

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：24201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19731

研究課題名（和文）脂肪細胞による内皮間葉転換誘導機構の解明と予防改善方法の確立

研究課題名（英文）Study of the endothelial-mesenchymal transition induced by adipocytes and establishment of prevention

研究代表者

安澤 俊紀 (Yasuzawa, Toshinori)

滋賀県立大学・人間文化学部・講師

研究者番号：80734425

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肥満や糖尿病などの生活習慣病では動脈硬化の進展が問題となっている。動脈硬化進展には内皮間葉転換（EndMT）が関与しているが肥満によるEndMT誘導の詳細なメカニズムは不明である。本研究では、動脈硬化や組織線維化の病態進展に対して脂肪細胞の肥大化がEndMTを引き起こすことを明らかにした。また、糖尿病マウスの腎系球体においてEndMTの進展が確認されたが、エイコサペンタエン酸（EPA）の投与によりEndMTが抑制され腎臓病病態進展を制御することを明らかにした。さらに奈良県の特産品である柿の葉後発酵茶抽出物がEndMTを抑制し病態進展を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣の変化による肥満の増加や肥満に伴う代謝異常、動脈硬化などの増加は国内外で問題となっている。内皮間葉転換（EndMT）は動脈硬化や組織線維化の一因と考えられている。肥満に伴うEndMTの制御は動脈硬化や組織線維化などの病態進展を抑制することにつながると考えられる。本研究では、肥満に伴い肥大化する脂肪細胞に着目しEndMT誘導機構の解明と食品由来成分によるEndMT制御の可能性を明らかにした。これは食事による病態進展制御の可能性を示すもので社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In lifestyle-related diseases such as obesity and diabetes, the progression of arteriosclerosis is a significant concern. Endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) is implicated in the advancement of arteriosclerosis, but the mechanisms by which obesity induces EndMT remain unclear. This study revealed that adipocyte hypertrophy promoted EndMT, contributing to the pathogenesis of arteriosclerosis and tissue fibrosis. Additionally, the progression of EndMT was observed in the glomeruli of diabetic mice, and the administration of eicosapentaenoic acid (EPA) suppressed EndMT, thereby controlling the progression of renal disease pathology. Furthermore, extracts from post-fermented tea leaves of persimmon, a specialty of Nara Prefecture, showed potential in suppressing EndMT and controlling disease progression.

研究分野：栄養学

キーワード：内皮間葉転換 血管内皮細胞 脂肪細胞 線維化 肥満 食品機能 栄養学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は全身の恒常性維持に非常に重要な役割を担っており、内皮細胞の障害は種々の疾患と関連している。血管内皮細胞機能の障害の一つに内皮間葉転換 (Endothelial to Mesenchymal Transition: EndMT) が挙げられる。EndMT は動脈硬化や肝線維化、糖尿病性腎臓病における腎線維化などの進行に関与していると考えられている。血管内皮細胞に TGF- β や酸化ストレスなどの刺激が加わると接着因子である CD31、VE-cadherin などに代表される血管内皮細胞マーカーの発現が減少し、 α -smooth muscle actin (α -SMA) や smooth muscle 22 α (SM22 α) に代表される間葉系細胞マーカーの発現が増加する。動脈硬化病変や糖尿病マウスの腎線維化病変部位の線維芽細胞の供給源として EndMT の関与が示されている。また、肥満は動脈硬化や糖尿病のリスク因子である。肥満に伴う脂肪細胞の肥大化はアディポサイトカインなどの分泌を介して動脈硬化の病態進展に関わっている。しかしながら、脂肪細胞の肥大化と EndMT との関連は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞と血管内皮細胞の関係を EndMT に着目して検討した。さらに EPA や奈良県の特産品である柿の葉後発酵茶葉抽出物などの食品由来成分の抗 EndMT 効果を検討することで動脈硬化や組織線維化に関連する疾患の予防・改善を目指した。投薬に頼らない食事による疾患の予防・改善の基礎を探索した。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞による血管内皮細胞の EndMT の誘導に検討

