

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500422
 研究課題名（和文） 超音波を用いた脂肪組織への介入によるメタボリックシンドロームの治療に関する研究
 研究課題名（英文） Impacts of Ultrasound Exposure to Adipose Tissue in Metabolic Syndrome
 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

研究成果の概要（和文）：超音波照射単独では、脂肪細胞が良質化されなかったため、薬剤との併用を目指して、薬剤単独の効果を調べた。その結果、ピタバスタチン（高脂血症治療薬）は脂肪細胞の分化/成熟を促進し、良質の小型脂肪細胞を増加させ、善玉サイトカインの低下を抑制してインスリン抵抗性を改善すること、ピオグリタゾン（抗糖尿病薬）は細胞周期抑制因子の抑制により細胞周期を促進し、脂肪細胞数を増加させることが明らかになった。これにより、超音波による良質化の標的の一つが、細胞周期制御因であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Because ultrasound radiation alone did not ameliorate adipocyte dysfunction, we investigated the molecular target of frequently used drugs as the adjunct therapy. Pitavastatin enhanced adipocyte proliferation/maturation, increased small adipocyte count, preserved adiponectin level, and improved insulin resistance; pioglitazone suppressed a cell-cycle inhibiting factor and increased adipocyte count. Thus, therapeutic ultrasound with the adjunctive drugs would include cell-cycle inhibitors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010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：循環器内科、超音波医学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：脂肪前駆細胞、スタチン、ピオグリタゾン、アディポサイトカイン、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの病因としての内臓肥満と、その治療の重要性は今や国民に広く認識されている。内臓肥満では脂肪細胞の増殖・肥大化、炎症細胞の浸潤など、いわゆるリモデリングを呈し、アディポカインの分泌様式の悪化など機能異常を生じており、これが基本病態を形成している。

一方、近年、超音波の生体作用が治療に応用されている。我々も、超音波の生体作用を修飾するマイクロバブルを併用して、心臓・血管系疾患を対象に、超音波治療の適応を拡大してきた。ここで、脂肪細胞も、反復伸展刺激反応して細胞内情報伝達を変化させ、その分化を停止することが報告されており、脂肪組織は超音波による機械的刺激にも何ら

かの反応を示すことが期待できる。しかし、本研究開始時点においては、脂肪組織への超音波照射の効果に関する科学的知見は限られており、脂肪細胞における超音波刺激による分子レベルの変化、さらにその全身の代謝面への影響についての報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、超音波を用いて、リモデリングを来たした内臓脂肪組織に直接介入することによって、これを基本病態とするメタボリックシンドロームの是正が可能か否かを明らかにすることを目的とし、具体的には次の3項目を目的とした。

(1) 脂肪細胞に対する超音波の効果を生化学的に検討する。特に培養脂肪細胞のアディポネクチン分泌能を促進するか否かを明らかにすること。

(2) 超音波治療との併用を念頭に、スタチンの脂肪細胞、肥満個体への影響を明らかにし、その標的マーカーを明らかにすること。

(3) 同様に超音波治療との併用を念頭に、特に脂肪細胞の増殖の機序を調査するためにピオグリタゾンの脂肪細胞の増殖への影響とその機序、標的分子を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 培養脂肪細胞への超音波照射実験

① 先ず、超音波発生装置ソノポール 3000 と、直径 2cm の円盤型超音波プローブを用いて、6 ウェルの培養プレートのウェル毎に超音波照射が可能な装置を作成した (図 1)。



図 1 超音波照射装置

次いで、3T3-L1 前脂肪細胞の分化開始後、8 日目から経時的に細胞を採取し内臓肥満 (脂肪細胞の悪質化) の指標となるアディポカイ

ンの遺伝子発現を RT-PCR で調べた。

② 次に、照射条件の最適化を行った。すなわち、発振周波数を 1000KHz、On/Off 時間比 (Duty cycle) を 50%、パルス頻度を 20/秒、照射時間は 60 秒で固定し、Day6 または Day8 の細胞に 0~0.4W/cm² の範囲の種々の強度の超音波を照射し、48 時間後に、培養液中への adiponectin の分泌量を ELISA で測定した。

