

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591148

研究課題名(和文)

メタボリック症候群にともなう血栓症発症の分子病態の解明とその制御

研究課題名(英文)

Elucidation of molecular pathogenesis and control of thrombosis in metabolic syndrome

研究代表者

山本 晃士(YAMAMOTO KOJI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90362251

研究成果の概要(和文)：メタボリック症候群のモデルと考えられる肥満マウスにおいては、血栓溶解阻害因子である PAI-1 や凝固反応開始因子である TF の遺伝子発現が亢進しており、特にそれは脂肪細胞が大型化した脂肪組織において顕著であった。また心因性ストレスの負荷により、肥満マウスでは著明な PAI-1 および TF 発現増加をきたした。以上より、メタボリック症候群では血液凝固系のバランスが崩れていて血栓形成促進状態にあると考えられ、その血栓傾向はストレスにより助長されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dramatic induction both of PAI-1, a principal regulator of fibrinolytic system, and TF, an initiator of coagulation, was observed in obese mouse, especially in their adipose tissues, which consist of large adipocytes. When obese mice encounter mental stress, they produce more amounts of PAI-1 and TF. These observations suggest that prothrombotic state progresses in metabolic syndrome, especially in stressful conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血栓症、高血圧、肥満、糖尿病、ストレス、脂肪細胞、サイトカイン、線溶

## 1. 研究開始当初の背景

いまや国民病として位置づけられるメタボリック症候群は、肥満、高脂血症、糖尿病、高血圧などを内包する複雑な病態であるが、予備群も含めると罹患者は増加の一途をたどっており、その予防および治療はきわめて重要な課題である。特に終末像としての血栓症の発症メカニズムは解明されておらず、それを予知するための臨床検査も確立していない。メタボリック症候群の発症に重要な役割を演じるのは代謝異常にともなって肥大化する大

型脂肪細胞と考えられるが、脂肪細胞が多くの生理活性物質を産生、分泌することが明らかとされ、それらはアディポサイトカインとして総称されるようになった。その中でも肥満や糖尿病などの進展にともなって発現が増加することが報告されている血栓溶解阻害因子 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) および凝固反応開始因子 tissue factor (TF) が注目されている。一方、高度情報社会としての構造基盤が形づくられるとともに心因性ストレスが重篤な血栓症の誘因となっていると想

像され、特にストレス応答性を有する血液凝固線溶因子の発現変化が、微小血栓形成から臓器レベルでの血栓症発症にまで強くかかわっている可能性が指摘されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、肥満・糖尿病などメタボリック症候群のモデルマウスを用いて、ストレス応答性に発現が変化する向血栓性遺伝子 PAI-1 と TF の *in vivo* 発現動態を解析することにより、メタボリック症候群における血栓傾向、および心因性ストレスに起因する血栓症の発症メカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、メタボリック症候群個体における PAI-1 遺伝子の発現制御により血栓傾向の改善が図れるかどうか検討し、血栓症発症の予防および治療法の確立に寄与することも目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) メタボリック症候群のモデルマウスとして、レプチン欠損により先天的に肥満を呈してくる肥満マウス (ob/ob mouse) を用いる。肥満マウスの血中や脂肪組織を始めとした主要臓器において、向血栓性因子としてきわめて重要な PAI-1 および TF の遺伝子発現を解析し、肥満や糖尿病の進行にともなって血栓傾向がどう変化するか検討した。具体的には、異なる週齢 (4 週、12 週、24 週) の肥満マウスから血漿を採取して活性型 PAI-1 の抗原量を ELISA 法にて測定し、血栓溶解能を評価した。また、脂肪組織およびその他の主要臓器を摘出して RNA を抽出した後、定量的 competitive RT-PCR 法ならびに real time RT-PCR 法を用いて PAI-1 および TF の mRNA 発現量を定量するとともに、*in situ* hybridization 法により PAI-1 および TF mRNA の組織内・細胞内局在を検索し、その組織・細胞特異的な発現様式について検討した。以上の解析を通じ、肥満および糖尿病個体において向血栓性因子 PAI-1 の発現増強が認められるか、特に脂肪組織や脂肪細胞における発現はどうか、それらの発現異常が実際の血栓形成に関与しているか、などについて検討した。

(2) メタボリック症候群モデルマウス (肥満マウス) に対し、強度な心因性ストレスと考えられる拘束ストレス (50 ml 用のプラスチックチューブ内に閉じ込めて拘束し、飲水

のみ可とする) を 2 時間から 20 時間程度負荷した後に血液および主要臓器を採取し、向血栓性因子 PAI-1 の血中濃度および mRNA 発現がどう変化するか検討した。また、臓器の一部をホルマリン固定した後に組織切片を作製し、PAS 染色および抗マウス・フィブリン抗体を用いた免疫組織化学法により、組織内の微小血栓形成を検索し、PAI-1 の発現変化が実際の血栓形成に関与するかどうかについて検討した。以上より、メタボリック症候群個体において心因性ストレスにより血栓形成が誘導されるかどうか、またその場合の組織特異性はどのようなものであるか検討した。

