

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 25 年 8 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究 C（一般）

研究期間：2010～2012

課題番号：22616007

研究課題名（和文）細胞のメカニカルストレス反応を標的とする代謝症候群および循環系疾患制御の新戦略

研究課題名（英文）A new strategy of the regulation of metabolic syndrome and cardiovascular diseases by the pharmacological targeting of cellular mechanical stress reactions.

研究代表者

田辺 由幸（TANABE YOSHIYUKI）

岩手医科大学薬学部准教授

研究者番号：10275109

研究成果の概要（和文）：

肥満マウス腹部への連日 30 分間の振動刺激により、血漿中遊離脂肪酸が低下し、耐糖能異常が改善した。脂肪組織での ERKs の一過的活性化、adipogenic 因子の減少と anti-adipogenic 因子の増加、中性脂肪やアディポカインの低下、抗炎症性 M2-M ϕ マーカーの上昇が見られた。致死性肺高血圧ラット（MCT-PHR）の肺動脈は、PLA₂-X の高発現と緊張性亢進を示す。sPLA₂ 阻害薬インドキサムは、この肺動脈緊張性を解除し、病態肺組織での、サイトカイン発現とアポトーシスを抑制し、顕著な延命をもたらすことを見出した。

The effects of abdominal vibration were examined using obese mice with high-fat diet. Daily exposure of the 30-minutes-vibration induced downregulation of adipogenic factors and upregulation of anti-adipogenic factor, which consisted with decreasing adipose tissue triglyceride, some adipokines, and plasma free fatty acids. Furthermore, augmented expressions of several genes characteristic of anti-inflammatory M2 macrophages (M ϕ) were detected. The effects of selective sPLA₂ inhibitor (indoxam) on the pathogenicity of MCT-induced fatal pulmonary hypertensive rats (MCT-PHR) were also examined. Indoxam abolished the enhanced contractilities of the pulmonary arteries of MCT-PHR, which arteries show augmented expression of sPLA₂-X isoform. In addition, administration of indoxam attenuated some inflammatory signs such as expression of proinflammatory cytokines and apoptosis in the lung, leading to a significant improvement of survival ratio in MCT-PHR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：メカノバイオロジー

キーワード：メカニカルストレス、メタボリックシンドローム、脂肪細胞、マクロファージ、PPAR-、サイトカイン、肺高血圧、ホスホリパーゼ A₂

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) 代謝症候群における Adipose-Immune axis とメカニカルストレスの相互作用

Globesity なる造語が示すように、肥満に基づく代謝症候群は今や世界的問題である。薬物治療が未だ限られており、食事療法に加えて運動療法の重要性はますます高まっている。エクササイズやフィットネス運動など脂肪組織に圧迫や揺動が加わることは日常的にも経験するが、脂肪組織へのメカニカルストレス (MS) の働きに科学的根拠のないまま、民間療法だけが先行している。心臓、血管、筋、骨などの力学刺激高感受性組織と同様に、脂肪細胞も間葉系由来であることから、その細胞機能が力学刺激感受性であることを想定し、これまでに以下の(i) ó (iii)に述べる結果を得た。

(i) MS は MAP キナーゼ活性化を介して転写制御因子 PPAR₂ の発現を選択的に抑制することにより成熟脂肪細胞への分化を阻害する。更に、チアゾリジン薬による過剰な脂肪細胞分化促進作用を正常レベルに調節することが出来る。(Tanabe et al., J.Cell Sci.117:3605-14, 2004)

(ii) MS は脂肪細胞分化過程において COX-2 の発現を増強する。これにより -3 系 PUFA のうち COX-2 基質となるエイコサペンタエン酸 EPA と MS は相乗的に脂肪細胞分化を抑制する。(Tanabe et al., J.Pharmacol.Sci. 106:478-84, 2008)

(iii) 上記 in vitro 実験の成果をふまえ、食餌性肥満雄性マウスの腹部脂肪組織に皮膚直上から振動刺激を連日与えたところ、2週間経過後では、血中レプチン濃度や遊離脂肪酸 NEFA 値の低下傾向が見られた。この際、振動刺激側脂肪組織での成熟脂肪細胞マーカーの低下、前駆脂肪細胞マーカーの上昇が見られた。

