

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591120

研究課題名(和文) 血管周囲脂肪の胎児プログラミングによる遺伝子発現調節を標的とした動脈硬化予防戦略

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy for atherosclerotic diseases by regulating developmental gene expression in perivascular adipose tissue

研究代表者

山田 浩之 (Yamada, Hiroyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00240036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化易形成マウス(apoE欠損マウス)の肥満母体より産まれたマウス仔(肥満マウス仔)の大動脈血管周囲脂肪(PAT)に注目し、胎児プログラミングによるPATの表現型変化と動脈硬化進展機序の関連を明らかにした。肥満マウス仔の動脈硬化形成は著明に増大し、肥満マウス仔より採取したPATの移植はレシピエントマウスの動脈硬化形成を有意に進展させた。肥満マウス仔のPATでは、単球・マクロファージの集積や分化・増殖に深く関与しているM-CSFの発現が亢進し、移植片におけるマクロファージの浸潤、炎症性サイトカインの発現亢進に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Maternal obesity elicits metabolic disorders of offspring via epigenetic remodeling of visceral adipose tissue; however, its effect on atherogenesis remains undefined. Here we examined phenotypic alterations in offspring adipose tissue by maternal high-fat diet and investigated their roles in atherosclerosis development. Maternal high-fat diet accelerated atherosclerosis development in adult offspring, in which thoracic periaortic adipose tissue-specific exaggerated accumulation of macrophages and subsequent increase in proinflammatory cytokines expression were involved substantially. Thoracic periaortic adipose tissue specific increased expression of macrophage colony stimulating factor during early development is likely to initiate an inflammatory response by promoting the migration or differentiation/proliferation of monocytes. These data provide a unique opportunity to develop the therapeutic strategy in the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease.

研究分野：内科学

キーワード：動脈硬化 胎児プログラミング 血管周囲脂肪 マクロファージ 炎症

1. 研究開始当初の背景

胎生期の栄養状態は出生児が成人になってからも、その摂食行動やエネルギー代謝に影響を及ぼし、肥満症や2型糖尿病の罹患率を高めることが知られている。昨今の著しい肥満人口増加に伴い、母体肥満症における胎児内臓白色脂肪のエピジェネティックな遺伝子発現修飾は、成人期における生活習慣病の新たな治療標的として注目されているが、動脈硬化形成や血管リモデリングと密接に関連する血管周囲脂肪組織のエピゲノム研究は殆ど報告されていない。

2. 研究の目的

胎児プログラミングによる血管周囲脂肪前駆細胞の分化・増殖制御のメカニズムを解明し、動脈硬化形成機序との関連性を遺伝子改変動物を用いた個体レベルで明らかにするとともに、心血管病発症予防における新たな治療標的を同定することである。

3. 研究の方法

肥満母体由来マウス仔(肥満マウス仔)の作製および動脈硬化の解析  
8週齢の雌アポE欠損マウスに高脂肪食を2か月間投与し、肥満マウスモデルを作成する。肥満マウスより生まれた仔マウスを離乳後4週間は標準食で飼育した後、8週齢から高コレステロール食を12週間投与し20週齢時における動脈硬化形成を解析する。

肥満マウス仔の血管周囲脂肪組織の表現型解析

8週齢および20週齢における肥満マウス仔の血管周囲脂肪組織、精巣上体周囲脂肪組織を採取し、脂肪細胞分化関連マーカー(PPAR、C/EBP、FABP4、アディポネクチン)白色脂肪マーカー(FSP27、Tcf21、Hoxc9、Igf1bp3、DPT)、褐色脂肪マーカー(PRDM16、Meox2、Lhx8、Cidea、UCP-1)およびRA系コンポーネント(AGT、レニン、ACE、ACE2、AT1、AT2)の発現レベルをRT-PCR法および免疫染色法にて比較検討する。さらに、脂肪細胞のエネルギー代謝に関連する遺伝子(fatty acid synthase: FAS、GPDH、lipoprotein lipase: LPL、hormone-sensitive lipoprotein lipase: LPL、adipose triglyceride lipase: ATGL)の発現を両群間で比較する。

