

## 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：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590956

研究課題名（和文） 動脈硬化モデルのインスリン抵抗性・脂肪組織異常改善効果としてのAT2受容体機能

研究課題名（英文） Role of AT2 Receptor on Insulin Resistance and Adipose Tissue Dysfunction in Atherosclerotic Mouse Model

研究代表者

岩井 将（IWA I MASARU）

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00184854

研究成果の概要（和文）：

我々は、動脈硬化モデルである ApoEKO マウスと AT2KO マウスを交配させることにより作製した AT2/ApoEKO マウスを用い、これらのマウスにおける動脈硬化性病変や脂肪組織変化を AT2 受容体機能に注目して解析した。AT2/ApoEKO マウスでは、ApoEKO マウスに比べて、動脈硬化性病変の増強、血中コレステロール濃度の上昇に加え、脂肪組織では重量増加、脂肪細胞肥大化が認められ、脂肪細胞分化関連因子またインスリンシグナル関連因子、グルコース輸送タンパクの発現が低下した。さらに、胆汁中へのコレステロール排泄も低下した。これらの結果から、AT2 受容体の刺激が、脂肪細胞機能の改善やコレステロール代謝の改善をもたらし、メタボリック症候群などの代謝疾患の治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the comparison with ApoEKO mice, AT2 deficient (AT2/ApoE knockout) mice showed the increase in adipose tissue weight, adipocyte size, markers for adipocyte differentiation and insulin resistance. AT2/ApoEKO mice also showed the decrease in cholesterol excretion into bile and feces. These results suggest that AT2 receptor stimulation induces improvement of adipocyte function and cholesterol metabolism and that these effects may be useful for the therapy for metabolic syndrome in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000   | 2,210,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2011年度 | 600,000   | 180,000   | 780,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科

キーワード：動脈硬化、アンジオテンシン、受容体、インスリン抵抗性、脂肪組織

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群の根底にはインスリン抵抗性と脂質代謝異常があり、最終的な病態として、動脈硬化性病変が想定されている。レニン-アンジオテンシン系はアンジオテンシンⅡがその主要受容体である AT1 受容体刺激を介して、インスリン抵抗性や動脈硬化に深く関与することが報告されているが、脂肪組織への影響はあまり検討されていなかった。さらに、もう一つの受容体サブタイプである AT2 受容体に関しては、循環器臓器では AT1 受容体に対し拮抗的に働くが、脂肪組織や脂質代謝への影響はほとんど明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

これらの知見を踏まえ、本研究においては動脈硬化モデルを中心に、メタボリック症候群にも関連するモデル動物を用いて、インスリン抵抗性と脂肪組織機能異常の発症に関わるレニン-アンジオテンシン系、特に AT2 受容体の機能に焦点をあてて検討をした。同時に動脈硬化に伴う代謝異常・脂肪組織機能異常の改善薬としての RA 系阻害薬の効果も検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

動脈硬化モデルであるアポリポ蛋白 E ノックアウト (ApoEKO) マウスに、アンジオテンシン受容体ノックアウトマウスを掛け合わせ、AT1/ApoEKO マウス、AT2/ApoEKO マウスを作製する。これらのマウスに高コレステロール食を4~6週間摂取させた後、血液、大動脈、脂肪組織を採取し、血中脂質、形態学的異常、転写因子の発現などを、生化学的手法、遺伝子工学的な手法、組織標本の作製と染色法などを用いて比較検討し、AT1 受容体欠損に対する AT2 受容体欠損による変化を比較検討した。

### 4. 研究成果

(1) 動脈硬化モデルマウスにおける脂肪組織異常とインスリン抵抗性  
ApoEKO マウスは通常食での飼育によっても高コレステロール血症と大動脈に脂肪沈着や炎症細胞浸潤を伴う動脈硬化性病変が誘発されるが、このとき内臓脂肪である白色脂肪組織について調べると、正常マウスに比して、脂肪細胞が大型化していた。また、この脂肪組織における炎症性サイトカイン、酸化

ストレスマーカーの発現の増加も認め、脂肪組織の機能異常が示唆された。さらに、AT1 受容体欠損 (AT1/ApoEKO) マウスでは血中脂質の減少に加え、内臓脂肪重量の減少、インスリン作用や脂肪細胞分化に関与するアディポネクチン・PPAR $\gamma$ ・C/EBP の発現増加を認め、AT1 受容体シグナルのブロックにより動脈硬化のみでなく、内臓脂肪機能も改善することが示された。同様の内臓脂肪機能改善作用は、2型糖尿病マウスに AT1 受容体ブロックを投与した場合にも認められた。