マウス由来微小血管内皮細胞である bEnd3 および、マウス由来線維芽細胞である 3T3-L1 を使用した。3T3-L1 細胞を分化誘導培地にて脂肪細胞へと分化誘導した。分化誘導 4 日目、8 日目の脂肪細胞培養液上清を回収し、血管内皮細胞への刺激に用いた。脂肪細胞の肥大化の程度は Oil red O 染色により確認した。分化誘導後の脂肪細胞および脂肪細胞培養液上清中の TGF- β 発現量を測定した。脂肪細胞培養液で刺激した際の血管内皮細胞の遊走能をセルカルチャーインサートをを用いた二槽培養法により評価した。血管内皮細胞の CD31、SM22 α 、Snail 発現などを解析することで EndMT の程度を評価した。また、炎症や酸化ストレスに関連するマーカーについても解析を行った。

(2) 培養血管内皮細胞を用いた食品由来成分の抗 EndMT 効果の検討

脂肪細胞培養液により誘導された EndMT に対してエイコサペンタエン酸 (EPA) の抗 EndMT 効果を評価した。また、奈良県の特産品である柿の葉後発酵茶抽出物の抗 EndMT 効果を評価するため、高グルコース培地 (25 mM) で血管内皮細胞を培養し柿の葉後発酵茶抽出物を添加の有無で EndMT に及ぼす影響を検討した。

(3) 糖尿病マウスの腎系球体における EPA による EndMT 抑制作用

8 週齢雄性 C57BL/6N マウスを使用した。3 週間の予備飼育後、11 週齢時に STZ 群に STZ 投与を行った。control には STZ 群と同様の方法でクエン酸ナトリウム Buffer を投与した。また、11 週齢時より STZ 群に高脂肪食飼料 (High fat diet: HF) の投与を開始した。予備飼育期間および control 群の実験飼育期間には MF 固形飼料を摂取させた。13 週齢時より、HF STZ 投与群を HF STZ 群、EPA を投与する HF STZ + EPA 群にわけ、19 週間飼育を行った。EPA はエイコサペンタエン酸エチルを 1000 mg/kg BW/day となるように投与した。飼育期間中、飼料と飲料水は自由摂取とした。マウスは室温 22 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 10%、午前 7 時から午後 7 時を明期とする 12 時間の明暗サイクルで飼育した。腎臓での EndMT を評価するため、免疫組織化学染色による CD31 陽性細胞数の計測を行った。線維化の指標である α SMA、Col4 や内皮細胞障害の指標となる PKC β 発現、過酸化脂質 (MDA) などを測定した。酸化ストレスの指標として腎臓中の Nox2、Nox4、p47^{phox} mRNA 発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞による血管内皮細胞の EndMT の誘導に検討

脂肪細胞の肥大化と油滴蓄積を評価するために Oil red O 染色を行った。顕微鏡にて観察後、イソプロパノールにて、色素の抽出を行い、波長 492 nm で吸光度を測定した。分化 0 日目で 0.27 \pm 0.00、分化 4 日目で 0.44 \pm 0.06、分化 8 日目で 0.62 \pm 0.03 であった。分化 0 日目と比較して、脂肪細胞の分化が進むにつれ、油滴蓄積量は有意に増加した。脂肪細胞培養液上清で血管内皮細胞を 48 時間刺激後の、血管内皮細胞の増殖能を評価するために WST-1 assay を行った。control で 1.39 \pm 0.10、分化 4 日目の脂肪細胞培養液上清で刺激した場合で 1.35 \pm 0.05、分化 8 日目の脂肪細胞培養液上清で刺激した場合で 1.40 \pm 0.04 であった。血管内皮細胞の増殖能において、各群間に有意な差はみられなかった。EndMT が生じると、血管内皮細胞は接着性を失い、高い運動性

を獲得することで、遊走能が上昇することが知られている。脂肪細胞培養液が血管内皮細胞の遊走能に及ぼす影響を評価するために二槽培養法を行った。遊走細胞数は、controlで 22.4 ± 2.1 、分化4日目の脂肪細胞培養液上清で刺激した場合で 37.6 ± 3.7 、分化8日目の脂肪細胞培養液上清で刺激した場合で 55.0 ± 2.7 であった。controlと比較して、分化4日目、分化8日目の培養液で刺激することで、遊走細胞数が有意に増加した ($p < 0.01$)。また、分化4日目と比較して、分化8日目の培養液で培養することで、遊走細胞数が有意に増加した ($p < 0.01$)。