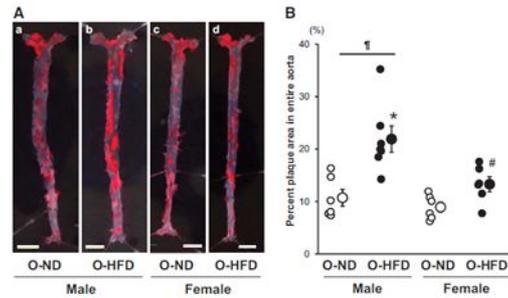
脂肪移植モデルを用いた血管周囲脂肪組織による動脈硬化進展機序の解明

高コレステロール食を与えた標準マウス仔および肥満マウス仔の胸部大動脈周囲脂肪組織を採取し、apoE-KOマウスの腹部大動脈周囲に移植する。12週後に大動脈の動脈硬化形成を評価する。また、脂肪組織内における炎症性細胞の浸潤および各種サイトカイン、ケモカインの発現を評価する。

肥満マウス仔の血管周囲脂肪組織に特異的な炎症性細胞集積の機序の解明

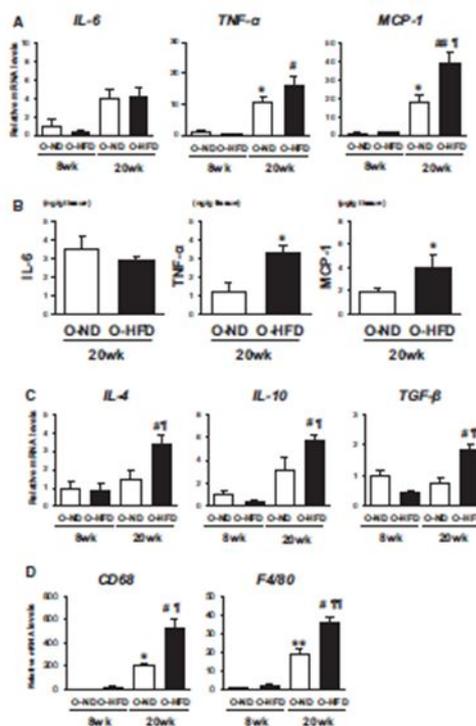
4. 研究成果

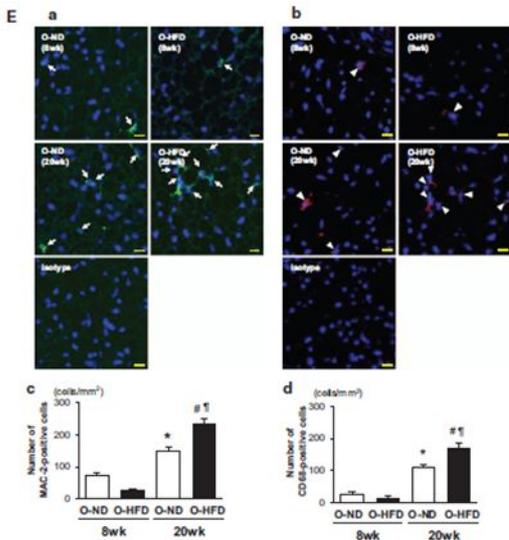
肥満母体由来マウス仔(肥満マウス仔)の作製および動脈硬化の解析  
雄肥満マウス仔の動脈硬化形成は対照マウスに比べ有意に増大していた(210%, P<0.01)。雌肥満マウス仔においても有意な動脈硬化形成の増大を認めしたが、雄マウス仔に比べてその程度は有意に減弱していた。血行動態指標(血圧、脈拍)および脂質プロフィールは両群間で同等であった。



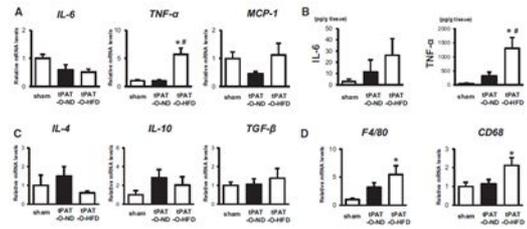
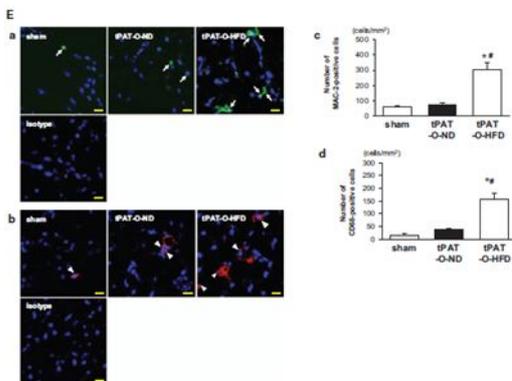
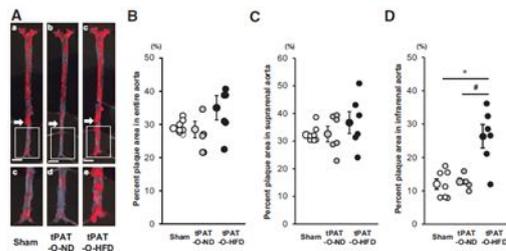
肥満マウス仔の血管周囲脂肪組織の表現型解析

