

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08469

研究課題名(和文)血管新生因子固有の基礎代謝制御機構の解明に基づく肥満病態改善法の開発

研究課題名(英文) Mechanism of adipose angiogenesis by the cooperative action of angiogenic factors

研究代表者

和田 努 (Wada, Tsutomu)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・講師

研究者番号：00419334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満に伴う内臓脂肪の肥大化進展に重要な血管新生を促進する因子としてPDGFの重要性を報告してきた。本研究ではそのメカニズムとして、肥満に伴い内臓脂肪組織に浸潤するマクロファージがPDGFを産生すること、その機序としてマクロファージの解糖系代謝と高血糖の重要性、並びにその分子機構を明らかにした。さらに、肥満マウスの全身の組織を解析し、肥満に伴い脂肪組織でのみ特徴的に増加する血管因子SDF1を見出した。肥満病態でのSDF1とPDGFによる血管新生制御機構を明らかにすることで、血管新生を介した新たな肥満進展機構が明らかとなった。本知見は新たな肥満病態改善治療の可能性を開く知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内臓脂肪組織の進展は慢性炎症を引き起こし、インスリン抵抗性病態により糖尿病、脂質異常症、高血圧などの様々な疾患の基盤病態を誘導する。脂肪組織の肥大化には、増大した組織を維持する血管新生の進展が不可欠であり、その機序の解明は肥満の抑制による新たな治療法として有用である。本研究では、肥満で脂肪組織に動員されるマクロファージが血管新生因子PDGFを産生することとその分子機構を明らかにした。さらにPDGFによる血管新生を阻害する因子としてSDF1を同定した。肥満の脂肪組織では、SDF1を分解するDPP4の増加によりPDGFによる血管新生が強く誘導され肥満が加速することを、新たな肥満病態として解明した。

研究成果の概要(英文)：We have reported an important role of PDGF as an angiogenic factor that promotes neovascularization in obese adipose tissue. In the current study, we identified infiltrated adipose tissue macrophages as a major source of PDGF-B which facilitates neovascularization in obese adipose tissue. We have elucidated the molecular mechanisms that glycolytic metabolism and hyperglycemia are key factors for the production of PDGF-B in macrophages. In addition, we have identified SDF1 as a novel player of adipose angiogenesis. SDF1 attenuated angiogenic process of PDGF-B, but the SDF1 protein was degraded by an increase of DPP4 in obese adipose tissue, thereby enhancing the angiogenic effect of PDGF-B as a pathophysiology of obesity development. These findings lead new therapeutic possibilities for improvement of obesity.

研究分野：代謝学

キーワード：PDGF VEGF SDF1 血管新生 脂肪組織 肥満

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は、生育後に組織の体積を数倍にまで増大可能な非常に可塑性に富む臓器であり、その肥大化には新たに拡大した組織を維持するための血管新生が不可欠である。内臓脂肪の肥大化は慢性炎症の進展を誘導し、インスリン抵抗性を基盤としたメタボリックシンドローム病態を促進することから、その病態の解明が求められている。研究代表者は肥満に伴い脂肪組織で**血管内皮増殖因子(VEGF-A)**に比べ**血小板由来増殖因子(PDGF-B)**が顕著に増加することを見出した。そこで全身で PDGF 受容体 β を欠損するマウスを作製し、3 か月間の高脂肪食負荷(HFD)を行った。本マウスは対照マウス(FL)に比較し体重増加、脂肪組織の肥大化が抑制され、酸素消費量(VO_2)などの基礎代謝の亢進を認め、糖代謝の悪化から保護された。よって、PDGF シグナルの阻害による脂肪組織の血管新生抑止は、肥満に対して有効な治療となることが示された。その一方で、VEGF-A を過剰発現したマウスでは脂肪組織の低酸素が改善し、肥満病態は改善することが示されている。よって、両血管因子はともに脂肪組織血管新生を促進するが、肥満病態への影響は真逆であると考えられ、その機序の解明が求められている。