脂肪細胞培養液が血管内皮細胞のEndMTに及ぼす影響を評価するために、CD31、SM22、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) のタンパク質発現量を検討した。CD31発現量は、controlを1としたとき分化4日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 0.64 ± 0.03 、分化8日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 0.36 ± 0.09 であった。controlと比較して、分化4日目、分化8日目の脂肪細胞培養液で培養した血管内皮細胞でCD31発現量が有意に減少した ($p < 0.01$)。また、分化4日目と比較して、分化8日目の脂肪細胞培養液で刺激した血管内皮細胞でCD31発現量が有意に減少した ($p < 0.01$)。SM22発現量は、controlを1としたとき分化4日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 1.04 ± 0.25 、分化8日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 1.37 ± 0.12 であった。controlと比較して、分化8日目の脂肪細胞培養液で刺激した血管内皮細胞でSM22発現量が有意に増加した ($p < 0.05$)。PAI-1発現量は、controlを1としたとき分化4日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 1.50 ± 0.19 、分化8日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 1.82 ± 0.26 であった。controlと比較して、分化8日目の脂肪細胞培養液で刺激した血管内皮細胞でPAI-1発現量が有意に増加した ($p < 0.01$)。

EndMTはMAPK経路を介して誘導されることから、ウェスタンブロッティングにてリン酸化Erk1/2および転写因子であるSnail発現量を検討した。リン酸化Erk1/2発現量は、controlを1としたとき分化4日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 3.30 ± 1.02 、分化8日目の脂肪細胞培養液で培養した場合で 5.74 ± 1.56 であった。controlと比較して、分化4日目、8日目の脂肪細胞培養液で刺激した血管内皮細胞でリン酸化Erk1/2発現量が有意に増加した ($p < 0.05, p < 0.01$)。Snail発現量は、controlを1としたとき分化4日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 1.07 ± 0.13 、分化8日目の脂肪細胞培養液で刺激した場合で 2.66 ± 0.27 であった。controlと比較して、分化8日目の脂肪細胞培養液で刺激した血管内皮細胞でSnail発現量が有意に増加した ($p < 0.01$)。

脂肪細胞の培養液中のTGF- β タンパク質発現量は、controlを1としたとき、分化4日目の脂肪細胞培養液で 2.31 ± 0.90 、分化8日目の脂肪細胞培養液で 6.71 ± 3.4 であった。controlと比較して、分化8日目で培養液中のTGF- β タンパク質発現量が有意に増加した ($p < 0.05$)。

脂肪細胞肥大化によって引き起こされるEndMTの原因としてTGF- β の増加が考えられたため、脂肪細胞培養液上清にTGF- β 受容体の阻害剤を添加し、CD31発現量を測定したところcontrolと比較して有意な変化は認められなかった。一方で、脂肪細胞培養液で刺激された血管内皮細胞ではPKCの増加やNox2、Nox4、TNF- α 発現の増加と内因性抗酸化システムに関連しているNrf2発現の低下、SOD活性の低下が認められた。これらのことから、脂肪細胞肥大化によって引き起こされるEndMTはTGF- β の作用のみではなく、酸化ストレスの増大や炎症誘発がEndMTを引き起こしたと考えられた。これには脂肪細胞からの脂肪酸分泌や炎症性サイトカインの増大などが考えられる。また、これら脂肪細胞肥大化によって引き起こされたEndMTはEPAの添加によって抑制されたこと。

(2) 培養血管内皮細胞を用いた食品由来成分の抗EndMT効果の検討

奈良県の特産品である柿の葉後発酵茶抽出物の抗EndMT効果を検討するため、血管内皮細胞を高グルコース培地 (25 mM グルコース) で培養しEndMTを誘発した。高グルコース培地で培養した内皮細胞の細胞遊走能は増加したが、柿の葉後発酵茶抽出物の添加により遊走細胞数の減少が認められた。さらに、高グルコース培地ではCD31発現の減少とSM22発現の増加が認められたが、柿の葉後発酵茶抽出物の添加により改善が認められた。また、EPA添加においても高グルコース培地によって増加した細胞遊走能やSM22の発現増加が抑制された。このことから、高血糖状態により引き起こされるEndMTに対して柿の葉後発酵茶抽出物やEPAは抗EndMT効果を有することが示唆された。

