

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461171

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患に併存するやせ、糖脂質代謝異常、動脈硬化症への新規治療法の開発

研究課題名(英文) To explore new therapy for cachexia, glucose intolerance, and atherosclerosis in COPD

研究代表者

辻 隆夫 (TSUJI, TAKAO)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：30459664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、COPD患者の予後規定因子である体重減少とCOPD併存症に対する新しい治療法の開発を、皮下脂肪の役割に着眼し行った。まずCOPDモデルマウスを用いて、COPDにおける皮下脂肪減少に脂肪組織の血管新生の低下が関与することを同定した。次に、高脂肪食下のCOPDモデルマウスにおいて、皮下脂肪量減少とともに内臓脂肪蓄積及び糖代謝異常といった併存症を認め、血管新生刺激剤による皮下脂肪量増加 皮下脂肪のエネルギー貯蔵能力増加を介して、これらの併存症が改善することを同定した。本研究は、COPD患者の体重減少とCOPD併存症に対する血管新生刺激剤による新規治療法の可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with cachexia and comorbidities that have a significant impact on its prognosis. We explored the role of subcutaneous adipose tissue for new approach to cachexia and comorbidities in COPD, particularly pulmonary emphysema. We identified reduced fat tissue angiogenesis as the mechanism of wasting of subcutaneous adipose tissue in a mouse model with pulmonary emphysema. Wasting of subcutaneous adipose tissue leads to ectopic fat accumulation in visceral adipose tissue and impaired glucose homeostasis due to the lower capacity for storage of surplus energy. A stimulator of angiogenesis improved fat tissue angiogenesis and restored the capacity of subcutaneous adipose tissue, and consequently improved both ectopic fat accumulation and impaired glucose homeostasis. Targeting the vascular component of adipose tissue by modulation of angiogenesis may be developed as a useful therapeutic intervention in cachexic emphysema patients.

研究分野：COPD

キーワード：COPD cachexia 合併症 皮下脂肪 内臓脂肪 糖尿病 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国における慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) 患者の特徴として、肺泡が高度に破壊された気腫型 (肺気腫) が多く、体重減少と皮下脂肪量の減少が顕著である。

(2) 肺気腫の成因論の一つに Endothelial Chronic Destructive Pulmonary Disease (E-COPD) 仮説がある。これは動物実験において血管新生を阻害すると肺気腫を誘導できること、ヒト気腫肺で血管床の減少が認められること、などから肺の血管新生の低下が肺気腫の一因であるとする仮説である。COPDは全身性疾患であり、肺気腫において肺だけでなく皮下脂肪など全身組織にて血管新生の低下が生じている可能性がある。

(3) 脂肪組織は血管新生と脂肪新生が密に連携したユニークな組織である。脂肪組織の重要な血管新生刺激因子である VEGF の働きを抑えると、脂肪組織内の血管新生だけでなく脂肪新生も抑制される。従って、肺気腫における全身組織の血管新生低下を反映し、皮下脂肪の血管新生低下から脂肪新生が低下し体重と皮下脂肪量が減少する機序が考えられる。

(4) 皮下脂肪は余剰エネルギーを必要時 (飢餓時) に利用するための貯蔵場所である。皮下脂肪のエネルギー貯蔵能力は他の臓器への異所性脂肪沈着を予防する点から、"healthy obesity" に重要である。逆に、皮下脂肪に十分な貯蔵能力がなければ余剰エネルギーは内臓脂肪や肝臓などに異所性脂肪として沈着することから、皮下脂肪のエネルギー代謝における重要性が指摘されている。肺気腫では皮下脂肪量の減少によるエネルギー貯蔵能力の低下から異所性脂肪が蓄積するために、体重減少にもかかわらず内臓脂肪蓄積や糖代謝異常を合併することが考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) エラスターゼ気道内注入による肺気腫モデルマウスで皮下脂肪量が減少し、その減少に血管新生の低下が関与するか、また低下した脂肪内血管新生を改善する事で皮下脂肪量の減少が改善するか

(2) 皮下脂肪量が減少した肺気腫モデルマウスでは糖脂質代謝異常が合併するか、また皮下脂肪内血管新生を促し皮下脂肪量の減少が改善する事で合併する糖脂質代謝異常が改善するか

上記2点についての検討を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 肺気腫モデルマウスで皮下脂肪量が減少し、その減少に血管新生の低下が関与するか、また低下した脂肪内血管新生を改善する事で皮下脂肪量の減少が改善するか