(2) ピタバスタチンの脂肪細胞への影響と肥満個体のインスリン抵抗性に対する効果

超音波との併用薬剤としてピタバスタチン (Pit) を選択し、脂肪細胞の良質化が可能か検討した。

① *In vitro*: 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化開始後 16 日間 (Day 0-Day 16) 培養し、分化・成熟・肥大モデルとし、その分化・成熟期 (Day0-Day 8) と肥大化期 (Day8-Day16) における、10-100 ng/ml の Pit の効果を調べた。

② *In vivo*: メタボリックシンドロームモデルである KKAY マウスを Pit 治療群 (飲水投与)、無治療群、対象正常群 (C57BL/6J) に分け、7 週齢より 6 週間飼育した。投与量は、6.2mg/day/kg であった。内臓脂肪細胞の肥大の程度を HE 染色、脂肪細胞のサイズおよび数をコールターカウンターで、adiponectin、PAI-1 の mRNA 発現を RT-PCR で、血漿 adiponectin 濃度を ELISA で、インスリン抵抗性をインスリン負荷時血糖値を用いて、それぞれ評価した。

(3) 脂肪細胞の増殖に対するピオグリタゾンの影響

脂肪細胞のマスター転写因子 PPAR- γ の刺激薬であるピオグリタゾン (Pio) の 3T3-L1 細胞の増殖における効果を、細胞周期の観点から観察した。

① ピオグリタゾンの脂肪細胞増殖に及ぼす影響

脂肪細胞数は LDH 法で、細胞増殖は BrdU の取り込み細胞数分画で、細胞周期はフローサイトメトリによる DNA の定量を用いて、それぞれ評価した。細胞周期の制御因子の p18、p21、p27、p16 の mRNA 発現量は RT-PCR で定量した。

② PPAR- γ 2 過剰発現 3T3-L1 細胞の p16^{INK4a} 発現へのピオグリタゾンの影響

3T3-L1 脂肪前駆細胞に pCMV をベクターとして PPAR- γ 2 を過剰発現し (Myc で標識)、Pio 0.5 μ M で刺激し、p16^{INK4a} タンパク量を Western blot で定量した。

4. 研究成果

(1) 培養脂肪細胞への超音波照射実験

① 8 日目には adiponectin の転写が認められ、その後、16 日目まで次第に低下した。一方、PAI-1 は 8 日目から次第に増加した。すなわち、少なくとも Day 8 から 16 までは肥大化・悪質化が進行した。そこで、この悪質化予防

の超音波照射は Day8 付近を標的とした。
 ②超音波強度依存的に adiponectin の分泌が低下した。また、その強度依存性は adiponectin の分泌が十分に成熟した Day8 に比べて成熟前 (Day6) においてより顕著であった。いずれにしても、超音波照射単独では、脂肪細胞の良質化は得られず、薬剤の併用などの工夫が必要であることが明らかとなった。

(2) ピタバスタチンの脂肪細胞への影響

① *In vitro*: 分化・成熟期において、中性脂肪含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) は無治療群 (Pit 0) で 267 ± 104 、10 ng/ml (Pit 10) では 274 ± 19 、100 ng/ml (Pit 100) では 294 ± 8 であった。Pit 0、Pit 10、Pit 100 で、aP2 mRNA/18S-rRNA はそれぞれ、 1.49 ± 0.63 、 1.28 ± 0.29 、 1.17 ± 0.35 であり、Adiponectin mRNA/18S-rRNA は、 0.62 ± 0.23 、 0.71 ± 0.26 、 0.61 ± 0.07 であった。いずれの項目にも 3 群間に有意差はなかった。

一方、肥化期においては、中性脂肪含量は Pit 0 で 683 ± 88 、Pit 10 では 632 ± 34 、Pit 100 では 534 ± 36 であった ($p < 0.05$ vs. Pit 0) (図 2)。さらに、Adiponectin mRNA/PAI-1 mRNA 比は、Pit 0 で 0.18 ± 0.03 、Pit 10 では 0.42 ± 0.11 、Pit 100 では 0.60 ± 0.10 であった ($p < 0.05$ vs. Pit 0, $p < 0.05$ vs. Pit 10) (図 3)。