(3) インスリン抵抗性の程度と血栓形成傾向 (PAI-1 発現亢進) との関連性を検討するため、異なる週齢 (4 週、12 週、24 週) の肥満マウスにおけるインスリン負荷後の血中グルコース値を測定するとともに、脂肪組織を採取後に脂肪細胞分画を分離し、RNA を抽出して glucose transporter gene である Glut-1, Glut-2, Glut-4 等の mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR 法により解析した。また、インスリン抵抗性と密接に関連する TNF- $\alpha$  の産生にも着目し、肥満マウスにおけるその発現レベルとインスリン抵抗性との関係を検討した。さらに、これらのマウスに対して抗 TNF- $\alpha$  抗体を投与した後に PAI-1 の発現レベルを定量的 RT-PCR 法および Western blot 法にて解析し、メタボリック症候群個体での血栓形成傾向に対する TNF- $\alpha$  の直接的関与について考察した。一方、肥満マウスの脂肪細胞において *in vitro* あるいは *in vivo* でインスリン刺激を与えた後に、PAI-1 の遺伝子発現がどう変化するかを定量的 RT-PCR 法、*in situ* hybridization 法によって経時的に解析し、インスリン不応状態における向血栓性因子の発現様式について検討した。

## 4. 研究成果

(1) メタボリック症候群モデルマウスにおける PAI-1 および TF の発現

肥満マウスの血液および組織における PAI-1 の発現を検討した結果、8 週齢の肥満マウスでは対照マウスと比較して血漿中の活性型 PAI-1 抗原値は約 4 倍と高値であり、心臓、肺、肝臓、筋肉などの各組織においても 1.5 ~ 2 倍と有意な PAI-1 mRNA の発現増加を認めた。ここで特記すべきは、肥満マウスの内

臓脂肪、皮下脂肪、精巣上体周囲の脂肪など、いずれの脂肪組織においても単位 RNA 当たりの PAI-1 mRNA 発現量が対照マウスの4-5倍と、他の組織に比べて顕著な発現増加をきたしていた点である。さらに脂肪組織における PAI-1 mRNA 発現量は、対照マウスでは週齢を重ねても変化はなかったが、肥満マウスにおいては12週齢のもので4週齢の2倍以上に増加していた。週齢の進んだ肥満マウスではより大型の脂肪細胞で構成された脂肪組織の沈着が進んでいると考えられ、PAI-1 の産生・分泌が非常に亢進していると思われる。また、この PAI-1 mRNA の発現は大型脂肪細胞においてだけでなく、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞においても著明に増強していることが明らかとなった。

一方、肥満マウスでは外因系凝固の起始因子である TF の発現も亢進していた。脂肪組織における TF mRNA 発現は、12週齢の肥満マウスで対照マウスの3-7倍、24週齢では20倍以上に亢進していた。この TF mRNA 発現増加も脂肪細胞自体によることがわかったが、脂肪組織内の血管を構成する細胞（血管外膜細胞）においても TF mRNA 発現の増強が認められた。肥満マウスにおける TF mRNA の発現増加は脂肪組織以外の主要臓器でも顕著であり、臓器特異的な実質細胞において認められた。12週齢の肥満マウスでは、脳（神経細胞）、肺（気管支上皮細胞）、心臓（心筋細胞）、腎臓（尿細管上皮細胞）、肝臓（Kupffer細胞）などにおいても対照マウスの2-4倍の TF mRNA 発現を認めている。PAI-1 に加え、肥満個体におけるこのような TF の発現増加が、全身的な凝固亢進状態を増幅しているであろうと推測された。

肥満マウスにおいては、インスリン抵抗性および脂肪組織における PAI-1 や TF の発現亢進を招来する tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の血中濃度および脂肪組織での発現増加が認められた。さらに脂肪組織における PAI-1 の発現増強という点で TNF- $\alpha$  より強力な作用をもつ transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の発現も、肥満マウス脂肪組織においては顕著に増加していた。また、この TGF- $\beta$  mRNA の発現増加は脂肪細胞自体によることも明らかとなり、脂肪細胞（脂肪組織）がサイトカインをはじめとした種々の生理活性物質をパラクライン的に産生、分泌していることが裏付けられた。これらの観察結果より、糖尿病、イ