肺気腫モデルとしてエラスターゼ惹起肺気腫モデルマウスを使用する。豚膵エラスターゼ (2.5U/匹) を経気道的に注入し4週間後に肺気腫を作成したC57BL/6Jマウス (肺気腫モデル)、対照マウスとして生理食塩水を経気道的に注入したC57BL/6Jマウス (正常モデル) を作成する。各々のマウスに対して血管新生促進物質であるEP2受容体作動薬 ONO-AE1-259 (100 µg/kg、小野薬品より供与) または生理食塩水の腹腔内注射による全身投与を4週間行う。その後、血清成分と内臓脂肪、皮下脂肪、及び肺を摘出し、重量を計測した後に各組織をヘマトキシリン・エオシン染色し、顕微鏡で観察する。脂肪組織における血管床の評価に関しては免疫組織学的に脂肪組織内のレクチンを染色する事によって血管を同定し、脂肪内血管密度を計算し評価する。脂肪新生に関しては定量的RT-PCR法を用いて脂肪新生の重要な転写因子であるPPAR- $\gamma$ 、CEBP $\alpha$ の脂肪組織内のmRNA発現を検討する。

(2) 皮下脂肪量が減少した肺気腫モデルマウスでは糖脂質代謝異常が合併するか、また皮下脂肪量の減少が改善する事で、合

併する糖脂質代謝異常が改善するか  
 肺気腫モデルとしてエラスターゼ惹起肺気腫モデルマウスを使用する。豚膵エラスターゼ(2.5U/匹)を経気道的に注入し4週間後に肺気腫を作成したC57BL/6Jマウス(肺気腫モデル)対照マウスとして生理食塩水を経気道的に注入したC57BL/6Jマウス(正常モデル)を作成する。各々のマウスに対して血管新生促進物質であるEP2受容体作動薬ONO-AE1-259(100 µg/kg、小野薬品より供与)または生理食塩水の腹腔内注射による全身投与を4週間行う。この4週間の期間は糖脂質代謝異常モデルとして各々のマウスに対し高脂肪食(TD831374、Harlan社、42% kcal from fat)を摂餌させる。その後2週間再び通常食を摂餌させた後に、糖代謝の指標としてHomeostatic model assessment of insulin resistance ; HOMA-IR = (インシュリン濃度 X 血糖濃度) / 405 (HOMA-IR)を測定する。脂質代謝の指標として血中脂肪酸 ; Non-ester Fatty Acid (NEFA)を測定する。その後、血清成分と内臓脂肪、皮下脂肪、及び肺を摘出し、重量を計測した後に各組織をヘマトキシリン・エオシン染色し、顕微鏡で観察する。脂肪組織における血管床の評価に関しては免疫組織学的に脂肪組織内のレクチンを染色する事によって血管を同定し、脂肪内血管密度を計算し評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 肺気腫モデルマウスで皮下脂肪量が減少し、その減少に血管新生の低下が関与するか、また低下した脂肪内血管新生を改善する事で皮下脂肪量の減少が改善するか  
 肺気腫モデルマウスでは正常モデルマウスと比較し、体重の減少と皮下脂肪量の減少を認めた。脂肪新生の重要な転写因子であるPPAR- $\gamma$ 、CEBP $\alpha$ の脂肪組織内のmRNA発現量は肺気腫モデルマウスで正常モデルマウスと比較し低下しており、肺気腫モデルマウスでは

脂肪新生が減少し、皮下脂肪量が減少すると考えられた。血管床の検討にて肺気腫モデルマウスでは正常モデルマウスと比較し、皮下脂肪組織の血管床の減少を認めた。肺気腫モデルマウスに血管新生促進物質であるEP2受容体作動薬ONO-AE1-259を4週間投与したところ皮下脂肪組織の血管床減少が改善するとともに皮下脂肪の脂肪新生が改善し、皮下脂肪量が増加した。脂肪組織は脂肪新生と血管新生が密に連携する組織である特徴もふまへ、肺気腫において皮下脂肪量が減少し、その減少に血管新生の低下が関与すること、低下した脂肪内血管新生を改善する事で皮下脂肪量の減少が改善しうると考察した。

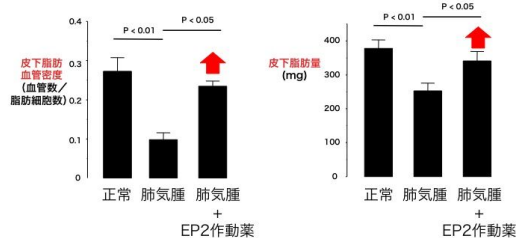
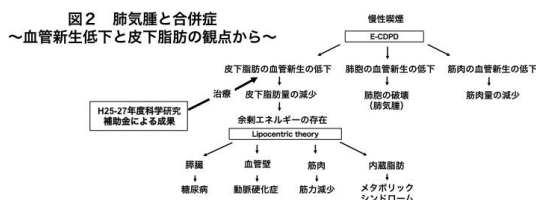