### (2) 動脈硬化モデルマウスの脂肪組織異常における AT2 受容体の役割

AT2 受容体欠損を有する AT2/ApoEKO マウスにおいては、特に高脂肪食を摂取させると ApoEKO マウスに比して血中脂質濃度や動脈硬化が増強することが判明したが、同時に内臓脂肪重量と脂肪細胞サイズの増加も認められた。その脂肪組織では、細胞分化に関わる PPAR $\gamma$ ・C/EBP・aP2 などの転写調節因子の発現低下ならびにインスリン受容体基質 (IRS-1) の発現低下を認めた。これらの成果は、学会等で発表し、また学術論文としても発表した。

### (3) 動脈硬化モデルマウスの高コレステロール血症における AT2 受容体の役割

我々の検討では、高脂肪食摂取による血中コレステロール値は正常マウスに比して ApoEKO マウスでは高値であるが、AT1 受容体欠損では値が低下し、逆に AT2 受容体欠損では値がさらに上昇した。このときコレステロール摂取量や肝組織中のコレステロール含量は受容体欠損により差がなく肝のコレステロール合成酵素の発現量も差がなかった。しかし、胆汁中へのコレステロール排泄が AT1 受容体欠損で増加し、AT2 受容体欠損で低下することがわかった。この結果は、コレステロール排出に AT1・AT2 受容体が相補的に働いており、これにより血中コレステロール濃度が調節されることを示唆している。この結果は学会で発表し、現在学術誌に投稿中である。

以上の実験結果から、動脈硬化モデルにおいて内臓脂肪組織の異常が認められ、メタボリック症候群の病態解析に有用であることが判明した。このモデルにおいて、AT1 受容体の刺激は脂肪細胞分化抑制や脂肪組織の炎

症反応を誘発して脂肪組織機能異常を引き起こすが、AT2 受容体刺激はこれとは逆に脂肪細胞分化を促進して脂肪細胞の小型化を誘発する。同時にインスリン抵抗性も改善すると考えられる。これらの結果は、AT1 受容体のブロックだけでなく、AT2 受容体の積極的な刺激が、メタボリック症候群をはじめとする生活習慣病の治療に新たな方向をもたらすと期待される。

#### 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 12 件) 全て査読有り

1. Iwai M, Senba I, Kanno H, Nakaoka H, Inaba S, Horiuchi M. Renin inhibitors inhibited the activity of recombinant human renin but not activity in healthy human plasma. *Clinical Laboratory*, 2012, in press.
2. Iwai M, Kanno H, Tomono Y, Inaba S, Senba I, Furuno M, Mogi M, Horiuchi M. Direct renin inhibition improved insulin resistance and adipose tissue dysfunction in type 2 diabetic KK-Ay mice. *J Hypertens*. 2010;28:1471-1481.
3. Iwai M, Kanno H, Inaba S, Senba I, Sone H, Nakaoka H, Horiuchi M. Nifedipine, a calcium-channel blocker, attenuated glucose intolerance and white adipose tissue dysfunction in type 2 diabetic KK-Ay mice. *Am J Hypertens*. 2011;24:169-174.
4. Inaba S, Iwai M, Furuno M, Kanno H, Senba I, Okayama H, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Temporary Treatment With AT1 Receptor Blocker, Valsartan, From Early Stage of Hypertension Prevented Vascular Remodeling. *Am J Hypertens*. 24(5):550-556, 2011.
5. Okumura M, Iwai M, Nakaoka H, Sone H, Kanno H, Senba I, Ito M, Horiuchi M. Possible involvement of AT2 receptor dysfunction in age-related gender difference in vascular remodeling. *J Am Soc Hypertens*. 2011;5:76-84.
6. Iwai M, Kanno H, Senba I, Nakaoka H, Moritani T, Horiuchi M. Irbesartan increased PPAR $\gamma$  activity in vivo in white adipose tissue of atherosclerotic mice and improved adipose tissue dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406:123-126.
7. Inaba S, Iwai M, Furuno M, Kanno H, Senba I, Okayama H, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Role of angiotensin-converting enzyme

2 in cardiac hypertrophy induced by nitric oxide synthase inhibition. *J Hypertens*, 2011;29:2236-45.

8. Inaba S, Iwai M, Tomono Y, Senba I, Furuno M, Kanno H, Okayama H, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Exaggeration of focal cerebral ischemia in transgenic mice carrying human renin and human angiotensinogen genes. *Stroke*. 2009;40(2):597-603.

9. Inaba S, Iwai M, Tomono Y, Senba I, Furuno M, Kanno H, Okayama H, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Prevention of Vascular Injury by Combination of an AT1 Receptor Blocker, Olmesartan, with Various Calcium Antagonists. *Am J Hypertens*, 2009;22(2):145-150.

10. Inaba S, Iwai M, Furuno M, Tomono Y, Kanno H, Senba I, Okayama H, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Continuous Activation of Renin-Angiotensin System Impairs Cognitive Function in Renin/Angiotensinogen Transgenic Mice. *Hypertension*. 2009;53:356-362.

