A の発現

3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化誘導により、VEGF-A mRNA の発現が増加した。ピオグリタゾン(Pio)で PPAR- γ を刺激するとこれが増強した。* $p < 0.05$ vs. day 0, # $p < 0.05$ vs. 同日の Control。(申請書より改変後転載)

2. 研究の目的

本研究では、肥満個体において動脈周囲の脂肪組織が血管新生を通じてプラークの病勢を促進するという仮説を証明することを当初の目的とした。研究期限内には、抗動脈硬化作用のある臨床薬剤を用いて、その基礎データとなる脂肪細胞のサイトカインおよび VEGF-A の発現・分泌を制御・修飾する因子、およびその機序を分子生物学的に明らかにすることを具体的な目的とした。すなわち、1) 成熟脂肪細胞によるアディポサイトカインの発現と分泌における 1 型アンジオテンシン II 受容体(AT1R)の役割の解明、および、2)

成熟脂肪細胞による VEGF-A の発現と分泌に対する多価不飽和脂肪酸の効果と、その機序における G 蛋白共役性受容体 120 (GPR120) と PPAR- γ の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞によるアディポサイトカインの発現・分泌における AT1R の役割の解明

①インターロイキン 6 (IL-6) の発現・分泌における ATR1 および、2 型アンジオテンシン II 受容体(ATR2)の役割の検討

マウス脂肪前駆細胞(3T3-L1 preadipocyte)に分化を誘導後、高カロリーの培養液で培養し、8 日目の成熟脂肪細胞を用いた。選択的 AT1R 遮断薬 (インバースアゴニスト) としてバルサルタン (Val: 50 μ M)、ATR2 遮断薬として PD123319 (PD: 10 μ M)、ATR1 と ATR2 の刺激のためにアンジオテンシン II (Ang: 10 μ M) をそれぞれ目的に応じて組み合わせて培養液中に添加し、2 日後、IL-6 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で、培養液中への放出量を ELISA でそれぞれ評価した。

②ATR1 による IL-6 発現促進の機序の検討

IL-6 の転写を促進する転写因子 NF- κ B、そのプロテアソームによる分解を促進することにより、NF- κ B を抑制する I κ B の細胞内での局在性 (細胞質内か核内か) を Val およびプロテアソーム阻害薬 MG132 (MG: 10 μ M) の添加による両者の含量を細胞質分画、核分画において Western blot 法により定量して調査した。

③ATR1 によるアディポネクチンの発現と分泌制御の調査

ATR1 のインバースアゴニストである Val を成熟脂肪細胞の培養液に添加し、2 日後のアディポネクチンの mRNA 発現とその培養液中への分泌量の変化を調べた。

(2) 脂肪細胞による VEGF-A の発現・分泌に対するエイコサペントエン酸(EPA)の効果とその機序における GPR120 と PPAR- γ の役割の検討

①脂肪細胞による VEGF-A の分泌への EPA の効果の検討

(1) におけると同様に得た 3T3-L1 細胞由来の成熟脂肪細胞の培養液中に 250 μ M の EPA を添加し、24 時間まで VEGF-A の mRNA、タンパク量、培養液中への分泌を、それぞれリアルタイム RT-PCR、Western blot、ELISA にて評価した。

②EPA による VEGF-A 発現・分泌への GPR120 の関与の検討

脂肪細胞を GPR120-siRNA あるいは対照 siRNA (Scr-siRNA) で処理し、GPR120-siRNA による GPR120 発現抑制の程度を Western blot 法で確認し、EPA を添加し 24 時間後の培養液中 VEGF-A 濃度を ELISA にて測定した。

③EPA による VEGF-A 分泌促進作用への PPAR- γ の関与の検討

脂肪細胞において、PPAR- γ 阻害薬である GW9662 (GW: 10 μ M) を用いて PPAR- γ 活性が EPA による VEGF-A 分泌促進効果に及ぼす影響を調べた。

④EPA による VEGF-A の転写促進効果への GPR120 と PPAR- γ の共発現の効果の検討

HEK293 細胞を用いて VEGF-A のプロモーター活性をルシフェラーゼ活性 (蛍光強度) として定量できる実験系を作成し、GPR120 遺伝子 (pGPR120)、PPAR- γ 遺伝子 (pPPAR γ)、または、それらの対照プラスミドを目的毎の組み合わせで導入し、それぞれの EPA 添加時の VEGF-A 転写活性を比較した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞によるアディポサイトカインの発現・分泌における ATR1 の役割について

