

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790896

研究課題名(和文)

血管ホルモンによる細胞代謝制御のメタボリックシンドロームと加齢における意義

研究課題名(英文)

Significance of vascular hormones in cellular metabolism and the progression of metabolic syndrome and aging

研究代表者

宮下 和季 (MIYASHITA KAZUTOSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50378759

研究成果の概要(和文):

最近の大規模臨床試験で、血圧調節が主たる役割である血管ホルモンが、メタボリックシンドローム発症に関与する可能性が明らかにされ注目されている。本研究において、代表的な血管ホルモンであるナトリウム利尿ペプチドやアンジオテンシンIIが、骨格筋のミトコンドリアを制御して、酸素消費を調節することが明らかになった。これらの知見は、血管ホルモンが循環調節ホルモンとして作用するのみならず、代謝調節ホルモンとして肥満、糖尿病、メタボリックシンドロームの発症進展に関与することを示している。

研究成果の概要(英文):

Recent clinical studies have indicated that dysregulation of vascular hormones would cause metabolic diseases. The present study demonstrated that natriuretic peptides and angiotensin II could modulate oxygen consumption by regulating muscle mitochondria. The findings suggest significant roles for vascular hormones as modulators of both oxygen supply and consumption, which are essential for the progression of metabolic syndrome and aging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学，内分泌学

キーワード：内分泌学，メタボリックシンドローム，血管ホルモン，エネルギー代謝，ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核細胞において好氣的代謝とエネルギー産生の大部分を担う細胞内オルガネラであり、ミトコンドリア機能不全に伴う代謝障害は、メタボリックシンドロームや加齢性疾患の発症に直結する。肥満

患者において骨格筋ミトコンドリアの減少が報告されており、その結果基礎代謝が低下して摂食量に見合うエネルギー消費に至らなくなることが、肥満の根本原因となる可能性が指摘されている。2型糖尿病患者におい

ても糖尿病発症前からミトコンドリア機能異常を呈することが知られており、インスリン抵抗性の出現にミトコンドリアが関与することが示唆されている。

申請者はこれまで代表的な心血管ホルモンである、アンジオテンシン II (AngII) やナトリウム利尿ペプチド (NP) の動脈硬化性疾患における意義について検討を続け、血管拡張ホルモンであるアドレノメデュリン (AM) が、血管構築や血管再生を制御することで、動脈硬化性疾患を抑制することを見出してきた。一方最近の大規模臨床試験においては、心血管ホルモンが代謝疾患発症に関与することが明らかにされ、動脈硬化性疾患のみならずメタボリックシンドローム発症進展においても、血管ホルモンの意義が注目されている。すなわち血中 NP 低値患者は、体重が増加しやすいことが示され、アンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB: angiotensin II receptor blocker) は、糖尿病新規発症を抑制することが報告されている。

そこで申請者は、心血管ホルモンが末梢臓器ミトコンドリアを介した代謝作用を有する可能性に着目し、心血管ホルモンによるエネルギー代謝制御の病態生理学的意義に焦点をあてた本研究を発想した(図1)。

2. 研究の目的

血圧調節が主たる役割と考えられていた心血管ホルモンが、末梢臓器で代謝作用を発揮する可能性が示唆されたものの、その詳細な機序はこれまで明らかにされていない。そこで本研究では、心血管ホルモンが末梢臓器のミトコンドリアに直接作用し、細胞代謝を調節する可能性につき検討した。また、このような心血管ホルモンの代謝作用が、メタボリックシンドローム発症に与える意義を検討した。

3. 研究の方法

代表的な血管収縮ホルモンであるアンジオテンシン II (AngII) と、代表的な血管拡張ホルモンであるナトリウム利尿ペプチド (NP) の、ミトコンドリアにおける作用とエネルギー代謝に与える影響を検討した。ホルモンないしその阻害薬を添加した培養骨格筋細胞 C2C12 と、浸透圧ポンプを用いた AngII 投与マウス、ならびに NP 系遺伝子改変マウスを用いた検討を行った。AngII を用いた検討においては、AngII 1 型受容体 (AT1R) 遮断薬である CS-866 と AngII 2 型受容体 (AT2R) 遮断薬である PD123319 等を用いることで、AT1R, 2R それぞれの意義を検討した。NP 系遺伝子改変マウスとして、NP のひとつである BNP を過剰発現し BNP 血中濃度が野生型のおよそ 100 倍になるマウス (BNP-Tg), NP 下流の細胞内シグナルである cGMP 依存性タンパクキナーゼ (cGK) を全身で過剰発現したマウス (cGK-Tg), 細胞膜に存在する NP 受容体である GCA を全身で欠損したマウス (GCA-KO) を用いた。