11. Kanno H, Iwai M, Inaba S, Senba I, Tomono Y, Mogi M, Horiuchi M. Improvement of glucose intolerance by combination of pravastatin and olmesartan in type 2 diabetic KK-Ay mice. *Hypertens Res*. 2009;32:706-711.

12. Iwai M, Tomono Y, Inaba S, Kanno H, Senba I, Mogi M, Horiuchi M. AT2 receptor deficiency attenuates adipocyte differentiation and decreases adipocyte number in atherosclerotic mice. *Am J Hypertens*. 2009; 22:784-791.

[学会発表] (計 12 件)

1. 森谷 友造、岩井 将、菅野 晴美、檜垣 高史、石井 榮一、堀内 正嗣. 心組織の生後発達過程における ACE2-Angiotensin-(1-7)-Mas axis の病態生理学的役割: ACE2 遺伝子欠損マウスを用いた検討. 日本高血圧学会総会 宇都宮; 2011、10月20日~22日.

2. 岩井 将、菅野 晴美、中岡 裕智、森谷 友造、堀内 正嗣. 動脈硬化マウスにおけるコレステロール排出に及ぼすアンジオテンシン II 受容体サブタイプの役割. 日本高血圧学会総会 宇都宮; 2011、10月20~22日

3. 岩井 将. 脂肪組織とレニン-アンジオテンシン系. 日本高血圧学会総会 2010 (シンポジウム). 10月15日~17日

4. 岩井 将、中岡 裕智、菅野 晴美、稲葉 慎二、堀内 正嗣. 炎症性血管リモデリングにおける ACE2 の役割と ARB の作用との関連性. 日本高血圧学会総会 福岡 ; 2010、10月15日~17日.

5. 岩井 将、菅野 晴美、中岡 裕智、稲葉 慎二、堀内 正嗣. 動脈硬化マウスの脂肪組織異常に対するイルベサルタンの抑制作用と脂肪組織 PPAR $\gamma$  活性化. 福岡 ; 2010、10月15日~17日.

6. 岩井 将、稲葉慎二、菅野晴美、古野めぐみ、中岡裕智、茂木正樹、堀内正嗣. 2型糖尿病モデルマウスの耐糖能異常と脂肪組織変化に対するカルシウムチャンネルブロッカーの改善作用. 日本高血圧学会総会 大津 ; 10月1~3日、2009

7. Masaru Iwai, Hisako Sone, Harumi Kanno, Izumi Senba, Hiroto Nakaoka, Tomozo Moritani, Masatsugu Horiuchi. Effect of AT1 or AT2 Receptor Deficiency on Cholesterol Excretion in Apolipoprotein E-null Mice Treated with High Cholesterol Diet. 2011 (Sept. 20-24), Orlando, FL, USA.

8. Masaru Iwai, Hiroto Nakaoka, Harumi Kanno, Izumi Senba, Tomozo Moritani, Masatsugu Horiuchi. Inhibition of ACE2-Angiotensin-(1-7)-Mas Axis in Vascular Remodeling after Cuff Placement and Stimulation of ACE2 Expression by AT1 Receptor Blockade. 2011 (Sept. 20-24), Orlando, FL, USA.

9. Jun Aono, Jun Suzuki, Akiyoshi Ogimoto, Hideki Okayama, Masaru Iwai, Masatsugu Horiuchi, Jitsuo Higaki. Deletion of the angiotensin II type 1a receptor prevents atherosclerotic plaque rupture. 83rd Scientific Sessions of American Heart Association, 2010 (November 13-17), Chicago, Illinois, USA. (Oral)

10. Masaru Iwai, Harumi Kanno, Shinji Inaba, Izumi Senba, Hisako Sone, Hiroto Nakaoka, Masatsugu Horiuchi. Effect of Calcium Channel Blocker on Glucose

Intolerance and Adipose Tissue Dysfunction in Type 2 Diabetic KK-Ay Mice. (19th Scientific Meeting International Society of Hypertension) 2010 (September 26-30), Vancouver, Canada. (Oral)

11. Masaru Iwai, Hiroto Nakaoka, Hisako Sone, Harumi Kanno, Izumi Senba, Shinji Inaba, Masatsugu Horiuchi. Possible Involvement of ACE2-Angiotensin(1-7)-Mas Axis in Inflammatory Vascular Remodeling after Cuff Placement. (19th Scientific Meeting International Society of Hypertension) 2010 (September 26-30), Vancouver, Canada. (Oral, Symposium)

12. Masaru Iwai: Role of Renin-Angiotensin System in Metabolic Syndrome. JES Sponsored Symposium, The 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010), 2010 (March 28), Kyoto, Japan.

[図書] (計1件)

岩井 将, 堀内 正嗣: AT1 受容体 高血圧ナビゲーター 第3版 メディカルレビュー社, 東京, pp.78-79, 2010.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 将 (IWAI MASARU)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 00184854

(2) 研究分担者

堀内 正嗣 (HORIUCHI MASATSUGU)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 40150338