肥満マウス仔の胸部大動脈周囲脂肪組織における各種サイトカイン、単球・マクロファージマーカーの発現レベルをreal-time PCR法を用いて解析した。肥満マウス仔の血管周囲脂肪組織では、単球・マクロファージの集積が対照マウスに比べて有意に増大し、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、MCP-1)の遺伝子およびタンパク発現レベルが増大していた。こうした変化は、肥満マウス仔の内臓脂肪組織においては認められないことより、血管周囲脂肪組織に特異的な変化と考えられた。

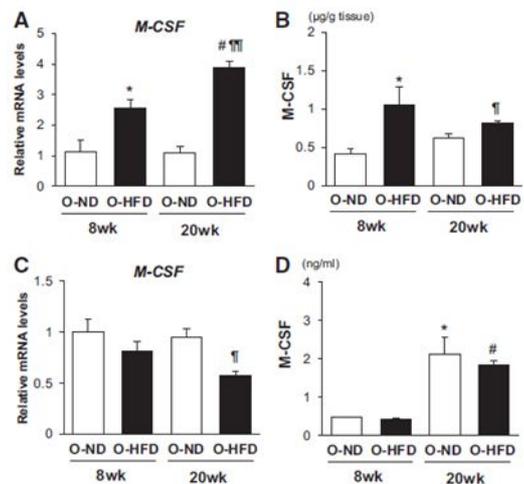




脂肪移植モデルを用いた血管周囲脂肪組織による動脈硬化進展機序の解明  
 炎症性サイトカインの血中濃度は両群で同等であったため、血管周囲脂肪組織に特異的な炎症性変化がパラクリン作用を介して隣接する血管に直接作用している可能性が考えられた。そこで、肥満マウス仔の胸部大動脈周囲脂肪組織を採取し、レシピエントマウスの腹部大動脈周囲に移植し、その後の動脈硬化形成を検討した。肥満マウス仔の血管周囲脂肪組織を移植したマウスでは、移植部位における動脈硬化形成が有意に増大し、移植グラフトにおける炎症性サイトカインの発現およびマクロファージの集積が有意に増大していた。



肥満マウス仔の血管周囲脂肪組織に特異的な炎症性細胞集積の機序の解明  
 血管周囲脂肪組織に特異的な炎症性変化の原因として、単球・マクロファージの集積、分化、増殖に深く関与する M-CSF に着目した。高コレステロール食開始前より肥満マウス仔の血管周囲脂肪組織では M-CSF の遺伝子およびタンパク発現レベルが亢進していた。精巢周囲内臓脂肪における M-CSF の発現は両群間で同等であった。血中 M-CSF 濃度は両群共に高コレステロール食投与後に増加したが、両群間において同等であった。



肥満母体マウスから産まれた出生仔の動脈硬化進展機序における血管周囲脂肪組織の役割に注目し、1) 血管周囲脂肪組織が内臓白色脂肪と異なる形質を発現していること。2) 肥満母体由来マウス仔の血管周囲脂肪組織において Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) の発現が有意に亢進しており、マクロファージ集積増大を伴う炎症性形質変化がマウス仔の成体期における動脈硬化形成に深く関与していることを世界で初めて報告した (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015)。さらに、同モデルマウスの骨髄細胞を用いたコロニーアッセイでは、マクロファージに分化するコロニー数が特異的かつ有意に増加していることを確認している (未発表データ)。このことは、母体肥満症が胎児プログラミングを介して骨髄単球系細胞の遺伝子発現修飾を引き起こし、骨髄単球系細胞の分化・増殖機構に影響を及ぼす可能性を示唆している。胎児プログラミングによる内臓脂肪組織の形質変化が生活習慣

病発症機序の一つとしてこれまで報告されているが、胎生期の骨髄単球系細胞の分化・増殖機構においてもエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が存在し、成人期における生活習慣病発症機序に関与していることが推察される。胎児プログラミングによる骨髄単球系細胞の分化・増殖機構の解明、その制御に関与している分子の同定は、生活習慣病の基盤病態である慢性炎症を制御する点からも新たな先制医療の構築に繋がるものと期待できる。