(3) 糖尿病マウスの腎系球体におけるEPAによるEndMT抑制作用

糖尿病マウスの腎系球体においてCD31陽性細胞数の減少が認められた。線維化の指標であるSMA、Col4発現の増加も認められた。一方で、EPA投与によりCD31陽性細胞数の減少抑制と線維化の抑制効果が認められた。さらに、EPA投与では腎臓におけるPKC、MDAの改善がみられるとともにNox2、Nox4、p47^{phox}mRNA発現量の改善傾向が認められた。また、糖尿病によって肥大化した系球体の改善と尿中アルブミン尿の有意な改善効果も認められた。このことから、EPAは腎系球体のEndMTを制御することで腎保護効果を示すことが明らかとなった。

以上の結果より本研究において、肥満とくに脂肪細胞の肥大化は直接的に血管内皮細胞のEndMTを引き起こすことが示された。またEPAなどの食品由来成分を用いることでEndMTを制御し疾患の病態進展を予防・改善し得ることを明らかにした。

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 4件）

1. 著者名 Yasuzawa Toshinori, Nishi Ryota, Ishitani Satono, Matsuo Osamu, Ueshima Shigeru	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of Enzamin, a Microbial Product, on Alterations of Intestinal Microbiota Induced by a High-Fat Diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 4743 ~ 4743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14224743	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 Akira Mima, Toshinori Yasuzawa	4. 巻 38
2. 論文標題 Role of insulin signaling and its associated signaling in glomerulus for diabetic kidney disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Histology and histopathology	6. 最初と最後の頁 487 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-543	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 Yasuzawa Toshinori, Nakamura Tomomi, Ueshima Shigeru, Mima Akira	4. 巻 2021
2. 論文標題 Protective Effects of Eicosapentaenoic Acid on the Glomerular Endothelium via Inhibition of EndMT in Diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/2182225	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 HUANG Honing, NAKAMURA Tomomi, YASUZAWA Toshinori, UESHIMA Shigeru	4. 巻 66
2. 論文標題 Effects of <i>Coriandrum sativum</i> on Migration and Invasion Abilities of Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 468 ~ 477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.66.468	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安澤俊紀, 美馬 晶, 上嶋 繁
2. 発表標題 脂肪細胞肥大化が血管内皮細胞の内皮間葉移行に及ぼす影響
3. 学会等名 第61回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外池 奈実, 桑原 頌治, 鶴谷 拓仁, 今村 萌々果, 安澤 俊紀, 辰巳 佐和子
2. 発表標題 高リン血症改善における肝臓Namp1/NAD合成系の関与
3. 学会等名 第26回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akira Mima, Toshinori Yasuzawa
2. 発表標題 The effect of prebiotics on intestinal flora and renal function: attempts to inhibit AKI
3. 学会等名 AKI/CRRT2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桑原頌治、八幡大希、外池奈実、雑賀果南、木越菜々恵、安澤俊紀、辰巳佐和子
2. 発表標題 尿中のcalcioprotein particle (CPP) 測定による腎機能低下の早期発見
3. 学会等名 第61回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外池奈実、木越菜々恵、安澤俊紀、桑原頌治、辰巳佐和子
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるリン組織移行の検討
3. 学会等名 第61回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木越菜々恵、外池奈実、安澤俊紀、桑原頌治、辰巳佐和子
2. 発表標題 食餌のタイミングが血中リン濃度の日内リズムにおよぼす影響：慢性腎臓病モデルマウスの検討
3. 学会等名 第61回日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安澤俊紀、中村友美、上嶋繁、美馬晶
2. 発表標題 糖尿病における脂質異常症は 内皮間葉移行を誘導することによりDKDを進展させる
3. 学会等名 第34回腎と脂質研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安澤 俊紀、中村 友美、美馬 晶、上嶋 繁
2. 発表標題 プレバイオティクスによる CKD ラット腸内フローラと腎機能への影響
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安澤俊紀, 中村友美, 上嶋 繁, 美馬 晶
2. 発表標題 糖尿病マウスにおけるエイコサペンタエン酸のEndMTに対する影響
3. 学会等名 第32回日本糖尿病性腎症研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安澤俊紀, 中村友美, 美馬晶, 上嶋繁
2. 発表標題 内皮間葉移行(Endothelial to Mesenchymal Transition)に及ぼす脂肪細胞の影響
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020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

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