これと同時に、振動刺激側の脂肪組織では M1-M 由来の一部の前炎症性因子 (IL-6 と IL-1) とともに、抗炎症性 M2-M のマーカー (IL-10, Arg-1, Mgl-1, Ym-1) が有意に増大していた。

最近、肥大化脂肪組織内に浸潤する炎症性 M1-M こそが代謝症候群におけるインスリン抵抗性の元凶とする報告が国内外で相次いでいる。上述のとおり、MS は in vitro 脂肪細胞の分化再生 (renewal) に影響するのみならず、炎症性の悪玉 M1 から抗炎症性善玉 M2 へと脂肪組織内 M の極性を切り替えることにより、代謝症候群が大きく改善される可能性がある。以上の背景に基づき、今後更

に発展させるべく、本研究を計画した。

(2) 肺動脈の MS 応答と肺高血圧症

力学刺激に対する血管の即時応答 (例: 収縮・弛緩) は、本来、生理的機能調節を担うために備わっていると考えられてきた。しかし、中・長期つづく刺激への応答は、慢性的に血行力学刺激が亢進した循環系疾患 (血管攣縮、動脈硬化、高血圧など) での病態的側面を説明する可能性がある。肺高血圧症は、全身血圧が正常なまま、肺局所血圧のみが上昇する極めて生命予後の悪い難治疾患である。申請者は、正常個体由来の肺動脈に、試験管内で過剰な力学刺激を与えて生じる応答の中に、肺高血圧症における肺動脈の機能異常に関連するものを探索し、以下の結果を得た。

(iv) 正常肺動脈への過剰な力学刺激により、末梢プロスタグランジン類に転換されない PGH₂ (以下、非転換型 PGH₂) が血管内皮から誘導され血管緊張性が亢進する。

(v) 正常肺動脈への過剰な力学刺激は、増殖因子受容体 PDGF-R の発現を増加させる。

(vi) 正常肺動脈への過剰な力学刺激による非転換型 PGH₂ の産生は、推定上の上流酵素・分泌型ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) の阻害薬により遮断、肺動脈の緊張性は解除される。

(vii) 肺高血圧ラットの病態肺動脈では、組織リモデリングに関わる PDGF-R の発現増大のみならず、力学刺激による非転換型 PGH₂ の産生量が正常時より 100 倍以上多い。

(viii) 肺高血圧ラットの病態肺動脈の収縮・緊張性異常は、その全例が sPLA₂ 阻害薬 (インドキサム) により解除され、また同阻害薬を持続投与することにより肺高血圧ラットの生存日数は著しく延長した。同病態ラットでは特定の sPLA₂ アイソザイム (group X) の発現が肺動脈で特異的に増大しており、肺動脈の MS 応答機構と協調的に働く酵素として肺高血圧の新たな治療標的になりうる事が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は病的肥満や循環系疾患等の病態形成過程における、中胚葉・間葉系組織のメカニカルストレス (MS) 応答反応の功罪に焦点をあてて、次の二つの視点から研究する。

(1) 脂肪組織での MS の作用 (善玉応答) : MS を生体の薬物感受性調節 (感作・脱感作) 因子と捉え、その分子細胞基盤と活用の具体的方法論を代謝症候群への適用例として提

示する。

(2) 肺高血圧肺動脈でのMSの作用(悪玉応答): MS 応答反応が新たな創薬・薬物治療標的になり得ることを、肺動脈性肺高血圧(PAH)における肺動脈機能異常の改善を例に実証する。

より具体的には、病的肥満ならびに難治性循環系疾患におけるMS 応答機構を標的とした細胞分化制御と疾患治療への応用の方法論確立を目指し、以下について研究を行う。

(1) 肥満マウス脂肪組織への局所的なMS 負荷による抗炎症性マクロファージ(M2-M)、間葉系幹細胞、前駆脂肪細胞の誘導を伴う脂肪組織再構築メカニズムを解明する。