① ATR1 は定常状態で IL-6 の発現を促進していること、それはインバースアゴニストであるバルサルタンにより抑制された (図 2)。一方、IL-6 の基礎発現には ATR2 は関与していないことが判った (図 3)。

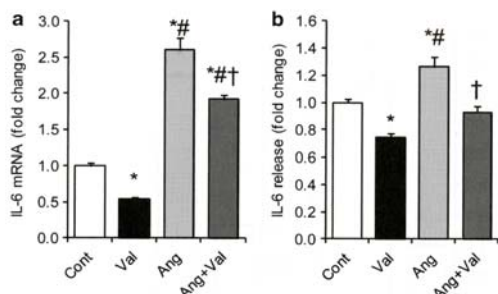


図2 脂肪細胞における ATR1 のインバースアゴニストバルサルタン (Val) の IL-6 の mRNA 発現(a)、培養液中への分泌(b)への効果

Val はアンジオテンシン II (Ang) 刺激による IL-6 mRNA 増加・分泌を抑制するばかりでなく、非刺激下 (Cont) の基礎発現・分泌も抑制した。* $P < 0.05$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. Val, † $P < 0.05$ vs. Ang. (主な発表論文②より引用)。

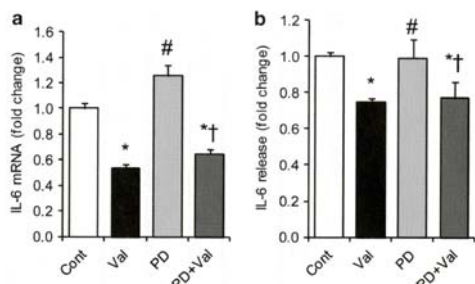


図3 脂肪細胞における ATR2 遮断薬 PD123319 (PD) の IL-6 の mRNA 発現(a)、分泌(b)への効果。PD はバルサルタン (Val) とは異なり、IL-6 mRNA の基礎転写、分泌を抑制せず、Val のインバースアゴニズムにも影響しなかった。* $P < 0.05$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. Val, † $P < 0.05$ vs. Ang. (主な発表論文②より引用)。

② ATR1 の基礎活性をバルサルタンで阻害すると、細胞質内の I κ B- α が増加、核内の NF- κ B が減少した。特に前者は、MG132 でプロテアソームによる分解機構を阻害すると有意に増強された (図 4)。これにより、ATR1 は I κ B- α を増加させ NF- κ B の分解を促進、核内の NF- κ B 含量を減少させることによって IL-6 の転写を抑制することが示唆された。

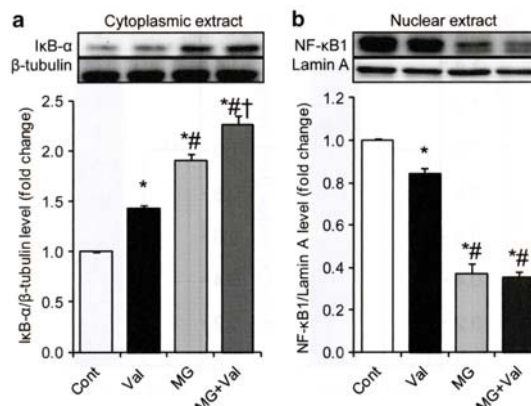


図4 バルサルタン (Val) および MG132 (MG) の細胞質内 I κ B- α 含量(a) および核内 NF- κ B 含量(b) への影響

Val は細胞質内 I κ B- α 含量を増加させ、核内 NF- κ B 含量を減少させた。前者には I κ B- α によるプロテアソーム依存性の NF- κ B 分解促進の関与が示唆された。* $P < 0.05$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. Val, † $P < 0.05$ vs. MG. (主な発表論文②より引用)。

③ ATR1 の基礎活性をバルサルタンで阻害すると、アンジオテンシン II の非存在下の脂肪細胞のアディポネクチン mRNA が有意に増加し、培養液中のそのタンパク濃度は対照に比べて約 60% 増加した (図 5)。

