

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号:13201

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2010~2011

課題番号:22790852

研究課題名(和文) 視床下部RAS系の破綻が中枢ミトコンドリア障害を介したエネルギー代謝に及ぼす影響

研究課題名(英文) Impact of obesity-induced dysregulation of renin-angiotensin-aldosterone system in the hypothalamus on the homeostasis of energy metabolism.

研究代表者

和田 努(WADA TSUTOMU)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号:00419334

研究成果の概要(和文): Angiotensin2(AT2)は末梢の各組織においてROS産生を亢進し、インスリン抵抗性を誘導する。我々はAT2と独立してアルドステロンがROS産生を介してインスリン抵抗性を誘導することを示した。また肥満・インスリン抵抗性・脂肪性肝炎モデルマウスに選択的MR阻害剤(MRA)を全身投与したところ、肝臓での炎症、線維化および糖脂質代謝が改善した。

高脂肪食負荷(HFD)マウスおよびdb/dbは視床下部において炎症性サイトカインの発現亢進を認めたが、MRAの全身投与はこれを抑制しなかった。

マクロファリア細胞のモデルとしてBMDMを用いて炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。H₂O₂およびROSを消去するNACの前処置はLPS処置による炎症性サイトカイン発現に影響しなかった。ARBの前処置もLPSによる炎症性サイトカイン発現に影響しなかったが、MRAはこれを強く抑制した。

研究成果の概要(英文): Angiotensin2 (AT2) stimulates ROS production in peripheral tissues and promotes insulin resistance. We have indicated that aldosterone also induces insulin resistance through ROS production independent of AT2. To demonstrate the in vivo impact of MRA, we administrated mineralocorticoid antagonist (MRA) to the mice model of metabolic syndrome accompanied with steatohepatitis (NASH model). Administration of MRA effectively ameliorated systemic insulin resistance, dyslipidemia, and abnormal histological change in the liver.

Diabetic models of both high-fat diet (HFD)-fed mice and db/db mice showed elevated expressions of proinflammatory cytokines in the hypothalamus. However, systemic administration of MRA did not affect these inflammatory changes in the hypothalamus.

In bone marrow derived macrophage (BMDM), pretreatment of H₂O₂ or NAC, a ROS scavenger did not affect LPS-induced TNF α production. In addition, pretreatment with MRA, but not ARB effectively ameliorated the enhanced production.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：アルドステロン、炎症性サイトカイン、糖尿病、ROS、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や肥満状態では視床下部におけるエネルギー代謝調節機能が損なわれる。Angiotensin2(AT2)は末梢の各組織においてROS産生を亢進し、インスリン抵抗性の誘導にもかかわる。ミトコンドリアはATPを産生する過程でROS産生するが、同時にROSを消去する抗酸化機能も併せ持つ。視床下部におけるエネルギー代謝調節は一部ROSを介することが知られているため、本研究では肥満や糖尿病において視床下部RAAS系の関与とRAAS系抑制による代謝改善効果につき、特に視床下部ミトコンドリアとROS制御に着目して検討を開始した。

2. 研究の目的

現在降圧薬の第一選択薬としてangiotensin converting enzyme (ACE)阻害剤やAT2 receptor blocker (ARB)が推奨されており、すでにAT2によるインスリン抵抗性誘導機構の概要も解明されている。研究代表者は末梢組織においてRAAS系の最終ステップに位置するアルドステロンおよびその受容体MRの活性化がAT1受容体と独立してインスリン抵抗性を誘導することを明らかにし、検討してきた。全身の糖エネルギー代謝は視床下部において統合制御されており、糖尿病においてはこの調節機構が障害されると考えられている。この視床下部での代謝制御の破綻が視床下部におけるreactive oxygen species (ROS)や炎症性サイトカイン発現亢進に関わることが想定される。そこで本研究を始めるに当たり、肥満・糖尿病に関連したrenin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)系の局所的な活性化、および視床下部におけるミトコンドリア機能障害が視床下部におけるこれらの調節不全を誘導し、糖エネルギー代謝調節不全が生じる可能性を想定した。

これらを検討する目的で、様々な糖尿病や肥満モデルマウスの糖エネルギー代謝、視床下部における慢性炎症とこれらに対するMRA投与の影響を検討した。さらにそのメカニズムを検討する目的で、マクログリア培養細胞におけるRAAS系薬剤前処置の影響を検討した。

3. 研究の方法

実験I：メタボリックシンドローム・脂肪性肝炎(NASH)モデルマウスに対するMRAの効果

の検討

肝特異的sterol response element binding protein 1c (SREBP1c)過剰発現マウスに12週間高果糖高脂肪食負荷を行い作製した肥満・インスリン抵抗性、脂肪性肝炎モデルマウスを作製し、同時にMRAを全身投与した治療群と代謝および肝臓の組織像に及ぼす影響を検討した。