(2) PAHの主病変部位である肺動脈でのMS 応答分子の過剰発現と血管機能異常の関係を明らかにし、PAHの新規治療標的として実験治療評価を行う。

3. 研究の方法

(1)-1 食餌性肥満マウスの作製: ddY 系統雄性マウスは、3週令から、暗期07:00-19:00、明期19:00-07:00の条件で高脂肪餌(HFD)(35 w/w % fat)を自由摂取させ(~15週令)、食餌性肥満を誘導した。その後、摂餌量計量への対応のため、より硬度の高い高脂肪餌(14.4 w/w%)に馴化(更に+約4週、即ち19-20週令)した後に、振動負荷実験を開始した。

(1)-2 脂肪組織への振動負荷実験: 作製した肥満マウスを無麻酔で軟ウレタンスポンジ製のネット内で拘束し、振動刺激群は片側の精巣上体周囲脂肪組織付近の直上腹部に、自作装置にて、連日の振動刺激を2週間与えた; 条件(A)、80Hz (2回/1日; 9:00-9:30 および 18:00-18:30); 条件(B)、40Hz (1回/1日; 18:00-18:30)。平行して、拘束のみの対照群を調製した。

(1)-3 血液および脂肪組織の解析: 刺激期間経過後は、一晩の絶食ののち、個体レベルの解析あるいは解剖および臓器摘出等の処置を行った。耐糖能については、腹腔内にグルコースを負荷し、尾静脈から継時的に採血して、血糖値測定装置により血中グルコース濃度を測定した。また、へパリン血漿ならびに精巣周囲脂肪組織(epididymal fat)を振動刺激同側直下(ipsilateral)と反対側(contralateral)別に取得し、血漿中の各種生化学マーカーの測定や、摘出脂肪組織の組織化学的解析、ならびに各種生化学マーカーや遺伝子発現解析についての解析を行った。

(2)-1 肺高血圧病態モデルの作製: マメ科植物由来の肺循環傷害性アルカロイド・モノクロタリン(MCT)を、ラットに単回皮下投与して3週後以降に明確な肺高血圧病態を呈する実験モデルラット(MCT-PHR)を用いた。

(2)-2 MCT-PHRへの治療的介入実験: MCT-PHRに対して、病態が完全に成立した時点(MCT投与後3週)から、被験薬物を浸透圧ミニポンプ皮下埋入法により持続的に投与し、MCTの致死的效果に対する延命作用および、肺循環組織での遺伝発現変動、炎症性細胞の動態およびアポトーシスマーカーの発現を解析した。また、MCT-PHRの摘出肺動脈組織に過剰なメカニカルストレスを発生させた際に特異的に見られる収縮機能異常(律動性収縮 rhythmic contraction、あるいは緊張性収縮 tonic contraction)に対して、被験薬物の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞の力覚感受性と薬物効果:

脂肪組織における炎症性(M1)マクロファージ(M)の浸潤は、インスリン抵抗性を惹起する脂肪組織の病的変化として、近年大変注目されている。食餌性肥満マウスの下腹部に振動刺激を連日与える実験系において、脂肪組織における脂肪細胞分化・未分化マーカーに加えて、炎症性M1-M および抗炎症性M2-M マーカーに着目して解析した。振動刺激群の脂肪組織中では、adipogenic 因子(PPAR γ 2, C/EBP α , SREBP-1c)の減少とanti-adipogenic 因子(Pref-1/DLK-1)の増加が観察され、インビトロ・メカニカルストレスによる脂肪細胞分化抑制と類似の応答をしているものと推察された。

振動刺激刺激(A)においては、拘束のみの対照群に比較して、摂餌量への影響なく、経過期間での体重減少率は僅かに大きい傾向がみられたとともに、耐糖能の改善が観察された。このとき、脂肪細胞分化マーカーの抑制が観察されたものの、組織化学的解析を通じて、脂肪細胞のサイズへの影響や未分化細胞増加の実証には至っていない。M マーカーの発現については、検討した10種類のうち、6種類のM2-M マーカーにおいて、mRNA レベルの発現増加が確認されたが、同時に13種類のうち3種類のM1-マクロファージ(M)マーカー(IL-1 β , IL-6, COX-2)の発現増大も認められた。ただし、ELISA法により、炎症性サイトカインの活性タンパクレベルを測定したところ、むしろ振動刺激を負荷した脂肪組織では、対照群に比べてIL-1 β , IL-6, TNF- α 等の活性タンパクレベルは顕著に低下していた。炎症性因子の翻訳後加工のプロセスが抑制されている可能性が考えら