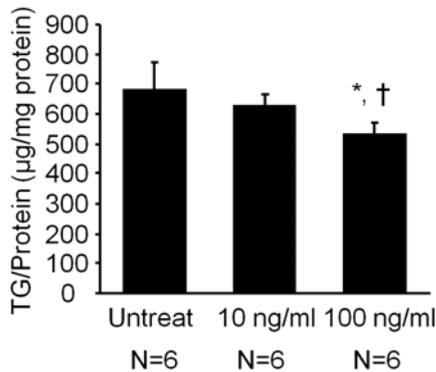


図 2 培養脂肪細胞の肥化期における中性脂肪含量へのピタバスタチンの効果
 $*p < 0.05$ vs. Untreat, $\dagger p < 0.05$ vs. 10 ng/ml

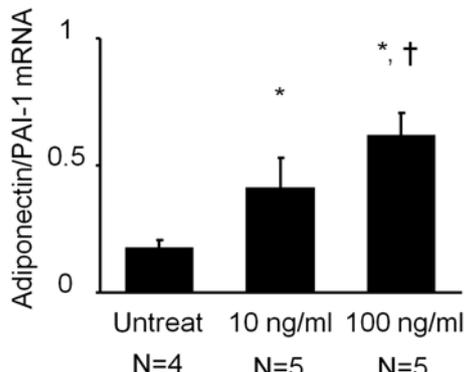


図 3 培養脂肪細胞の肥化期におけるアディポカイン発現様式へのピタバスタチンの効果
 $*p < 0.05$ vs. Untreat, $\dagger p < 0.05$ vs. 10 ng/ml

すなわち、Pit は用量依存的に脂肪過剰蓄積を防ぎ、アディポカイン産生パターンを改善した。

② *In vivo*: Pit 治療群では、HE 染色では、脂肪細胞が小型化しており (図 4 上)、コーンカウンターによる評価では、肥大脂肪細胞 (容積 ≥ 4000 pl) が大きく減少していた (図 4 下)。

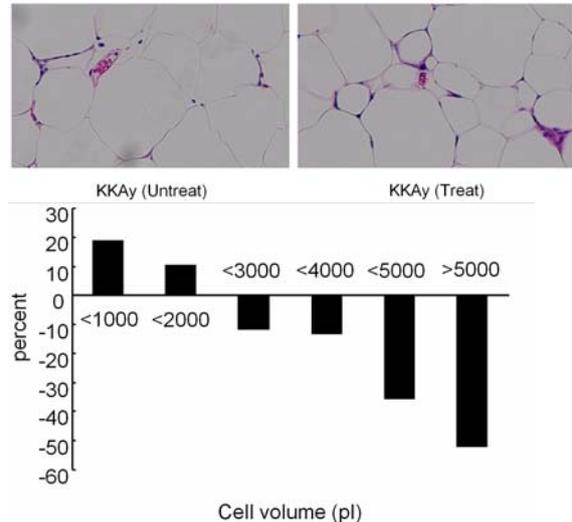


図 4 肥満モデル (KKAY) における脂肪細胞サイズへのピタバスタチンの効果

ここで、Pit 投与によっても、脂肪重量は変化がなかったことより、脂肪細胞数が増加した可能性があり、Pit による脂肪組織の良質化には脂肪細胞の増加 (増殖) が関与する可能性が示唆された。

一方、血漿 adiponectin 濃度は、Pit 治療群で有意に増加していた (12.5 ± 3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vs. 8.3 ± 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $p < 0.05$) (図 5)。さらに、腹腔内へのインスリン投与によるインスリン抵抗性試験では、糖の曲線下面積が 16% 減少した ($p < 0.05$) (図 6)。すなわち、*in vivo* では Pit は脂肪細胞を小型化し、増殖させることにより、脂肪総重量をえることなく、アディポカイン産生パターンを改善し、インスリン抵抗性を改善すると考えられた。

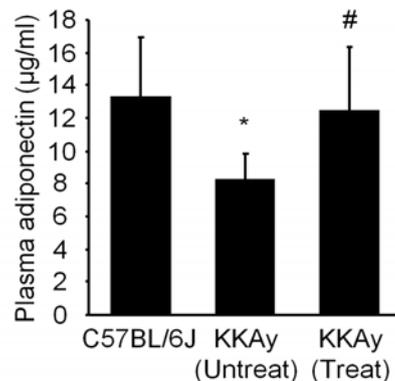


図 5 肥満モデル (KKAY) における血漿 adiponectin へのピタバスタチンの効果
 $*p < 0.05$ vs. C57BL/6J, $\#p < 0.05$ vs. 無治療 KKAY