肥満マウスにおいて、新生血管の除去ペプチドを投与したマウスでは、内臓脂肪にエネルギーが貯蓄できなくなり、基礎代謝を上昇させることで肥満病態の進展から防御されることが報告されている。さらに皮下脂肪組織での VEGF-A 過剰発現は脂肪細胞のベージュ化を促進し、基礎代謝を上昇させる。このように、脂肪組織の血管新生は、全身の基礎代謝の調節に影響すると考えられるが、PDGF 受容体 β 欠損マウスの基礎代謝が亢進するメカニズムは不明である。さらに元来、内臓脂肪の血管新生は単一の血管新生因子により惹起されるものではなく、実際には様々な血管新生因子が協調的に機能することで進展するが、その機序や血管新生相互での協調的な作用はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

PDGF-B および VEGF-A が肥満に伴う血管新生を促進する機構は不明な点が多い。研究代表者は、肥満に伴い脂肪組織で増加する PDGF-B が血管周囲に接着するペリサイト(PCs)を内皮細胞から脱離させること、その結果 PCs による内皮細胞の増殖抑制作用が消失し、内皮細胞の増殖に伴い血管新生が促進することを明らかにした。一方、VEGF-A による血管新生は、既報で示された他の臓器や癌組織での知見から、内皮細胞の増殖や管腔形成の促進によると推測されるが、脂肪組織での PCs への作用は不明である。そこで、肥満に伴う内臓脂肪組織での血管新生進展機構について、PDGF-B と VEGF-A の作用の違いを検証する。また肥満に伴い内臓脂肪では VEGF-A に比べ PDGF-B は顕著に増加する。その由来と産生機構を解明することで、PDGF-B による血管新生の意義とメカニズムの詳細を検討する。また、PDGF 受容体 β 欠損マウスで基礎代謝が亢進するメカニズムの解明に挑む。さらに、肥満の脂肪組織で変化する血管新生因子を探索し、その脂肪血管への作用、ならびに PDGF-B による血管新生との関連性を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

実験1: 肥満に伴う内臓脂肪血管新生における PDGF-B ならびに VEGF-A 作用の検証

マウスの内臓脂肪の組織培養を確立し、PDGF-B、VEGF-A ならびにその両者の濃度、処置時間を変えて培養脂肪組織に作用させた。そののちに脂肪組織は Whole mount immunostaining

を行い共焦点レーザー顕微鏡でペリサイトと内皮細胞の挙動、血管面積などを定量した。

実験2：肥満に伴い内臓脂肪で増加する PDGF-B 産生細胞の同定とその分子機構の解明

肥満マウスの内臓脂肪組織のフローサイトメトリーにより、PDGF-B の発現が増加する細胞種を探索した。その結果、炎症性の M1 マクロファージでの PDGF-B 発現増加が認められたため、肥満マウスにクロドロン酸リポソームを処置し、マクロファージ除去が内臓脂肪の肥大化と血管新生に及ぼす影響を解析した。

また、マクロファージを培養し、炎症刺激として LPS、高血糖刺激としてグルコース濃度を変えて処置し、マクロファージの細胞内代謝に着目してその PDGF-B 産生に至るシグナル経路を Western blot ならびに real-time PCR にて検討した。細胞内シグナルの同定には、シグナルの阻害剤および siRNA によるノックダウンを用いた。

実験3：PDGF 受容体β欠損マウスの基礎代謝亢進機構の解析

全身 PDGF 受容体β欠損マウス (KO) および対照マウス (FL) に HFD を負荷し、小動物代謝計測システムを用いて経時的に基礎代謝を測定した。また、神経細胞への PDGF 作用を直接検討するために、神経特異的 PDGF 受容体β欠損マウス (nKO) を作製し、基礎代謝への影響を解析した。