れた。

振動刺激条件 (B) においては、摂餌量、体重変化には差が見られなかった一方、耐糖能異常が顕著に改善された。このとき、IL-1 β と IL-6 の発現レベルは対照群との間に差が無かった一方、IL-10 や Arg-1 等の M2-M マーカーの発現レベルは引き続き高いレベルが観察された。これらのことから、外から肥大化脂肪組織に力学刺激を与えた場合は、同組織での浸潤マクロファージの極性に影響を及ぼし、炎症 δ 抗炎症マクロファージのバランスを変動させることにより、肥大化脂肪組織の代謝内分泌機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。

(2) 肺高血圧症発症・進行過程における力学刺激の役割に関する研究

肺高血圧時には、慢性的な過度の伸展刺激が肺動脈特異的に負荷されている。メカニカルストレス過負荷病態としての視点から、肺高血圧症発症および伸展のメカニズムの解明、さらに治療標的分子の探索を目指した。

モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラット (MCT-PHR) の肺動脈で sPLA₂-X の発現が増強し、伸展刺激に対する異常な緊張性収縮が発生すること、sPLA₂ 特異的阻害薬で遮断できることについて明らかにした

(Tanabe et al., J. Pharmacol. Sci. 119: 271-281, 2012)。sPLA₂ 阻害薬が新たな肺高血圧症治療薬となる可能性を想定し、モデル動物を用いた治療実験を行った。肺高血圧を発症した MCT-PHR に sPLA₂ 阻害薬インドキサム (0.3 mg/kg/day) の持続投与を行うと、非投与群に比較し有意な生存率改善がみられた。その一方で、インドキサム投与は右心室圧上昇や右心室肥大に対しては、改善作用を示さなかった。肺高血圧症と慢性炎症には密接な関わりがあることから、肺組織における炎症性細胞 (CD11b/c 陽性細胞) の集積に関して調べた。インドキサム投与により、肺組織における CD11b/c 陽性細胞数が有意に減少していた。また、肺組織におけるアポトーシスも抑制されていた。以上のことから、sPLA₂ 阻害薬インドキサムは、肺高血圧症そのものに対する治療効果は示さないものの、付随する炎症関連反応を抑制することにより、MCT-PHR の生命予後を改善していることが示唆された。

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 4 件)

(1) Hara Y, Wakino S, Tanabe Y, Saito M, Tokuyama H, Washida N, Tatematsu S, Yoshioka

K, Homma K, Hasegawa K, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Hayashi K, Nakayama K, Ito H. Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch. *Science Signaling* 4 (Issue 157) p. ra3, 2011. (査読付)
DOI: 10.1126/scisignal.2001227

(2) Tanabe Y, Saito M, Morikawa Y, Kamataki T, Sawai T, Hirose M, Nakayama K. Inhibition of untransformed prostaglandin H₂ production and stretch-induced contraction of rabbit pulmonary arteries by indoxam, a selective secretory phospholipase A₂ inhibitor. *Journal of Pharmacological Sciences*, 115: 525-531, 2011. (査読付)
DOI: 10.1254/jphs.10247SC

(3) Nakayama K, Tanabe Y, Obara K, Ishikawa T. Mechanosensitivity of pancreatic α -cells, adipocytes, and skeletal muscle cells: the therapeutic targets of metabolic syndrome. (査読付) *Mechanosensitivity in Cells and Tissues* 6, 379-404. 2012. (査読付)
DOI 10.1007/978-94-007-5073-9_14.