#### 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5件)

1. Wakana N, Irie D, Kikai M, Terada K, Yamamoto K, Kawahito H, Kato T, Ogata T, Ueyama T, Matoba S, Yamada H. Maternal high-fat diet exaggerates atherosclerosis in adult offspring by augmenting periaortic adipose tissue-specific proinflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:558-569. 査読有
2. Kato T, Kawahito H, Kishida S, Irie D, Wakana N, Kikai M, Takata H, Ogata T, Ueyama T, Matoba S, Yamada H. Bone marrow angiotensin AT2 receptor deficiency aggravates atherosclerosis development by eliminating macrophage liver X receptor-mediated anti-atherogenic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. published online 2014 Dec 8. DOI: 10.1177/1470320314561138. 査読有
3. Irie D, Kawahito H, Wakana N, Kato T, Kishida S, Kikai M, Ogata T, Ikeda K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H. Transplantation of periaortic adipose tissue from angiotensin receptor blocker-treated mice markedly ameliorates atherosclerosis development in apoE<sup>-/-</sup> mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2014;16:67-78. 査読有
4. Kawahito H, Yamada H, Irie D, Kato T, Akakabe Y, Kishida S, Takata H, Wakana N, Ogata T, Ikeda K, Ueyama T, Matoba S, Mori Y, Matsubara H. Periaortic adipose tissue-specific activation of the renin-angiotensin system contributes to atherosclerosis development in uninephrectomized apoE<sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Heart Circ*

*Physiol*. 2013;305:H667-675. 査読有

5. Takata H, Yamada H, Kawahito H, Kishida S, Irie D, Kato T, Wakana N, Miyagawa S, Fukui K, Matsubara H. Vascular Angiotensin II Type 2 Receptor Attenuates Atherosclerosis via a Kinin/NO-Dependent Mechanism. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. published online 2013 June 4. DOI: 10.1177/1470320313491794. 査読有

[学会発表](計7件)

1. Wakana N, Irie D, Kikai M, Terada K, Yamamoto Y, Kato T, Kawahito H, Yamada H. Maternal high-fat diet exaggerates atherosclerosis development in adult offspring by augmenting periaortic adipose tissue-specific proinflammatory response. American Heart Association (米国心臓病学会) 2014 Nov16-19, Chicago, USA
2. Kikai M, Wakana N, Irie D, Yamamoto K, Terada K, Yamada H. Brown adipose tissue transplantation inhibits atherosclerosis development in recipient apoE deficient mice without affecting glucose homeostasis. American Heart Association (米国心臓病学会) 2014 Nov16-19, Chicago, USA
3. Irie D, Wakana N, Kikai M, Kato T, Kishida S, Kawahito H, Yamada H. Transplantation of high-cholesterol diet-induced inflammatory periaortic adipose tissue exaggerates atherosclerosis development in recipient apoE deficient mice. American Heart Association (米国心臓病学会) 2013 Nov17-20, Dallas, USA
4. Wakana N, Irie D, Kikai M, Kato T, Kawahito H, Kishida S, Fukui K, Yamada H. Maternal high-fat diet exaggerates atherosclerosis development in adult offspring by augmenting macrophage proinflammatory response in periaortic adipose tissue. American Heart Association (米国心臓病学会) 2013 Nov17-20, Dallas, USA
5. Yamada H, Irie D, Kato T, Kawahito H, Kishida S, Ikeda K, Okigaki M, Matsubara H. Impaired periaortic adipocyte differentiation in angiotensin AT1 receptor deficient

mice: Possible role in pro-inflammatory phenotypic modulation of perivascular adipose tissue. ESC Congress (欧州心臓病学会 会議) 2012 August25-29, Munich, Germany

6. Irie D, Yamada H, Kato T, Kawahito H, Kishida S, Wakana N, Kensuke Fukui, Kouji Ikeda, Mitsuhiro Okigaki, Hiroaki Matsubara. Periaortic adipose tissue-specific activation of renin angiotensin system along with the adipocytes differentiation contributes to atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice. American Heart Association (米国心臓病学会 会議) 2012 Nov4-7, Los Angeles, USA
7. Irie D, Yamada H, Kato T, Kawahito H, Kishida S, Wakana N, Kensuke Fukui, Kouji Ikeda, Mitsuhiro Okigaki, Hiroaki Matsubara. Periaortic adipose tissue-specific activation of renin angiotensin system along with the adipocytes differentiation contributes to atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice. International Society for Heart Research Japanese Section. 2012 Oct26-27, Fukuoka, JAPAN

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山田 浩之 (Yamada Hiroyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 00240036