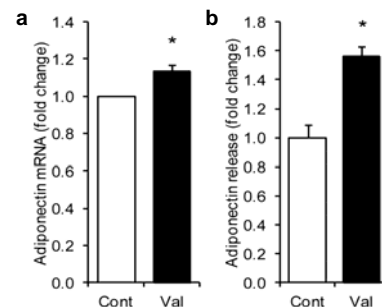


図5 脂肪細胞における ATR1 のインバースアゴニストバルサルタン (Val) のアディポネクチンの mRNA 発現(a)、培養液中への分泌(b)への効果

Val は単独でアディポネクチンの mRNA 発現を有意に増加させ、培養液中への放出を約 60% 増加させた。* $P < 0.05$ vs. Cont. (主な発表論文②より引用)。

(2) 脂肪細胞による VEGF-A の発現と分泌に及ぼす EPA の効果、および、その機序における GPR120 と PPAR- γ の役割について

① EPA 添加 6 時間目においては脂肪細胞による VEGF-A の mRNA の発現、タンパク量、分泌は対照に比べて増加した。その結果 24 時間後には分泌量がさらに有意に増加した (図 6)。

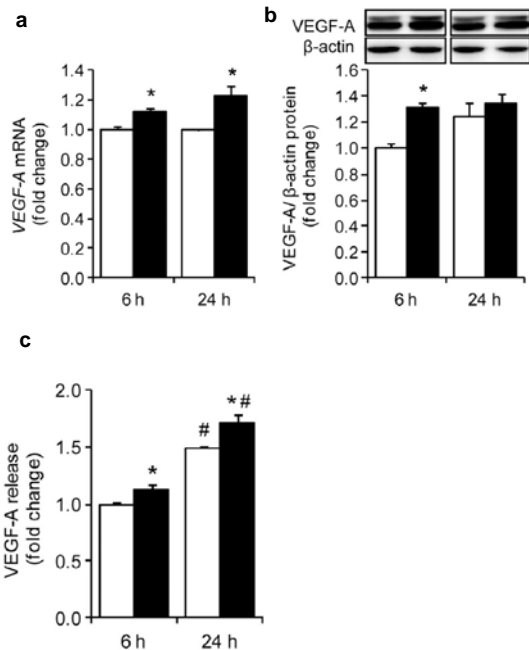


図6 脂肪細胞の VEGF-A の mRNA (a)、タンパク含量(b)、分泌(c)への EPA の効果
EPA 添加により VEGF-A の転写は 24 時間(24h)通して促進され(a)、細胞内含量は 6h でプラトーに達し(b)、培養液中の濃度は 24h 後まで増加した(c)。白: 対照、黒: EPA 添加。*P<0.05 vs. 対照、#P<0.05 vs. 6h。(主な発表論文①より引用)。

②EPA による VEGF-A 発現・分泌への GPR120 の関与

GPR120-siRNA の処理により、対照 siRNA 処理群の 40%にまで GPR120 の発現が抑制された脂肪細胞では、EPA を添加しても VEGF-A の分泌は増加しなかった (図 7)。

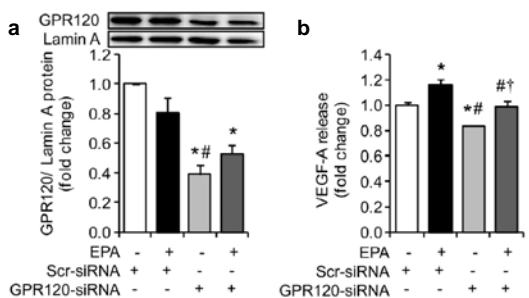


図7 GPR120 の発現抑制の EPA 誘導 VEGF-A 分泌への影響。

GPR120si-RNA 処理により、GPR120 は対照 siRNA (Scr-siRNA)処理細胞群の 40%まで低下した(a)。対照 siRNA 処理群で見られた EPA 添加による VEGF-A 分泌の増加は、GPR120-siRNA 処理群では消失した(b)。*P<0.05 vs. EPA(-)/Scr-siRNA(+)/GPR12-siRNA(-), #P<0.05 vs. EPA(+)/Scr-siRNA(+)/GPR12-siRNA(-), †P<0.05 vs. EPA(-)/Scr-siRNA(-)/GPR120-siRNA(+)(主な発表論文①より引用)。