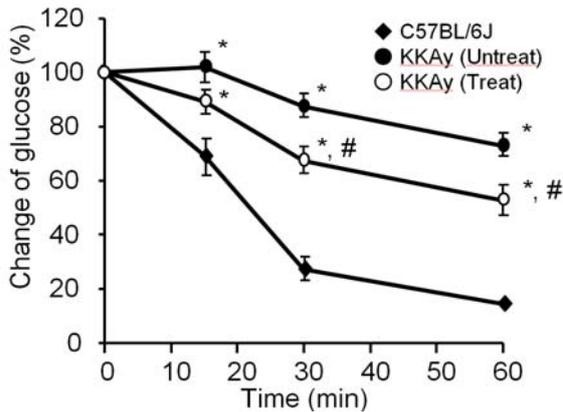


図6 肥満モデル(KKAY)におけるインスリン抵抗性へのピタバスタチンの効果

*p<0.05 vs. C57BL/6J, #p<0.05 vs. 無治療 KKAY

(3) ピオグリタゾン刺激による脂肪細胞増殖の機序に関する調査

① ピオグリタゾンの脂肪細胞増殖に及ぼす影響

Pio 刺激により、脂肪細胞数は分化誘導後 Day1 から Day4 のどの段階でも有意に増加していた (図 7A)。BrdU の取り込み細胞数の割合も有意に増加 (図 7B)、Pio は細胞増殖を促進することが示された。さらに、細胞周期は、Pio により、G2/M 分画が有意に増加、G0/G1 分画が有意に現症し、細胞分裂が促進されることが示された (図 7C)。

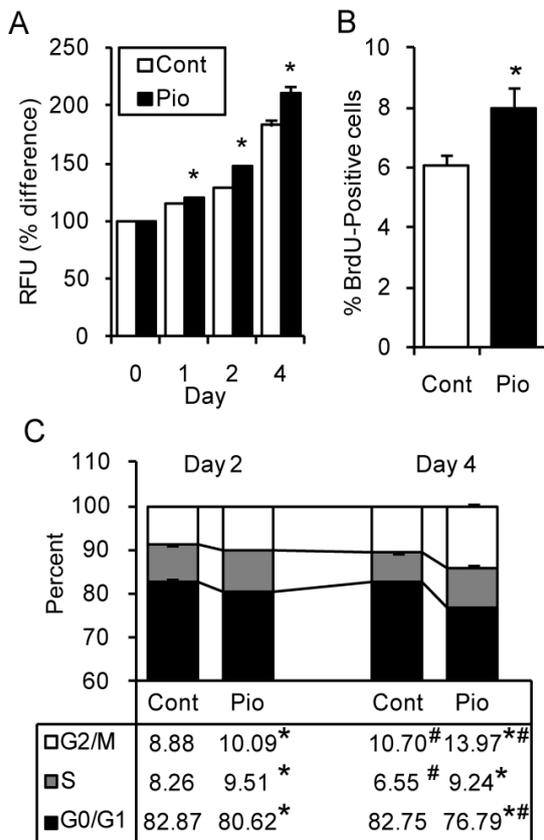


図7 3T3-L1 脂肪細胞の増殖、細胞周期に対するピオグリタゾンの効果

*p<0.05 vs. Cont, #p<0.05 vs. Day2

② PPAR- γ 2 過剰発現 3T3-L1 細胞の p16^{INK4a} 発現へのピオグリタゾンの影響

3T3-L1 細胞において、分化開始直後からの Pio 投与により、Day4 では、無治療に比べて、p18 の発現が増加、p21、p27 には差はなく、p16INK4a の発現は無治療の 40%程度にまで減少した。