図1 肺気腫モデルマウスにおけるEP2作動薬の効果

(2) 皮下脂肪量が減少した肺気腫モデルマウスでは糖脂質代謝異常が合併するか、また皮下脂肪量の減少が改善する事で、合併する糖脂質代謝異常が改善するか  
 糖代謝の検討において、肺気腫モデルマウスでは正常モデルマウスと比較し、HOMA-IRの増加、すなわちインシュリン感受性の低下を認めた。脂質代謝の検討において、肺気腫モデルマウスと正常モデルマウスの間に血中の脂肪酸値に有意差は認めなかった。肺気腫モデルマウスでは正常モデルマウスと比較し皮下脂肪量及び内臓脂肪量は減少するが、皮下脂肪は脂肪細胞のサイズに違いはないのに対し、異所性脂肪である内臓脂肪は肺気腫モデルマウスでは正常モデルマウスに比べサイズの増加を認めた。異所性脂肪蓄積の指標とされる内臓脂肪/皮下脂肪量の比も肺

気腫モデルマウスでは正常モデルマウスと比較し増加したことから、肺気腫モデルマウスでは正常モデルマウスと比較し異所性脂肪が蓄積し、糖代謝異常が増悪すると考えられた。異所性脂肪が蓄積し、糖代謝異常が増悪する肺気腫モデルマウスに血管新生促進物質であるEP2受容体作動薬ONO-AE1-259を4週間投与したところ、皮下脂肪量の改善とともに内臓脂肪のサイズや内臓脂肪/皮下脂肪量の比の改善を認めた。また、HOMA-IRの減少、すなわちインシュリン感受性の改善を認めた。肺気腫では皮下脂肪量の減少によるエネルギー貯蔵能力の低下から異所性脂肪が蓄積し内臓脂肪蓄積や糖代謝異常を合併するが、低下した皮下脂肪の脂肪内血管新生を改善する事で皮下脂肪量のエネルギー貯蔵能力が回復し、合併する内臓脂肪蓄積や糖代謝異常を改善すると考えられた。



## < 引用文献 >

Chandra D, et al. Am J Respir Crit Care Med 184巻、2011、153-155

Nishimura S, et al. Diabetes 56巻、2007、1517-1526

Wang, et al. PNAS 308巻、2012、1150-1159

## 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6件)

辻 隆夫. 気腫型 COPD と全身の血管新生低下. 臨床呼吸生理、査読なし、47巻、2015、29-30

Tsuji T, Yamaguchi K, Kikuchi R, Itoh M, Nakamura H, Nagai A, Aoshiha K. (7

名中1番目), et al. Promotion of adipogenesis by an EP2 receptor agonist via stimulation of angiogenesis in pulmonary emphysema. Prostaglandins Other Lipid Mediat、査読有、112巻、2014、9-15. DOI: 10.1016/j.prostaglandins

Tsuji T, Kelly NJ, Takahashi S, Leme AS, Houghton AM, Shapiro SD (6名中1番目), et al. Macrophage elastase suppress white adipose tissue expansion with cigarette smoking. Am J Respir Cell Mol Biol、査読有、51巻、2014、822-829. DOI: 10.1165/rcmb.2014-00830C

Itoh M, Tsuji T, Nakamura H, Yamaguchi K, Fuchikami J, Takahashi M, Morozumi Y, Aoshiha K. (8名中2番目), et al. Systemic effects of acute cigarette smoke exposure in mice. Inhalation Toxicology、査読有、26巻、2014、464-473. DOI: 10.3109/08958378

Itoh M, Tsuji T, Nemoto K, Nakamura H, Aoshiha K. (5名中2番目), et al. Undernutrition in patients with COPD and its treatment. Nutrients、査読有、5巻、2013、1316-1335. DOI: 10.3390/nu5041316

[学会発表](計4件)

辻 隆夫. 呼吸器疾患における脂肪細胞の分子病態、O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> の影響。第19回酸素ダイナミクス研究会、東京、新宿区 2015.9.12

辻 隆夫. Reduced Angiogenesis in subcutaneous adipose tissue in emphysematous COPD. 東京アジア呼吸器 COPD シンポジウム、東京、千代田区 2014.7.5

辻 隆夫. COPD のやせの克服～皮下脂肪の観点から～. 第13群馬呼吸器

フォーラム、群馬、高崎市 2014.2.1

〔図書〕(計1件)

辻 隆夫, 青柴 和徹. 中外医学社、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患と高血圧の関連について. 高血圧診療 Q&A、2014、270

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

辻 隆夫 (TSUJI Takao)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：30459664

### (2)研究分担者

青柴 和徹 (AOSHIBA Kazutetsu)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：60231776