

## 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 6 月 19 日現在

機関番号： 82613

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2010 ~ 2011

課題番号： 22790878

研究課題名（和文）

ピオグリタゾンの抗動脈硬化作用の *in vivo* における分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analysis of the Anti-Atherosclerosis Mechanism of Pioglitazone

研究代表者

井上 真理子 (INOUE MARIKO)

独立行政法人国立健康・栄養研究所・臨床栄養研究部 メタボリックシンドローム研究室

研究者番号： 80511477

研究成果の概要（和文）：

野生型マウスとアディポネクチン欠損マウスにチアゾリジン誘導体を投与し、カフ傷害による内膜肥厚を観察した。3週間投与では野生型のみで、8週間投与では両群で、内膜肥厚が抑制された。アディポネクチン欠損マウスでは8週間投与により内膜での炎症や血管平滑筋細胞の増殖抑制が認められたことから、チアゾリジン誘導体3週間投与では主にアディポネクチン依存性に、8週間投与ではアディポネクチン非依存性に動脈硬化を抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We assessed cuff-induced neointimal formation of the artery in both wild type and adiponectin knockout mice following pioglitazone treatment. Though significant improvement of neointimal formation was observed only in wild type mice after 3 weeks of pioglitazone treatment, it was observed in both wild type mice and adiponectin knockout mice after 8 weeks. Inflammation in neointimal formation region and proliferation of vascular smooth muscle cells were suppressed by 8 weeks treatment in adiponectin knockout mice. Thus, it is indicated that pioglitazone ameliorates neointimal formation via adiponectin-dependent pathway and adiponectin-independent pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：アディポネクチン、動脈硬化、チアゾリジン誘導体

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病治療に臨床応用されているチアゾリジン誘導体は、インスリン抵抗性作用に加えて、抗動脈硬化作用を有することが複数の大規模臨床試験で報告されている。このメカニズムの1つとして、チアゾリジン誘導体が脂肪細胞の PPAR $\gamma$  を活性化してアディポネクチンの分泌を亢進させ、この上昇したアディポネクチン自身が動脈硬化を抑制すると考えられている。しかし、動脈硬化抑制作用におけるアディポネクチンの寄与の程度は不明であり、また、チアゾリジン誘導体の抗動脈硬化作用にはこれ以外に、動脈硬化のリスクファクター軽減作用や、抗炎症作用、コレステロール逆転送促進作用など、アディポネクチン増加作用を介さないメカニズムも想定される。

## 2. 研究の目的

チアゾリジン誘導体による、抗動脈硬化作用のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

野生型マウスとアディポネクチン欠損マウスに、チアゾリジン誘導体の1つであるピオグリタゾン<sup>1</sup>を3週間および8週間、混餌投与し、以下について検討する。

①カフ傷害による内膜肥厚の検討：最初にカフ傷害誘導性の内膜肥厚について、カフ傷害2週間後に、HE染色を用いて検討する。

②内膜肥厚部分の増殖、その分子メカニズムの検討：腹腔内にBrdUを投与し、それぞれのマウスの血管平滑筋細胞の増殖能について検討する。さらに、内膜肥厚の分子メカニズムを検討するために、細胞増殖に作用し、アディポネクチンにより抑制されることが報告されているMAPK経路や、細胞増殖に関連する遺伝子群の発現を網羅的に解析する。

③内膜肥厚部分の炎症性サイトカインの検討：内膜肥厚部分の組織を抽出し、TaqmanPCRを用いて、TNF $\alpha$ 、ILファミリー、MCP-1やICAM-1などの炎症性サイトカインに関連する遺伝子群の発現を網羅的に解析する。

④動脈硬化のリスクファクターの検討：高TG血症や高LDL血症、低HDL血症は動脈硬化のリスクファクターであることが知られている。ピオグリタゾンの投与によって、これらの血清脂質などに変化が認められるか検討する。

## 4. 研究成果

まず、アディポネクチン欠損マウスを用いて、カフ障害誘導性の内膜肥厚について検討した。ピオグリタゾン非投与下では、アディポネクチン欠損マウスは野生型マウスに比し、有意なカフ傷害誘導性の内膜肥厚を認め

た。

低用量のピオグリタゾンを3週間投与すると、野生型マウスで、血中アディポネクチンは約3倍に上昇していた。このとき、野生型マウスでは、カフ傷害誘導性の内膜肥厚が有意に抑制されたが、アディポネクチン欠損マウスではこの抑制は認められなかった。このことから3週間のチアゾリジン誘導体投与によるカフ誘導性の内膜肥厚の抑制には、アディポネクチンが重要な働きをしていることが明らかとなった。

そこで、そのメカニズムを明らかにするために、まず内膜肥厚部分の血管平滑筋細胞の増殖を検討した。すると、3週間のピオグリタゾン投与にて野生型マウスで平滑筋細胞の増殖の抑制が認められたが、アディポネクチン欠損マウスでは変化を認めなかった。次にカフ誘導性の内膜肥厚部分の炎症性サイトカインについて検討したところ、アディポネクチン欠損マウスで認めたMCP-1、CCR2の発現上昇は、3週間のピオグリタゾン投与によって、完全に抑制された。さらに血中の脂質について検討したところ、アディポネクチン欠損マウスで認めた高TG血症、高遊離脂肪酸血症は、ピオグリタゾン3週間投与によって野生型マウスとほぼ同程度まで改善した。

このことから、野生型マウスにおいて、3週間のピオグリタゾン投与はアディポネクチンを介して血管平滑筋細胞の増殖を抑制することで、カフ障害誘導性の内膜肥厚の抑制することが明らかとなった。さらに、アディポネクチン欠損マウスでは、炎症性サイトカイン上昇や高中性脂肪血症、高遊離脂肪酸血症が、3週間のチアゾリジン誘導体投与によって有意に改善したものの、カフ障害誘導性の内膜肥厚は抑制されなかった。

次に、ピオグリタゾンを8週間投与して同様の検討を行った。ピオグリタゾン8週間投与後の野生型マウスの血中アディポネクチン値は、3週間投与と同様に約3倍に上昇していた。3週間投与と同様に内膜肥厚部分の血管平滑筋細胞の増殖について検討したところ、8週間のピオグリタゾン投与においては、野生型マウス、アディポネクチン欠損マウスのいずれでも平滑筋細胞の増殖が有意に抑制された。このことから8週間のピオグリタゾン投与による平滑筋細胞の増殖の抑制は、アディポネクチン非依存的であることが明らかになった。

次にカフ障害部分の炎症性サイトカインの遺伝子発現について検討したところ、アディポネクチン欠損マウスで認めたMCP-1、CCR-2、ICAM-1の発現上昇は、8週間のピオグリタゾンの投与によって完全に抑制された。さらに血中の脂質について検討したところ、アディポネクチン欠損マウスで認めた高TG血症、高遊離脂肪酸血症は、野生型マウス

とほぼ同程度まで改善していた。さらに野生型マウス、アディポネクチン欠損マウスともに血清 HDL 値が有意に上昇していた。

以上より、ピオグリタゾンにおける内膜肥厚抑制メカニズムとしては、ピオグリタゾンの短期間投与では、アディポネクチンを介して主に血管平滑筋細胞増殖を抑制し、ピオグリタゾンの長期間投与ではアディポネクチンに加えて、ピオグリタゾンは直接 risk factor、炎症性サイトカイン、血管平滑筋細胞増殖を抑制することにより、カフ誘導性の内膜肥厚を抑制す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1件)

Kubota T, Kubota N, Kumagai H\*, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T, Impaired insulin signaling in the endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by the skeletal muscle, Cell Metabolism 査読有、13 巻、2011、294-307

[学会発表] (計7件)

① 井上真理子、中枢のIRS-2 は肝臓のインスリン感受性を調節する、第26回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2012. 2. 17、名古屋

② 井上真理子、中枢のIRS-2 の糖代謝調節における役割の解明—脳特異的IRS-2 欠損マウスを用いて—、第25回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2011. 11. 5、東京

③ 井上真理子、中枢のIRS-2 の糖代謝調節における役割の解明—脳特異的IRS-2 欠損マウスを用いて—、第61回体質医学会総会、2011. 10. 9、東京

④ 井上真理子、中枢のIRS-2 の糖代謝調節における役割の解明—脳特異的IRS-2 欠損マウスを用いて—、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011. 5. 19、札幌

⑤ 井上真理子、中枢のIRS-2 の糖代謝調節における役割の解明—脳特異的IRS-2 欠損マウスを用いて—、第84回日本内分泌学会学術総会、2011. 4. 22、神戸

⑥ 井上真理子、中枢のIRS-2の糖代謝調節における役割の解明—脳特異的IRS-2欠損マウ

スを用いて—、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010. 5. 28、岡山

⑦ 井上真理子、中枢のIRS-2 の糖代謝調節における役割の解明—脳特異的IRS-2 欠損マウスを用いて—、第83回日本内分泌学会学術総会、2010. 3. 25、京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 真理子 (INOUE MARIKO)  
独立行政法人国立健康・栄養研究所 臨床栄養研究部 メタボリックシンドローム研究室 研究員

研究者番号：80511477

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：