ンスリン抵抗性、血栓傾向、動脈硬化など肥満に関連した病態の進展にとって TGF- $\beta$  のメディエーターとしての役割は非常に重要であると考えられる。

(2) メタボリック症候群モデルマウスに対する心因性ストレス負荷時の PAI-1 発現と血栓形成

8週齢オスの肥満マウスおよび対照マウス (ob/? mouse) を 50ml 用チューブ内に一定時間閉じ込めて拘束ストレスを負荷した後、血漿中の総 PAI-1 抗原量および組織 RNA 中の PAI-1 mRNA 発現量を測定した。また *in situ* hybridization 法にて組織内 PAI-1 mRNA 発現の局在について検討した。さらに病理組織学的な検索により、ストレス負荷後の腎糸球体におけるフィブリン沈着について検討した。その結果、肥満マウスではストレス負荷2時間後および20時間後に著明な血中 PAI-1 抗原量の上昇と組織内 PAI-1 mRNA の発現増加を認めた。特に、脂肪組織や心臓、腎臓における PAI-1 mRNA 発現は、対照マウスに比べて顕著に増加していた。*In situ* hybridization 法による解析の結果、この PAI-1 mRNA 発現は腎糸球体の内皮やメサングウム細胞、心筋内微小血管内皮細胞、脂肪細胞等に一致して認められることがわかった。一方、拘束ストレス負荷20時間後の TF 遺伝子発現は、肥満マウスの腎臓、小腸、脂肪組織などにおいて対照マウスに比し有意に増加していた。ストレス負荷後の肥満マウスでは腎糸球体微小血管内にフィブリン沈着を認めたが、対照マウスでは認めなかった。

以上より、肥満およびインスリン抵抗性を有する個体では、ストレス負荷によって PAI-1 遺伝子発現が著明に亢進し、これが組織における微小血栓形成のひとつの原因になると考えられた。

(3) メタボリック症候群モデルマウスにおけるインスリン抵抗性と PAI-1 発現亢進との関連性

肥満マウスおよび対照マウスそれぞれから内臓脂肪組織を取り出して培養し、培養液にインスリンを添加して脂肪細胞が産生する PAI-1 発現がどう変化するか、ELISA 法および real time RT-PCR 法によって定量的解析を行った。インスリン刺激4時間後において、肥満マウス由来の脂肪細胞では対照マウス

由来のそれに比して、有意に高いレベルの PAI-1 mRNA を発現していた。この結果より、インスリン抵抗性を獲得していると考えられる肥満個体での脂肪組織では、インスリン刺激によってさらなる PAI-1 発現亢進をきたすことが確認され、耐糖能の低下が進んでインスリン分泌過剰状態が続くと、脂肪由来の PAI-1 発現も増加を続け、結果として血栓傾向が増大する可能性が示唆された。また、これらの培養脂肪細胞にインスリンに加えて抗 TNF- $\alpha$ 抗体を与えると、前述のインスリン刺激による PAI-1 発現亢進の程度が 50%ほど抑制された。したがって、インスリンによる脂肪組織での PAI-1 発現亢進には、内因性メディエーターとして TNF- $\alpha$ が強く関与していると考えられた。

#### 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 7 件)

- ①Ogawa H, Fujimoto Y, Yamamoto K, Hata T, Nagai S, Kamei H, Arikawa T, Nakamura T, Kiuchi T. Donor screening algorithm for exclusion of thrombophilia during evaluation of living donor liver transplantation. **Clinical Transplantation**, 2011 (印刷中) (査読有)
- ②Kikuchi R, Takeshita K, Kondo M, Uchida Y, Cheng XW, Nakayama T, Yamamoto K, Matsushita T, Liao J, Murohara T. Pitavastatin-induced angiogenesis and arteriogenesis is mediated by Notch1 in a murine hindlimb ischemia model without induction of VEGF. **Laboratory Investigation**, 2011 (印刷中) (査読有)
- ③Okada H, Kunishima S, Hamaguchi M, Takagi A, Yamamoto K, Takamatsu J, Matsushita T, Saito H, Kojima T, Yamazaki T. A novel splice site mutation in intron C of PROS1 leads to markedly reduced mutant mRNA level, absence of thrombin-sensitive region, and impaired secretion and cofactor activity of mutant protein S. **Thrombosis Research** 125:e246-e250, 2010. (査読有)
- ④Nakao N, Nakayama T, Yahata T, Muguruma Y, Saito S, Miyata Y, Yamamoto K, Naoe T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis *in vitro* and *in vivo*: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **American Journal of Pathology** 177:547-554, 2010. (査読有)

- ⑤Miyawaki Y, Suzuki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Suzuki N, Katsumi A, Naoe T, Yamamoto K, Matsushita T, Takamatsu J, Kojima T. Severe hemophilia A in a Japanese female caused by an F8-intron 22 inversion associated with skewed X chromosome inactivation. **International Journal of Hematology** 92:405-408, 2010. (査読有)
- ⑥山本晃士. PAI-1 の臨床的意義. 日本医事新報 4488:81-83, 2010. (査読無)
- ⑦山本晃士. メタボリックシンドロームと血栓症. 最新医学「血栓症」65:1130-1136, 2010. (査読無)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 晃士 (YAMAMOTO KOJI)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：9 0 3 6 2 2 5 1

##### (2) 研究分担者

小嶋 哲人 (KOJIMA TETSUHITO)  
名古屋大学・医学部・教授  
研究者番号：4 0 1 6 1 1 9 3

##### (3) 連携研究者

なし