(4) Tanabe Y, Saito-Tanji M, Morikawa Y, Kamataki A, Sawai T, Nakayama K. Role of secretory phospholipase A₂ in rhythmic contraction of pulmonary arteries of rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Journal of Pharmacological Sciences*, 119:271-281, 2012. (査読付)
DOI: 10.1254/jphs.12024FP

[学会発表] (計 9 件)

(1) 分泌型ホスホリパーゼ A₂ 阻害薬のモノクロタリン誘発肺高血圧症ラットに対する延命効果. 齊藤麻希, 田邊由幸, 鎌滝章央, 澤井高志, 中山貢一. 第 11 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム (東京) 2010 年 6 月 19 日

(2) 分泌型ホスホリパーゼ A₂ 阻害によるモノクロタリン肺高血圧ラット生存率の改善 齊藤麻希, 田邊由幸, 鎌滝章央, 澤井高志, 中山貢一. 第 84 回日本薬理学会年会 (東日本大震災のため誌上開催) 2011.3
Survival advantage of secretory phospholipase A₂ inhibition in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. Saito M, Tanabe Y, Kamataki A, Sawai A, Nakayama K. *Journal of Pharmacological Sciences* 115 (suppl.1), 261P, 2011.

(3) 力学刺激による脂肪細胞機能の制御機構. 田邊由幸, 齊藤麻希, 鎌滝章央, 澤井高志,

中山貢一. 日本薬学会 131 年会一般シンポジウム・メタボリックシンドロームの分子メカニズム 2011 次なる Decade に向けて (東日本大震災のため、誌上開催) 2011.

(4) モノクロタリン肺高血圧ラットに対する sPLA₂ 阻害薬インドキサムの予後改善効果
齊藤麻希、田邊由幸、鎌滝章央、澤井高志、中山貢一. 日本薬学会 131 年会 (東日本大震災のため誌上開催) 2011.3

(5) 分泌型ホスホリパーゼ A₂ 阻害薬インドキサムは肺動脈圧の低下無しにモノクロタリン誘発肺高血圧症ラットの生存期間を延長する。○齊藤麻希、田邊由幸、鎌滝章央、澤井高志、菅野美紅、中山貢一. 第 85 回日本薬理学会年会、京都、2012 年 3 月 15 日
Indoxam, a phospholipase A₂ inhibitor, prolongs survival period without lowering pulmonary arterial pressure in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Journal of Pharmacological Sciences* 118 (suppl.1), 214P, 2012.

(6) バイオメカニカルストレス反応と細胞制御：肺高血圧時肺動脈の収縮緊張性異常への関与ならびに脂肪細胞・組織における細胞分化・代謝機能制御の試み (ポスターおよび口頭) ○田邊由幸、丹治 (齊藤) 麻希、鎌滝章央、澤井高志、中山貢一.
第 6 回 先端医療薬学研究センター講演会 薬と医・歯の連携へ ～基礎から応用まで～、岩手県矢巾町、平成 24 年 3 月 16 日

(7) バイオメカニカルストレスによる脂肪細胞・組織での細胞分化・代謝機能制御の試み (一般講演、口頭) ○田邊由幸、丹治 (齊藤) 麻希、鎌滝章央、澤井高志、中山貢一.
第 13 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 「血液からの創薬を考える」2012 年 6 月 15-16 日 東京 日本薬学会会長井記念ホール

(8) 腹部振動刺激が肥満マウスの脂肪組織および代謝内分泌機能に及ぼす効果の解析 (一般講演、口頭) ○田邊由幸、丹治 (齊藤) 麻希、鎌滝章央、澤井高志、中山貢一.
第 63 回 日本薬理学会北部会、2012 年 9 月 14 日新潟市、朱鷺メッセ

(9) 分泌型ホスホリパーゼ A₂ の力学刺激による肺動脈の収縮性亢進機構への関与と実験的肺高血圧症における病態形成との関連。○丹治 (齊藤) 麻希、田邊由幸、鎌滝章央、澤井高志、中山貢一 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 22 日、福岡市、福岡国際会議場

Involvement of secretory phospholipase A₂ in the

rhythmic contraction of pulmonary arteries produced by stretching in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertensive rats and possible implication for the pathogenicity. *Journal of Pharmacological Sciences* 121 (suppl.1), 201P, 2013.

[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

田邊 由幸 (TANABE YOSHIYUKI)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：10275109

(2) 研究分担者

齊藤 麻希 (MAKI SAITO)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：40365185

(3) 連携研究者

鎌滝 章央 (AKIHISA KAMATAKI)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：60360004