実験II：3か月のHFD負荷マウスおよびdb/dbマウスの糖エネルギー代謝の検討

C57BL6マウスに3か月の60% high fat diet (HFD)を負荷し、肥満マウスを作製した。このHFDマウスとdb/dbマウスの代謝表現型および視床下部の解析を行った。

実験III：閉経肥満マウスモデル(卵巣摘出+6週間のHFD負荷)の糖エネルギー代謝の検討

8週齢のC57BL6マウスの卵巣を摘出し、10週齢から6週間のHFDを行い閉経肥満モデルマウスを作製した。本マウスについても代謝表現型および視床下部の解析を行った。本マウスには6週間のHFD負荷後に10日間脳室内持続エストロゲン投与を行い、糖エネルギー代謝の改善効果を検討した。

実験IV：マクログリア培養細胞における検討

マクログリアのモデル細胞としてRAW264.7 macrophageおよびマウス骨髄からmonocyte colony-stimulating factorで分化誘導したマクロファージ(BMDM)を用いて、RAS系抑制による抗炎症効果をin vitroで検討した。

4. 研究成果

NASHモデルマウスに対するMRA投与は肝臓での炎症、線維化、脂肪での炎症、M1マクロファージ浸潤および糖脂質代謝を顕著に改善した。

HFDマウスおよびdb/dbはカロリー摂取量の増加、酸素消費量(VO_2)の減少、耐糖能障害を示した。視床下部の解析ではTNF α 等の炎症性サイトカインの発現亢進およびNF κ Bの活性化を認めた。一方ミトコンドリア生合成に関わるPGC1 α の発現は両マウスで変化を認めなかった。さらにMRAの全身投与は視床下部の炎症性サイトカイン発現を抑制しなかった。高脂肪食マウスに対する抗TNF α 抗体の中枢投与が糖代謝を改善する事が研究期間中に

報告された為、同様の検討は行わなかった。RAS系阻害剤の末梢投与は末梢組織における炎症抑制効果や糖脂質代謝の改善効果が認められたが、中枢性代謝制御機構に対してはその効果が明らかでなかったことから、今後RAS系の阻害剤 (ARB, ACEI, およびMRA) を脳室内投与し代謝に与える影響を検討する必要があると考えられた。

一方、閉経肥満モデルマウスは肥満インスリン抵抗性を認め、カロリー摂取量の増加、VO₂の減少、自活運動量の低下を認めた。本マウスにエストロゲンを投与したところ、体脂肪量が減少し肥満、耐糖能およびインスリン抵抗性が改善した。その結果TNF α 等の炎症性サイトカインも発現が抑制された。

マイクログリア細胞のモデルとして培養マクロファージおよびマウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) を用いて炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。ROS刺激としてのH₂O₂およびROSを消去するNACの前処置はLPS処置による炎症性サイトカイン発現に影響しなかった。また予想外に、ARBの前処置もLPSによる炎症性サイトカイン発現に影響しなかった。一方MRAの前処置はこれを強く抑制したことから、単球系細胞の炎症性サイトカイン産生はARBよりもMRAがより効果的に抑制することが明らかとなった。

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 1 件)

- 1) Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology*. 151: 2040-2049, 2010. (査読あり)
- 2) Wada T, Yonezawa R, Matsumoto N, Morita M, Sawakawa K, Ishii Y, Sasahara M, Tsuneki H, Saito S,

Sasaoka T. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 in press. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Sasaoka T., Miyashita Y., Sasaki M., Tsuneki H., Wada T.: Blockade of mineralocorticoid receptor improves insulin resistance and steatohepatitis in a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) utilizing liver-specific SREBP1c transgenic mice. American Diabetes Association (ADA) 71st Scientific Sessions, 2011, 6, 24-28, San Diego, CA, U.S.A.
- 2) Wada T., Tsuneki H., Sasaoka T.: Blockade of mineralocorticoid receptor ameliorates glucose metabolism and steatohepatitis in a novel mice model of non-alcoholic steatohepatitis. 2011 International Conference of Diabetes and Metabolism, 2011, 11, 10-12, Seoul, Korea.(招待講演)
- 3) 佐々木元大, 和田 努, 宮下佑介, 石井陽子, 笹原正清, 恒枝宏史, 笹岡利安: 新規NASHモデルマウスの作成と、抗アルドステロン薬の治療効果の検討. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011, 5, 19-21, 札幌.
- 4) 米澤理可, 和田 努, 森田真裕子, 恒枝宏史, 笹岡利安, 斎藤 滋: エストロゲンの中枢及び末梢投与が全身のエネルギーマバランス、体脂肪分布と糖・脂質代謝に与える影響. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011, 5, 19-21, 札幌.

- 5) 笹岡利安, 佐々木元大, 恒枝宏史, 和田
努: 特異的SREBP1c過剰発現と脂肪・果糖
負荷による脂肪性肝炎: アルドステロン
阻害薬の効果と創薬. 第12回Pharmaco-
Hematology Symposium, 2011, 6, 17-18,
富山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 努 (WADA TSUTOMU)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
助教
研究者番号: 00419334

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし