

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591153

研究課題名(和文)

血管内皮細胞生理活性因子による内臓肥満制御の分子基盤解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文)

Molecular mechanism of visceral obesity controlled by endothelial cell-related growth factors and the search for a new strategy of adipogenesis control

研究代表者

加来 浩平 (KAKU KOHEI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10116709

**研究成果の概要(和文)：**メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満を基に、様々な代謝異常を呈し糖尿病や動脈硬化疾患の基盤となる。申請者らは血管新生と adipogenesis の関連性に着目し、血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損 (VEPDK1KO) マウスを作製し、PDK1 を鍵分子とする血管内皮細胞生理活性因子による内臓脂肪量調節の分子基盤解明を進めてきた。VEPDK1KO マウスでは高脂肪食負荷時の内臓脂肪組織重量増加の抑制、脂肪細胞の小型化、インスリン感受性増強及び耐糖能改善がみられ、その機序として、脂肪組織の血管新生抑制による内臓脂肪量減少が炎症機転の抑制に働く結果であることを解明した。一方、肥満 2 型糖尿病モデル *db/db* マウスと VEPDK1KO との交配で得られた *db/db*-VEPDK1KO は高脂肪食負荷時と同様に体重減少、内臓脂肪重量の低下を示したが、食後インスリン値の増加、インスリン負荷試験でも筋肉を中心とした全身のインスリン抵抗性がみられた。*db/db*-VEPDK1KO では脂肪組織に加えて骨格筋内の血管新生が低下し、さらにインスリン受容体の蛋白発現も低下していた。STZ により高血糖を惹起した VEPDK1KO マウスでも同様の所見を得た。このマウスでは骨格筋の VEGF, VEGFR, HIF1 遺伝子発現に変化はなく、VCAM1 の高発現を蛋白レベルでも認めた。高血糖マウス骨格筋内の血管新生低下の機序として、PI3K-PDK1 シグナル抑制により増加した MAPK シグナルによる VCAM1 活性上昇と HIF1 シグナル抑制が想定された。以上の結果から、インスリン分泌が保たれたマウスでは、血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損が脂肪組織の血管新生抑制による内臓脂肪量減少に働くものの、糖尿病の遺伝的背景があるかあるいは高血糖にあるマウスでは、骨格内血管新生抑制がみられ、全身のインスリン抵抗性が悪化すると考えられた。従って内臓肥満制御には、脂肪組織内血管特異的な PDK1 活性抑制が必要と考えられた。

**研究成果の概要(英文)：**Metabolic syndrome is known to induce various metabolic disorders such as diabetes mellitus and atherosclerotic diseases based on visceral obesity. In order to control the adiposity, we aimed at the relationship between angiogenesis and adipogenesis. The PI3K signaling pathway in vascular endothelial cells is important for systemic angiogenesis and glucose metabolism. To evaluate the systemic pathway of angiogenesis under PI3K signal, we generated endothelial cell specific PDK1 knock out mice using Cre-loxP system and investigated the degree of impaired angiogenesis of skeletal muscles under the normo- and hyperglycemia status. In normoglycemic status, VEPDK1KO mice manifested enhanced glucose tolerance and whole-body insulin sensitivity with a reduced volume of epididymal adipose tissues. These results provide the *in vivo* evidence that lowered angiogenesis through the deletion of PDK1 signaling not only interferes with the

growth of adipose tissue but also induces increased energy expenditure due to amelioration of the adipocytokine profile.

The diabetic VEPDK1KO mice generated by genetic cross with db gene, however, demonstrated a significant impairment of glucose metabolism and systemic insulin sensitivity was diminished by approximately 39% in 12-week-old *db*-KO mice during the insulin tolerance test (3U/kg) despite of a reduced adiposity. Plasma high molecular weight adiponectin was elevated and mRNA expression of PECAM-1 and VEGF in epigonadal adipose tissue was decreased in *db*-KO compared with the control mice by 32% and 47%, respectively. Protein expressions of the  $\beta$  subunit of the insulin receptors and mRNA expressions of PECAM-1 in the skeletal muscle were decreased by approximately 47% and 23%, respectively, in *db*-KO. Nevertheless, those in the liver were comparable in both groups. We concluded that a complete lack of endothelial PDK1 induces the defects of angiogenesis in adipose tissues and skeletal muscle, which lead to deterioration of systemic insulin sensitivity in mice with genetic susceptibility to diabetes.

Furthermore, protein expression of VCAM1, located in PI3K signal and regulated by PDK1, was significantly up-regulated by 2.4 times higher in Gastro of STZ-KO than in that of the control KO mice, but no significant difference was observed between two groups in the liver. VEGF, VEGF receptor, and HIF1 gene expressions in both Gastro and liver were not different between STZ-KO and the control-KO. These results indicated that ablation of PDK1 in vascular endothelial cells in diabetic state induces the lower vascularization and VCAM1-upregulation in skeletal muscle but not in the liver, and the underlying mechanism may be totally different from the reported angiogenic factors, including VEGF and HIF1.

Our results clearly indicate that PI3K signaling pathway in vascular endothelial cells plays an important role on adiposity and angiogenesis, and adipose tissue-specific ablation of PDK1 in endothelial cells may reduce visceral fat and contribute on an amelioration of dismetabolism induced by metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：メタボリックシンドローム

### 1. 研究開始当初の背景

高齢社会を迎えた今、我が国の死因の上位を占める心疾患や脳血管疾患の基礎疾患として糖尿病は重要視されている。近年、メタボリックシンドローム (MetS) が、糖尿病や動脈硬化性疾患といった生活習慣病の基盤病態として注目されている。MetS は内臓脂肪型肥満に基づくインスリン抵抗性が主たる病態であり、その制御は多くの生活習慣病の克服に多大な貢献をするものと考えられてきた。一方で脂肪組織の形成に血管新生との関連性を示唆する報告がみられるようになった。血管内皮細胞は、種々の生理活性因子の刺激を介して、また自らが生理活性物質の分泌を行い、血流調節・血管新生・血管透過性などを制御する。代表的生理活性因子として、インスリンや vascular endothelial growth factor (VEGF) が挙げられるが、これら生理活性因子作用の制御シグナル伝達分子として PDK1 が重要視されている。我々は、血管内皮細胞におけるインスリンシグナルが内臓脂肪組織における血管新生と脂肪蓄積の制御に何らかの役割を果たす可能性を仮定し、血管内皮細胞特異的な PDK1 ノックアウト (VEPDK1KO) マウスを作成した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、VEPDK1KO マウスを用いて

①PDK1 を鍵分子とする血管内皮細胞生理活性因子による内臓脂肪量調節の分子基盤を解明し、血管内皮細胞 PDK1 が内臓肥満/糖尿病の進展および血管症の分子標的の一つであることを明らかにする、②内臓肥満/糖尿病の進展阻止、血管合併症阻止を目指した新規治療戦略を構築することに有る。

### 3. 研究の方法

VEPDK1KO マウスは血管内皮細胞特異的に PDK1 遺伝子発現が抑制され、他臓器では発現抑制を認めないこと、PDK1-Akt シグナル伝達は抑制されること、非欠損対照マウスに比し、高脂肪食下の体重抑制、内臓脂肪量減少、細胞小型化を認めることを既に確認している。本研究では前述の目的達成のため、まず血管内皮細胞 PDK1 が血管機能調節および内臓脂肪量調節の鍵分子としての役割を担うことを解明する。そのため VEPDK1KO フェノタイプの詳細解析を行い、内臓脂肪蓄積抑制、インスリン感受性増強の分子機構を解明するとともに、肥満・糖尿病発症モデルマウスとの遺伝子交配により、血管内皮細胞特異

的 PDK1 欠損による抗肥満、抗糖尿病効果を直接的に実証・検討する (平成 21 年度)。さらに MetS/糖尿病の発症・進展抑制および血管障害抑制の新たな分子ターゲットを探索することを目的に、VEPDK1KO 脂肪および肺組織を用いて、脂肪細胞の小型化、内臓脂肪組織重量の増加抑制の分子機構にリンクする遺伝子を同定する (平成 22 年度)、血管新生・再生に関与する分子の同定を行い、新規治療法の分子標的としての可能性を探索する (平成 23 年度)。

### 4. 研究成果

既に述べたように、血管内皮細胞 VEPDK1KO マウスは血管内皮細胞特異的に PDK1 遺伝子発現が抑制され、他臓器では発現抑制を認めないこと、PDK1-Akt シグナル伝達は抑制されること、非欠損対照マウスに比し、高脂肪食下の体重抑制、内臓脂肪量減少、細胞小型化を認める。更に VEPDK1KO、コントロールマウスへの高脂肪負荷を行い、OGTT、ITT、食事負荷試験による糖代謝調節能の評価とともに血中脂質レベル、脂質プロファイルの変化を評価した。また脂肪組織における血管新生の評価を行った。更に鎖骨下静脈カテーテル挿入術後、正常血糖高インスリンランブ法および 2-[<sup>14</sup>C]deoxy glucose を用いて、グルコース注入量、全身のグルコース取り込み量、解糖量、肝糖放出量、グリコーゲン合成量、全身のインスリン感受性を評価するとともに、肝組織でのインスリン刺激下 IRS1, IRS2, Akt のリン酸化レベルを検討した。その結果、VEPDK1KO では特に高脂肪負荷による耐糖能やインスリン抵抗性への影響は少ないことが明らかになった。その機序として内臓脂肪量の減少が想定され、その機序として、血管新生抑制が明らかになった。また肝糖放出の抑制が認められ、AMP キナーゼ活性化による肝糖新生系律速酵素である PEPCK 等の活性抑制によることが明らかになった。このマウスでは血管内皮細胞の PDK1 欠損により VEGF からのシグナル伝達が阻害された結果、脂肪組織内の血管新生の低下、脂肪細胞肥大化の抑制がもたされるとともに、小型脂肪細胞の割合が上昇し、血中アディポネクチン値の上昇などを伴い、耐糖能が改善すると思われた。

更に高血糖・肥満時の血管内皮細胞 PDK1 の肥満形成、耐糖能における機能を解析するため肥満 2 型糖尿病モデルマウスであるレプチン受容体欠損マウス (*db/db* マウス) と VEPDK1KO を交配させ、その表現型を解析した。*db/db*-VEPDK1KO の出生率は対照群

(*db/db*-PDK<sup>flox/flox</sup>) マウスと同等で、明らかな血管奇形も認めなかった。*db/db*-VEPDK1KO は高脂肪食負荷時と同様、16 週齢で約 7.4% の体重減少、内臓脂肪重量が約 14% の低下を示した。しかし、食後インスリン値が約 50% 増加し、インスリン負荷試験でも筋を中心とした全身のインスリン抵抗性が惹起されていた。糖尿病の遺伝的背景を持たない VEPDK1KO では高脂肪食負荷によって脂肪組織内のみで血管新生が低下していたが、*db/db*-VEPDK1KO では脂肪組織に加えて骨格筋内の血管新生が低下し、さらにインスリン受容体の蛋白発現も低下していた。以上から、高脂肪食のみでは糖尿病の遺伝的背景が無い限り、血管新生の低下は抗肥満・インスリン感受性亢進をもたらすが、高血糖下では骨格筋の血管新生も加えて低下し、全身のインスリン抵抗性が悪化する可能性が示唆された。

STZ により高血糖を惹起した VEPDK1KO マウスでも同様の所見を得た。この高血糖マウス (STZ- VEPDK1KO) では骨格筋における VEGF, VEGFR, HIF1 遺伝子発現に変化はなく、VCAM1 の高発現を蛋白レベルでも認めた。以上の結果から、高血糖マウスの骨格筋内の血管新生低下の機序として、PI3K-PDK1 シグナル抑制により増加した MAPK シグナルが VCAM1 活性上昇をもたらし、その結果 HIF1 シグナル抑制をもたらしたものと想定された。従って、全身のインスリン作用が保たれ、代謝状態が正常であれば、血管新生の低下は抗肥満・インスリン感受性亢進をもたらすが、糖尿病状態では骨格筋内血管新生も加えて低下し、全身のインスリン感受性低下をもたらすと考えられ、内臓肥満制御には、脂肪組織内血管特異的な PDK1 活性抑制が必要と考えられた。

#### 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 5 件)

- ① Tawaramoto K, Kotani K, Hashiramoto M, Kanda Y, Nagare T, Sakaue H, Ogawa W, Emoto N, Yanagisawa M, Noda T, Kasuga M, Kaku K : Ablation of 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 (PDK1) in Vascular Endothelial Cells Enhances Insulin Sensitivity by Reducing Visceral Fat and Suppressing Angiogenesis. *Mol Endocrinol*, 査読有, 26(1): 95-109, 2012 DOI:10.1210/me.2010-0412
- ② Nakashima K, Shimoda M, Hamamoto S, Tatsumi F, Hirukawa H, Tawaramoto K, Kanda Y, Kaku K : Self-inducible secretion of

glucagon-like peptide-1 (GLP-1) that allows MIN6 cells to maintain insulin secretion and insure cell survival. *Mol Cell Endocrinol*, 査読有, 349(2):281-288, 2012

DOI:10.1016/j.mce.2011.008

③ Shimoda M, Kanda Y, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Matsuki M, Kaku K : The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 査読有, 54(5):1098-1108, 2011

DOI:10.1007/s00125-011-2069-9

④ Kanda Y, Shimoda M, Hamamoto S, Tawaramoto K, Kawasaki F, Hashiramoto M, Nakashima K, Matsuki M, Kaku K : Molecular mechanism by which pioglitazone preserves pancreatic  $\beta$  cells in obese diabetic mice: Evidence for acute and chronic actions as a PPAR $\gamma$  agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 査読有, 298(2): E278-E286, 2010

DOI:10.1152/ajpendo.00388.2009.