さらに PPAR- γ 2 を過剰発現させた 3T3-L1 細胞に Pio を加えると、p16^{INK4a} のタンパク量が激減した (図 8)。

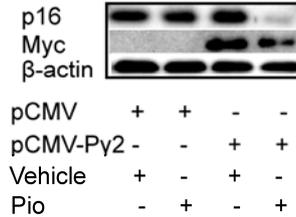


図8 PPAR- γ 2 過剰発現 3T3-L1 脂肪細胞の p16^{INK4a} のタンパク発現に対するピオグリタゾンの効果

すなわち、ピオグリタゾンを用いた PPAR- γ 刺激による脂肪細胞の増殖には、細胞周期を抑制する cyclin dependent kinase inhibitor の一つである p16^{INK4a} の抑制が寄与することが明らかになった。

以上より、本研究は、超音波照射により脂肪細胞の良質化が可能か否かを明らかにすることを目的としたが、超音波単独では、脂肪細胞自体は良質化せず、むしろ善玉アディポカインの分泌が低下した。ただし、超音波への感受性は増殖期において高く、この時期に脂肪細胞の増殖を促進する薬物との併用の可能性が示唆された。そこで、薬剤との併用を追究するために、メタボリックシンドロームで頻用される薬剤を用いた基礎実験を行った。これらの結果から、ピタバスタチンは単独でも脂肪細胞を小型化、良質化し、個体のインスリン抵抗性を改善させること、また、PPAR- γ 刺激薬ピオグリタゾンを用いた検討から、増殖期に脂肪細胞を良質化するための介入の標的分子の候補として、PPAR- γ に負の調節を受ける p16^{INK4a} が挙げられることが明らかとなった。これらの結果は、国内外の学会で発表し、英文原著 (5 参照) として出版した。

さらに、本課題から派生した実験において、ピオグリタゾンは 3T3-L1 細胞において、p19^{Arf}、p53 の発現を抑制することにより、その加齢に伴う機能低下を軽減する可能性が示された。その機序、臨床的意義などの検討を含む別の研究課題として新たな展開が期待されるに至っている。

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3件、うち主要論文を示す)

① Hasan AU, Ohmori K, Hashimoto T, Kamitori K, Hirata Y, Ishihara Y, Okamoto N, Noma T, Kosaka H, Tokuda M, Kohno M. Pioglitazone promotes preadipocyte proliferation by downregulating p16(Ink4a). *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 411(2):375-80. 査読有

② Ishihara Y, Ohmori K, Mizukawa M, Hasan AU, Noma T, Kohno M. Beneficial direct adipotropic actions of pitavastatin in vitro and their manifestations in obese mice. *Atherosclerosis.* 2010;212(1): 131-8. 査読有

[学会発表] (計4件、うち主要発表を示す)
発表者(代表)名、発表表題、学会名、発表年月日、発表場所

① Ishihara Y (代表), Ohmori K, Hasan U A, Noma T, Iwado Y, Murakami K, Namba T, Kitaizumi K, Okamoto N, Kohno M. Beneficial Direct adipotropic actions of pitavastatin in vitro and their manifestations in a mouse model of obesity. 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2010年7月15日。岐阜市。

② Hasan, A.U (代表), Ohmori K, Hashimoto T, Kamitori K, Hirata Y, Ishihara Y, Okamoto N, Noma T, Tokuda M, and Kohno M. Pioglitazone links PPAR γ dependent adipogenesis pathways to tumor suppressor p53 pathways through p16. The 3rd Joint Symposium between Chiang Mai University and Kagawa University, 2010年8月24-26日。タイ国、チェンマイ市。

③ Hasan, A.U (代表), Ohmori K, Hashimoto T, Kamitori K, Hirata Y, Ishihara Y, Okamoto N, Noma T, Tokuda M, and Kohno M. PPAR γ enhances adipogenesis by down-regulating a cell cycle inhibitor, p16INK4a, in adipocytes. Annual Meeting of European Society of Cardiology. 2010年8月28日-9月1日。スウェーデン国、ストックホルム市。

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

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

村尾 孝児 (MURAO KOJI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 20291982

四宮 かおり (SHINOMIYA KAORI)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70380160

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

ハサン ウル アリフ (HASAN UL ARIF)
香川大学・医学部・外国人研究者
研究者番号: 00570368

吉田 潤史 (YOSHIDA JUNJI)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50448370

(H20→21, 研究分担者)

雪入 一志 (YUKIIRI KAZUSHI)
香川大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30346647

(H20→21, 研究分担者)