実験4：新たな血管新生因子を探索と機能解析

脂肪組織の血管新生は、複数の血管新生因子により制御されていることから、これまで報告のない血管新生因子の関与が想定される。そこで肥満とやせマウスの全身の組織における血管新生因子の発現変化を検討し、脂肪組織で特異的に変動する血管新生因子を探索した結果、血管新生因子 SDF1 を見出した。培養脂肪組織を用い、SDF1 と PDGF-B による PCs ならびに血管新生への相互作用を Whole mount immunostaining により検証した。さらに SDF1 の分解を促進する DPP4 の阻害剤をマウスに投与し、その代謝表現型と内臓脂肪血管新生に及ぼす影響を解析し、生体での SDF1 による肥満に関連した血管新生に及ぼす影響とメカニズムを検討した。

4. 研究成果

成績1：PDGF-B は速やかに脂肪血管からの PCs の脱離を促進した。また、VEGF-A も軽度ではあるが PCs の脱離を促進した。PDGF-B と VEGF-A の共処置は PDGF-B と同程度の PCs 脱離を誘導した。一方、血管新生は PDGF-B と VEGF-A の共処置において最も誘導された。以上から両血管新生因子の協調的な作用が脂肪血管新生に重要であることが示唆された。

成績2：肥満マウスの内臓脂肪を成熟脂肪細胞と間質血管細胞(SVF)に分画し PDGF-B の発現を検討した結果、SVF での発現上昇が認められた。そこでフローサイトメトリーにより SVF をマクロファージ、その他の白血球、非白血球細胞 (内皮、PCs, 脂肪幹細胞など) に分画して検討した結果、PDGF-B は炎症性の M1 マクロファージにおいて高発現することが明らかになった。肥満マウスに、マクロファージ選択的除去薬であるクロドロン酸リポソームを 2 週間、および 6 週間投与し検討した結果、内臓脂肪マクロファージの減少に伴い内臓脂肪 PDGF-B の発現は低下し、脂肪血管からの PCs の脱離は抑制された。さらに 6 週間投与では内臓脂肪の血管面積の低下に伴い、内臓脂肪および体重の減少を認めた。マクロファージでの PDGF-B 発現誘導機構を、シグナル阻害剤および siRNA を用いて検討した。炎症性サイトカ

インは mTOR, NFkB を介して産生されるのに対し、PDGF-B は肥満に伴う高血糖と慢性炎症に付随する Erk の活性化がマクロファージの解糖系代謝経路と強調して強く誘導されることを明らかにした。以上の研究成果は論文として発表している (Sci Rep 20;10(1):670, 2020, doi: 10.1038/s41598-019-57368-w.)

成績3: 基礎代謝の検討において、KO マウスは通常食で飼育した 9-10 週齢の時点では対照マウスと差異を認めなかった。しかし HFD 負荷 3 - 4 週後には、対照マウスと比べて有意な基礎代謝の上昇を認めたことから、PDGF シグナルの阻害は肥満に対して早期から基礎代謝の亢進を誘導し、肥満病態に対して防御的に機能すると考えられた。PDGF-B が神経細胞に作用して基礎代謝を高める可能性を、nKO を用いて検討した。しかし本マウスは HFD 負荷 12 週後まで体重に影響せず、基礎代謝にも変化を示さなかった。現在、PDGF 受容体β欠損による基礎代謝への影響の詳細を検討中である。