C2C12 細胞にホルモンを添加して 24 ~ 48 時間後のミトコンドリア量, ミトコンドリア活性酸素種 (ROS), ATP 産生を、蛍光プローブとプレートリーダーを用いた方法で定量した。PGC1 α , PPAR δ , ATP synthase, UCP3, SOD2 などミトコンドリア生合成ならびにミトコンドリア機能に関与する遺伝子群を定量的 PCR 法やウエスタンブロット法を用いて解析した。AngII 投与マウスならびに NP 系遺伝子改変マウスにおける体重, 耐糖能を評価し、呼気ガス分析装置で酸素消費, 糖燃焼, 脂質燃焼を定量し、マウスから摘出した骨格筋においてミトコンドリア量, ミトコンドリア酵素活性等を解析した。

以上の手法で、血管ホルモンのミトコンドリアでの直接作用とエネルギー代謝に及ぼ

す効果を培養細胞で評価し、血管ホルモンの骨格筋ミトコンドリアでの作用とメタボリックシンドローム発症に与える影響を、動物個体レベルで検討した。

4. 研究成果

C2C12 骨格筋細胞を用いて NP/cGK カスケードがミトコンドリアと細胞エネルギー代謝に与える効果を検討した。過栄養を模倣する高グルコース高インスリン条件下で C2C12 骨格筋細胞を培養するとミトコンドリア量が減少し ROS 産生は増加した。その状態でナトリウム利尿ペプチド(NP)ないしは、その細胞内セカンドメッセンジャーである cGMP を添加することにより、ミトコンドリア活性化に関する分子である PGC1 α , ATP synthase 等の発現が増加してミトコンドリア量が回復し、また UCP3, SOD2 の発現が増加して ROS 産生が減少したにもかかわらず、ATP 産生は増加した。

NP/cGK カスケードがミトコンドリアに及ぼす効果とメタボリックシンドローム発症に与える影響を、遺伝子改変動物を用いて検討した。8 週間の高脂肪食負荷後、BNP -Tg マウスの体重は Wt と比較して有意に減少し(18 週齢 Wt43.0 \pm 0.9g, BNP -Tg38.9 \pm 0.9g; P<0.01)、高脂肪食に伴う脂肪肝と耐糖能悪化が BNP -Tg マウスで有意に抑制されていた。また、骨格筋での異所性脂肪の蓄積も BNP -Tg マウスで抑制されていた。高脂肪食負荷 BNP -Tg マウスの骨格筋ミトコンドリアは野生型マウスと比較して有意に増加し、呼気ガス分析で評価した体重当たりの酸素消費が亢進した。特にマウスの非活動期である昼間帯の脂肪燃焼増加が顕著で、自由摂食から絶食した際の脂肪燃焼亢進も BNP -Tg マウスで有意に亢進した。

cGK -Tg マウスは摂食量が落ちないにもかかわらず脂肪組織が減少し、標準食において

も体重が低下して耐糖能良好であった(図 2)。呼気ガス分析においては標準食で脂質燃焼と酸素消費の亢進を認めた。その骨格筋においては、ミトコンドリア生合成と脂質燃焼に関与する分子である PGC1 α , PPAR δ の発現が増加しており、電子顕微鏡における観察では骨格筋全体に高密度で巨大なミトコンドリアが分布していた(図 3)。NP レセプターである GCA, GCB の骨格筋における発現は、高脂肪食にて低下し、絶食により回復した。また、過栄養に伴う GCA 発現低下状態を模倣する、高脂肪食負荷 GCA ヘテロノックアウトマウスは、野生型マウスよりも体重が有意に増加した。

以上、BNP -Tg マウスと cGK -Tg マウスは、メタボリックシンドローム抵抗性といえる表現系を呈しており、それらマウスの摂餌量に変化がないにもかかわらず、高脂肪食負荷に伴う肥満、脂肪肝、骨格筋脂質蓄積、耐糖能悪化が抑制されていた。特に cGK -Tg マウスは標準食においても強い体重減少を示し、耐糖能が良好であった。その基盤メカニズムとして NP/cGK カスケード亢進に伴う骨格筋ミトコンドリアの増加と、脂肪燃焼ならびに酸素消費の亢進が見出された。培養骨格筋細胞を用いた実験においては、NP/cGK カスケード活性化に伴う PGC1 α , PPAR δ 発現亢進とミトコンドリア活性化、ならびに UCP3, SOD2 蛋白レベル増加と、ROS 増加を伴わない ATP 産生亢進が認められた。これらの結果より NP/cGMP/cGK カスケードは、血圧低下や虚血後の血管再生を介した心血管系組織での臓器保護作用を有するのみならず、末梢酸素消費臓器において骨格筋ミトコンドリア生合成を増加させ、脂質燃焼を亢進させることで、過栄養に拮抗する細胞代謝変化をもたらすと考えられた。

続いて、AngII がミトコンドリアと細胞工

エネルギー代謝に与える効果を、C2C12 培養骨格筋細胞を用いて検討した。蛍光プローブで評価したミトコンドリア量は、 10^{-8-6} mol/l の AngII を添加して 48~96 時間後に濃度依存的に減少し、ROS 産生増加を伴っていた(図 4)。一方 ATP 産生には有意な変化を認めなかった。薬剤および siRNA にて AngII の受容体である AT1R もしくは AT2R を阻害して AngII を添加したところ、AngII によるミトコンドリア減少は AT2R の阻害で回復し、AT1R の阻害では有意な変化を認めなかった。AngII による PGC1 α 発現の低下もミトコンドリア量と平行に AT2R の阻害で回復し、AT1R の阻害では有意な変化を認めなかった。一方、ROS 産生は AT1R, AT2R どちらの阻害でも有意に抑制された。発現ベクターで AT1R ないしは AT2R を過剰発現して AngII を投与すると、AT2R 過剰発現群でミトコンドリア量が著明に減少した。

浸透圧ポンプを用いて AngII を投与したマウスにおける検討では、血圧に影響を与えない少量の AngII (0.1 μ g / g/day)を一週間投与したマウスにおいて、骨格筋ミトコンドリア量が減少し、その減少と相関して脂質燃焼低下、骨格筋脂質蓄積、耐糖能悪化を認めた。AngII によるマウス骨格筋でのミトコンドリア減少は、AT1R, AT2R どちらの阻害でも抑制され、それに伴い脂質燃焼、骨格筋脂質蓄積、耐糖能も改善した(図 5)。すなわち、培養細胞では AT1R を介したシグナルはミトコンドリア量に影響を与えなかったが、マウスにおいては AngII によるミトコンドリア量の減少に AT1R が関与していた。

以上マウスにおいて AngII は、骨格筋ミトコンドリア数を減少させ、その機能を低下させることで脂肪燃焼の減少と骨格筋脂質蓄積を引き起こし、セラミド等インスリンシグナルを抑制する脂質代謝物を増加させるこ

とで、骨格筋インスリン抵抗性を惹起すると考えられた。培養骨格筋細胞を用いた実験において、AngII は PGC1 α 発現を抑制してミトコンドリアを減らす一方で、活性酸素種の産生を増加させた。

これらの結果は、血管ホルモンが循環調節ホルモンとして高血圧症と動脈硬化性疾患の発症に関与するのみならず、代謝調節ホルモンとして肥満、糖尿病、メタボリックシンドロームの発症進展に関与することを示している。特に NP と AngII は、骨格筋ミトコンドリアと酸素消費の制御において、相反する作用を有しており、血圧調節ならびに動脈硬化発症進展における拮抗作用と同様に、NP と AngII が、ミトコンドリア制御と代謝調節においても拮抗作用を有する可能性が示唆される。

また、これら心血管ホルモンの代謝作用に関する知見は、血流制御による酸素供給の調節を主たる役割とする血管ホルモンが、ミトコンドリアを介して酸素利用の調節にも関与することを示している。心血管ホルモンによる酸素供給と酸素利用の協調的制御は、状況に応じた適切な代謝応答をもたらし、末梢臓器に運動能増強や虚血耐性などの好ましい効果を与えようと考えている(図 6)。