③EPA による VEGF-A 分泌促進効果への PPAR- γ の関与

GW9662 により PPAR- γ 活性を抑制した群では EPA の添加による VEGF-A 分泌増加が見られなかった (図 8)。

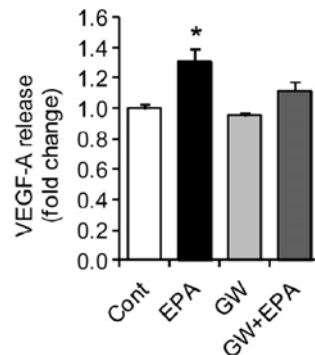


図8 脂肪細胞における EPA による VEGF-A 分泌促進効果への PPAR- γ 活性の影響
GW9662 (GW)を添加した群では EPA による VEGF-A 分泌促進効果が消失していた(GW+EPA)。*P<0.05 vs. Cont (対照)。(主な発表論文①より引用)。

④EPA による VEGF-A の転写促進効果への GPR120 と PPAR- γ の共発現の効果

蛍光強度で定量した HEK293 細胞における EPA 誘導性 VEGF-A のプロモーター活性は、GPR120 遺伝子導入により約 20%、PPAR- γ 遺伝子導入により約 30%、それぞれ有意に増加した。さらに、両者を同時に導入した群では約 60%増加した (図 9)。

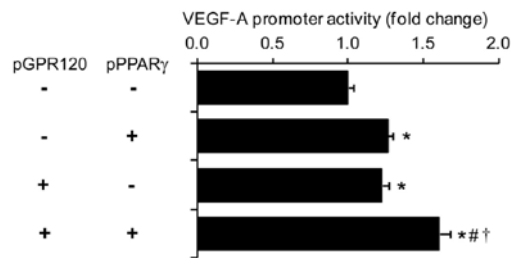


図9 HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼ法による EPA 誘導性 VEGF-A 転写活性への GPR120 と PPAR- γ の遺伝子導入の効果
PPAR- γ と GPR120 の遺伝子導入(それぞれ、pGPR120、pPPAR γ)は同程度に EPA の VEGF-A 転写活性促進効果を増強したが、両者の同時導入はさらに相加的な効果を示した。*P<0.05 vs. pGPR120(-)/pPPAR γ (-), #P<0.05 vs. pGPR120(-)/pPPAR γ (+), †P<0.05 vs. pGPR120(+)/pPPAR γ (-).(主な発表論文①より引用)。

<参考文献>

- Nishimura S, et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*. 2007;56(6):1517-26.
- Kolodgie FD, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003 11;349(24):2316-25.
- Hasan AU, et al. Pioglitazone promotes preadipocyte proliferation by down-regulating p16(Ink4a). *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;411(2):375-80.

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)

① Hasan AU, Ohmori K, Konishi K, Igarashi J, Hashimoto T, Kamitori K, Yamaguchi F, Tsukamoto I, Uyama T, Ishihara Y, Noma T, Tokuda M, Kohno M. Eicosapentaenoic acid upregulates VEGF-A through both GPR120 and PPAR γ mediated pathways in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Endocrinol. 査読有り、2015 5;406:10-8.

② Hasan AU, Ohmori K, Hashimoto T, Kamitori K, Yamaguchi F, Ishihara Y, Ishihara N, Noma T, Tokuda M, Kohno M. Valsartan ameliorates the constitutive adipokine expression pattern in mature adipocytes: a role for inverse agonism of the angiotensin II type 1 receptor in obesity. Hypertens Res. 査読有り、2014; 37(7): 621-8.

[学会発表] (計1件)

① Hasan A, Ohmori K, Konishi K, Ishihara Y, Ishihara N, Ishikawa K, Murakami K, Ishizawa M, Noma T, Kohno M. Eicosapentaenoic Acid Upregulates VEGF-A through GPR120-Mediated and PPAR γ -Mediated Pathways in Mature Adipocytes. *The 79th Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society, April 24-26, Osaka, Japan*

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 浩二 (OHMORI, Koji)
香川大学医学部・准教授
研究者番号：00263913

(2) 研究分担者

ハサン アリフ・ウル (HASAN, Arif Ul)
香川大学医学部・研究員
研究者番号：00570368

河野 雅和 (KOHNO, Masakazu)
香川大学医学部・教授
研究者番号：20153489

野間 貴久 (NOMA, Takahisa)
香川大学医学部附属病院・講師
研究者番号：20363202

井町 仁美 (IMACHI, Hitomi)
香川大学医学部・准教授
研究者番号：80380187

石原 靖大 (ISHIHARA, Yasuhiro)
香川大学医学部附属病院・助教
研究者番号：80532689

堀井 泰浩 (HORII, Taiko)
香川大学医学部・教授
研究者番号：90423425

山下 洋一 (YAMASHITA, Yoichi)
香川大学医学部・准教授
研究者番号：80363208