⑤ Kanda Y, Shimoda M, Tawaramoto K, Hamamoto S, Tatsumi F, Kawasaki F, Hashiramoto M, Nakashima K, Matsuki M, Kaku K : Molecular Analysis of db Gene-related Pancreatic beta Cell Dysfunction; Evidence for a Compensatory Mechanism Inhibiting Development of Diabetes in the db Gene Heterozygote. *Endocr J*, 査読有, 56(8): 997-1008, 2009 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/endoj/56/8/56\\_K09E-028/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endoj/56/8/56_K09E-028/_pdf)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Tawaramoto K, Hashiramoto M, Kimura T, Hirukawa H, Shimoda M, Ogawa W, Kasuga M, Kaku K : Ablation of PDK1 in vascular endothelial cells in diabetic condition deteriorates vascularity only in skeletal muscles but not in liver. 72<sup>nd</sup> American Diabetes Association Scientific Session, 2012. 6. 11, Philadelphia
- ② 俵本和仁, 柱本 満, 木村友彦, 蛭川英典, 辰巳文則, 濱本純子, 下田将司, 小川 涉, 春日雅人, 加来浩平: 血管内皮特異的 PDK1 欠損における肝、骨格筋内血管面積の解析—高血糖による影響。第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 17 日、横浜

③ Tawaramoto K, Hashiramoto M, Kotani K, Ogawa W, Hirukawa H, Tatsumi F, Hamamoto S, Shimoda M, Kanda Y, Kasuga M, Kaku K: Ablation of PDK1 in vascular endothelial cells deteriorates systemic insulin sensitivity and angiogenesis of skeletal muscles in STZ-induced hyperglycemic mice. 71<sup>st</sup> American Diabetes Association Scientific Session, 2011. 6. 25, San Diego

④ 俵本和仁、柱本 満、蛭川英典、辰巳文則、濱本純子、下田将司、菅田有紀子、小谷 光、小川 涉、春日雅人、加来浩平: 高血糖状態での血管内皮細胞 PDK1 欠損は骨格筋内血管数減少と全身インスリン感受性悪化を惹起する。第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 19 日、札幌

⑤ Tawaramoto K, Hashiramoto M, Kotani K, Ogawa W, Tatsumi F, Hamamoto S, Shimoda M, Kanda Y, Kasuga M, Kaku K: Ablation of vascular endothelial phosphoinositide-dependent protein kinase 1 deteriorates the volume of blood flow in skeletal muscle. 46th European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting, 2010. 9. 22, Stockholm

⑥ 俵本和仁、柱本 満、小谷 光、小川 涉、辰巳文則、濱本純子、下田将司、菅田有紀子、春日雅人、加来浩平: 肥満 2 型糖尿病モデルでの血管内皮細胞 PDK1 欠損は筋肉内血管新生を低下させ、全身インスリン抵抗性を増悪させる。第 30 回日本肥満学会、2009 年 10 月 9 日、浜松

⑦ Tawaramoto K, Hashiramoto M, Kotani K, Ogawa W, Tatsumi F, Hamamoto S, Shimoda M, Kanda Y, Kasuga M, Kaku K: Ablation of Vascular Endothelial PDK1 in Diabetic *db/db* Mice Further Deteriorates Insulin Sensitivity through Defects of Angiogenesis in Skeletal Muscle and Adipose Tissue. 69<sup>th</sup> American Diabetes Association Scientific Session, 2009. 6. 8, New Orleans

⑧ 俵本和仁、柱本 満、小谷 光、小川 涉、辰巳文則、濱本純子、下田将司、菅田有紀子、春日雅人、加来浩平: 肥満 2 型糖尿病での血管内皮細胞 PDK1 欠損は筋肉内血管新生を低下させ、全身インスリン抵抗性を増悪させる。第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会、2009 年 5 月 22 日、大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加来 浩平 (KAKU KOHEI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10116709

### (2) 研究分担者

松木 道裕 (MATSUKI MICHIMIRO)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00165797

柱本 満 (HASHIRAMOTO MITSURU)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40346680

菅田 有紀子 (KANDA YUKIKO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40351895

俵本 和仁 (TAWARAMOTO KAZUHIRO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：70368629

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：