成績4: 肥満マウスの全身の組織を解析し、肥満に伴い脂肪組織でのみ特徴的に増加する血管新生因子SDF1を見出した。興味深いことに、SDF1は単独ではPCsを血管から脱離させるが、PDGF-B存在下ではPDGF-BによるPCs脱離に起因する血管新生を抑制した。その機序として、SDF1はPCsのCXCR4受容体を介してPDGFRβの発現を減少させることで、肥満に伴い脂肪組織に浸潤したM1マクロファージが放出するPDGF-Bに誘導されるPCsの血管からの脱離を軽減することが明らかになった。肥満病態において、脂肪組織ではSDF1を分解するDPP4が増加する。よって肥満脂肪組織ではPDGF-Bのブレーキとして作用するSDF1が分解され減少する結果、PDGF-Bによる血管新生が強く誘導される。本機構は、脂肪組織の肥大化が加速する新たな肥満病態進展機構と考えられ、研究成果を論文として発表した (Angiogenesis 23(4):667-684, 2020, doi: 10.1007/s10456-020-09738-6)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe Eri, Wada Tsutomu, Okekawa Akira, Kitamura Fuka, Komatsu Go, Onogi Yasuhiro, Yamamoto Seiji, Sasahara Masakiyo, Kitada Munehiro, Koya Daisuke, Tsuneki Hiroshi, Sasaoka Toshiyasu	4. 巻 23
2. 論文標題 Stromal cell-derived factor 1 (SDF1) attenuates platelet-derived growth factor-B (PDGF-B)-induced vascular remodeling for adipose tissue expansion in obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angiogenesis	6. 最初と最後の頁 667 ~ 684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10456-020-09738-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Akari, Wada Tsutomu, Nishimura Sanshiro, Ito Tetsuo, Okekawa Akira, Onogi Yasuhiro, Watanabe Eri, Sameshima Azusa, Tanaka Tomoko, Tsuneki Hiroshi, Saito Shigeru, Sasaoka Toshiyasu	4. 巻 15
2. 論文標題 Estrogen regulates sex-specific localization of regulatory T cells in adipose tissue of obese female mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0230885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0230885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onogi Yasuhiro, Wada Tsutomu, Okekawa Akira, Matsuzawa Takatoshi, Watanabe Eri, Ikeda Keisuke, Nakano Minoru, Kitada Munehiro, Koya Daisuke, Tsuneki Hiroshi, Sasaoka Toshiyasu	4. 巻 10
2. 論文標題 Pro-inflammatory macrophages coupled with glycolysis remodel adipose vasculature by producing platelet-derived growth factor-B in obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-57368-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wada Tsutomu, Tsuneki Hiroshi, Sasaoka Toshiyasu	4. 巻 139
2. 論文標題 Role of Angiogenesis and Chronic Inflammation in Fat Hypertrophy in NASH Pathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00011-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 渡邊愛理、和田 努、桶川 晃、北村楓花、小野木康弘、宮澤佑一郎、恒枝宏史、笹岡利安
2. 発表標題 SDF1による脂肪組織血管新生に関わる細胞間クロストークの制御機構の解明
3. 学会等名 第63 回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桶川 晃、和田 努、小野木 康弘、稲田 健人、渡邊 愛理、小松 剛、北村 楓花、恒枝 宏史、笹岡 利安
2. 発表標題 肥満病態における視床下部PDGFシグナルが中枢性エネルギー代謝調節機構に与える影響の解析
3. 学会等名 第63 回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹岡利安、恒枝宏史、和田努
2. 発表標題 炎症細胞による脂肪組織リモデリング
3. 学会等名 第64 回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桶川 晃、和田 努、北村 楓花、小野木 康弘、渡邊 愛理、富田 淳也、恒枝 宏史、笹岡 利安
2. 発表標題 ペリサイトPDGFシグナルを介した視床下部慢性炎症とエネルギー代謝制御機構
3. 学会等名 第64 回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wada T, Onogi Y, Okekawa A, Matsuzawa T, Watanabe E, Komatsu G, Tsuneki H, Sasaoka T.
2. 発表標題 Intracellular metabolism-dependent PDGE-B induction in inflammatory macrophages contributes to adipose tissue expansion with obesity.
3. 学会等名 American Diabetes Association (ADA) 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桶川晃, 和田努, 小野木康弘, 松澤崇俊, 渡邊愛理, 小松剛, 恒枝宏史, 笹岡利安