図 1 研究概要。本研究では申請者がこれまで一貫して研究を続けてきた心血管ホルモンがミトコンドリアを介して細胞代謝に影響を与え、代謝疾患並びに加齢性疾患発症に関与する可能性を検討した。

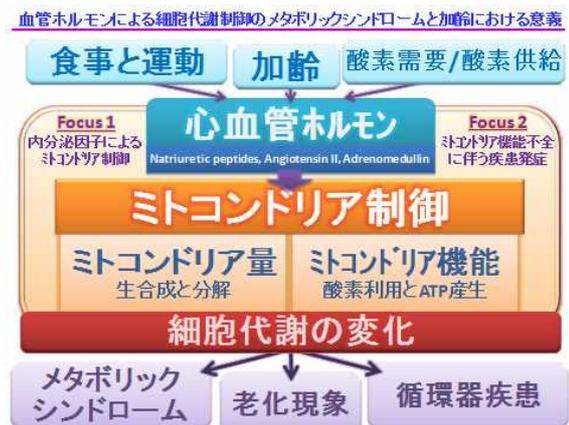


図 2. cGK-Tg マウスは標準食においても体重が著明に減少し、耐糖能が改善した。

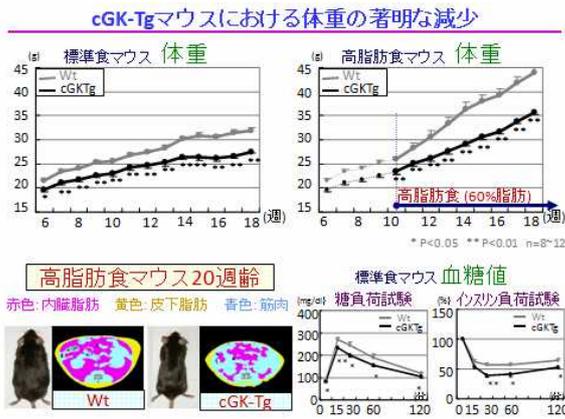


図 3. 電子顕微鏡を用いた観察では、cGK-Tg マウス骨格筋において巨大なミトコンドリアを高密度で認めた。

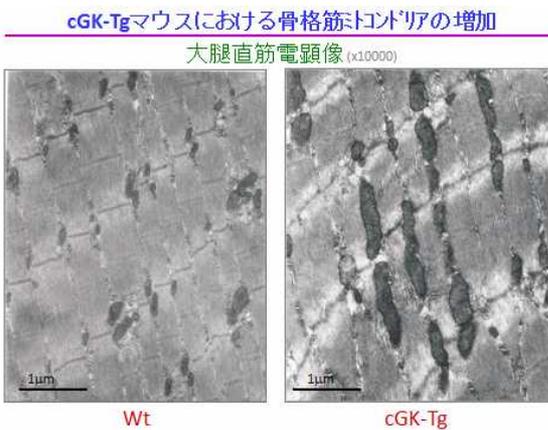


図 4. 培養骨格筋細胞を用いた検討で、AngII はミトコンドリア量を減少させ、ROS 産生を増加させた。

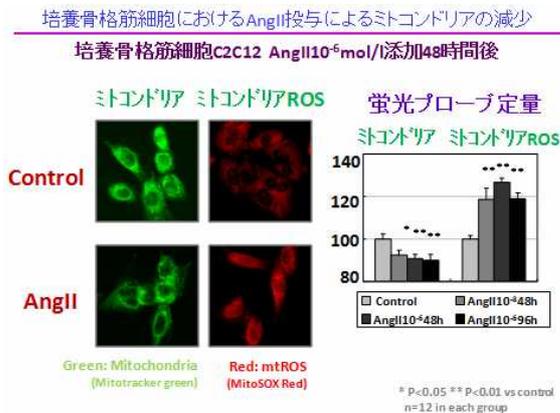


図 5. マウスへの AngII 投与で骨格筋ミトコンドリアの減少と相関して骨格筋脂質蓄積が増加し耐糖能が悪化した。

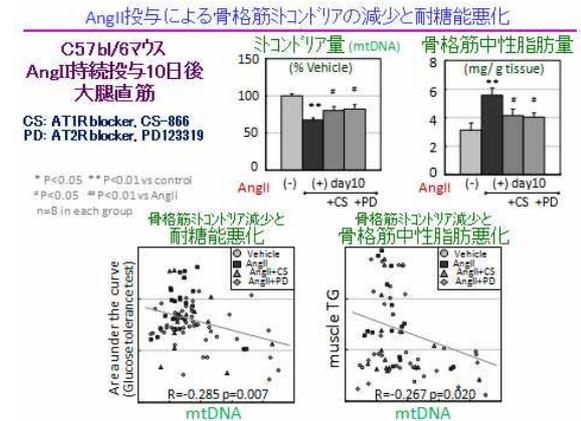


図 6. 心血管ホルモンによる酸素供給と酸素利用の協調的制御による、末梢臓器の合理的適応の可能性。



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 16 件)* corresponding author

- 宮下和季, 伊藤裕 高血圧症の治療 糖尿病とメタボリックシンドロームを合併した患者 日本内科学会雑誌 2011 100: 376-384 (査読無)
- 宮下和季, 伊藤裕 メタボリックシンドロームとレニン・アンジオテンシナルドステロン系 Renin Academy Japan Journal 2011 6: 5-8 (査読無)

3. Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, Tamura N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Nakao K. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP dependent - protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes*. 2009 58: 2880 -2892 (査読有)
4. Mitsuishi M, Miyashita K*, Muraki A, Itoh H. Angiotensin II reduces mitochondrial content in skeletal muscle and affects glyceic control. *Diabetes*. 2009 58: 710 -718 (査読有)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Miyashita K, Mitsuishi M, Muraki A, Itoh H. cGMP dependent protein kinase cascades increase muscle mitochondrial content and prevent obesity and diabetes. 3rd International Conference on Drug Discovery & Therapy Feb 10 2011 Dubai, United Arab Emirates.
2. 宮下和季, 三石正憲, 村木絢子, 伊藤裕 骨格筋ミトコンドリア制御と酸素利用におけるレニンアンジオテンシン系とナトリウム利尿ペプチドの拮抗関係 第 16 回アンジオテンシンカンファレンス 2011 年 2 月 5 日 東京
3. 三石正憲, 宮下和季, 村木絢子, 伊藤裕 心血管因子を用いた骨格筋抗加療法の開発とメタボリックシンドローム治療への応用 第 33 回日本高血圧学会 2010 年 10 月 15 日 福岡
4. Miyashita K, Itoh H, Nakao K. Natriuretic Peptides/ cGMP - dependent Protein Kinase Cascades Increase Muscle Mitochondrial Content and Prevent Obesity. 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension Sep 30. 2010 Vancouver, Canada.
5. Mitsuishi M, Miyashita K, Muraki A, Itoh H. Angiotensin II Reduces Muscle Mitochondrial Content and Affect Glyceic Control. 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension Sep 30. 2010 Vancouver, Canada
6. 村木絢子, 宮下和季, 三石正憲, 伊藤裕 スタチンが骨格筋に与える影響の検討及び CoenzymeQ10 の効果 第 53 回日本糖尿病学会 2010 年 5 月 28 日 岡山
7. 三石正憲, 宮下和季, 村木絢子, 伊藤裕 AngiotensinII による骨格筋ミトコンドリア制御と糖脂質代謝への関与

第 83 回日本内分泌学会 2010 年 3 月 26 日 京都

8. 宮下和季, 伊藤裕, 田村尚久, 福永康智, 曾根正勝, 山原研一, 田浦大輔, 犬塚恵, 園山拓洋, 中尾一和 ナトリウム利尿ペプチド/cGK カスケードによる骨格筋ミトコンドリア制御の抗肥満、抗糖尿病作用 第 11 回日本心血管内分泌代謝学会 2009 年 10 月 24 日 大宮

〔図書〕(計 3 件)

1. 宮下和季, 三石正憲, 伊藤裕 心血管ホルモンによるミトコンドリア制御 中外出版社 Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2011 183 -189
2. 宮下和季, 三石正憲, 村木絢子, 伊藤裕 メタボリックドミノ 筒井裕之編 メディカルレビュー社 Cardio Diabetic Frontier 2010 75 -81

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.keio-emn.jp/donation/01.html#02>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 和季 (MIYASHITA KAZUTOSHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 50378759

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

三石 正憲 (MITSUISHI MASANORI)
慶應義塾大学・医学部・大学院生
村木 絢子 (MURAKI AYAKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
田蒔 昌憲 (TAMAKI MASANORI)
慶應義塾大学・医学部・助教