2. 発表標題 肥満病態におけるマクロファージ細胞内代謝プログラム変化依存的なPdgbf発現誘導機構の解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊愛理, 和田努, 小野木康弘, 恒枝宏史, 笹岡利安
2. 発表標題 肥満病態におけるペリサイトの動的変化に対するSDF1シグナルの意義
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桶川晃, 和田 努, 小野木康弘, 稲田健人, 渡邊愛理, 小松剛, 北村楓花, 恒枝宏史, 笹岡利安
2. 発表標題 肥満病態における中枢性エネルギー代謝調節へのPDGFシグナルの関与
3. 学会等名 第19回日本内分泌学会北陸支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutomu Wada, Yasuhiro Onongi, Eri Watanabe, Takatoshi Matsuzawa, Akira Okekawa, Hiroshi Tsuneki, Toshiyasu Sasaoka.
2. 発表標題 A novel mechanism of adipose-tissue angiogenesis via PDGF-B signaling in fat tissue expansion during obesity.
3. 学会等名 2018 BK21 Plus International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyasu Sasaoka, Yasuhiro Onogi, Hiroshi Tsuneki, Tsutomu Wada.
2. 発表標題 Pro-inflammatory macrophages promote vascular remodeling via PDGF-B signaling in white adipose tissue during obesity.
3. 学会等名 Daegu Symposium on Obesity & Diabetes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Onogi, Tsutomu Wada, Hiroshi Tsuneki, Toshiyasu Sasaoka.
2. 発表標題 Pro-inflammatory macrophages promote vascular remodeling in white adipose tissue during diet-induced obesity.
3. 学会等名 The 17th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Watanabe, Tsutomu Wada, Yasuhiro Onogi, Hiroshi Tsuneki, Toshiyasu Sasaoka.
2. 発表標題 Impact of SDF1/CXCR4 signaling on pericyte mobilization during obesity development.
3. 学会等名 The 17th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutomu Wada, Eri Watanabe, Yuri Kotera, Yasuhiro Onogi, Hiroshi Tsuneki, Toshiyasu Sasaoka.
2. 発表標題 The Sdf1-Cxcr4 signals regulate adipose tissue expansion by modulating angiogenesis in diet-induced obesity in mice.
3. 学会等名 American Diabetes Association, 78th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Onogi, Tsutomu Wada, Takatoshi Matsuzawa, Akira Okekawa, Eri Watanabe, Hiroshi Tsuneki, Toshiyasu Sasaoka.
2. 発表標題 Glycolytic activation promotes PDGF-B production in adipose tissue macrophages during obesity development.
3. 学会等名 American Diabetes Association, 78th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊愛理、和田 努、小野木康弘、長谷川颯、松澤崇俊、桶川 晃、高田慎治郎、恒枝宏史、笹岡利安
2. 発表標題 SDF1によるペリサイトの制御を介した内臓脂肪肥大化機構
3. 学会等名 第30回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊愛理、和田 努、小野木康弘、恒枝宏史、笹岡利安
2. 発表標題 内臓脂肪におけるペリサイトの挙動を介した血管新生制御機構の意義
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊愛理、和田 努、小野木康弘、恒枝宏史、笹岡利安
2. 発表標題 肥満病態におけるペリサイトの動的変化に対するSDF1シグナルの意義
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桶川 晃、和田 努、小野木康弘、松澤崇俊、渡邊愛理、小松 剛、恒枝宏史、笹岡利安
2. 発表標題 肥満病態におけるマクロファージ細胞内代謝プログラム変化依存的なPdgb発現誘導機構の解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutomu Wada, Yasuhiro Onogi, Akira Okekawa, Takatoshi Matsuzawa, Eri Watanabe, Go Komatsu, Hiroshi Tsuneki, Toshiyasu Sasaoka.
2. 発表標題 Intracellular metabolism-dependent PDGFB induction in inflammatory macrophages contributes adipose tissue expansion with obesity.
3. 学会等名 American Diabetes Association, 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	笹岡 利安 (Sasaoka Toshiyasu) (00272906)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------