

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461396

研究課題名(和文)生活習慣病発症における血管内皮レプチン抵抗性の役割

研究課題名(英文)The role of endothelial leptin receptor in lifestyle-related diseases.

## 研究代表者

神田 武志 (KANDA, Takeshi)

慶應義塾大学・保健管理センター・講師

研究者番号：80317114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：レプチンは体重調節の主要なホルモンであり、食餌摂取低下、褐色脂肪組織(BAT)で代謝亢進させ脂肪量を減少させる。近年内皮細胞の臓器多様性がTG吸収に関与することが報告されており、内皮レプチン受容体の役割について検討した。3H-trioleinを経口投与した所、ob/obマウスにレプチンを投与するとWATへのTGの吸収が抑制され、BATへの吸収が回復した。また、レプチンにより低下したWATにおけるTGの吸収が内皮特異的レプチン受容体マウスで増加し、逆にBATでは減弱した。以上よりレプチンは内皮レプチンシグナルを介して、WATからBATにTG吸収を移行させて抗肥満作用の一部を呈すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a major contributor of lifestyle-related diseases. The key hormone that regulates body weight is leptin, which is secreted mainly by white adipocytes and decreases adiposity by both reducing food intake and increase in energy expenditure through brown adipocyte activation. To examine the direct effect of leptin, we studied ob/ob mouse. We performed labeled oral fat load test mixed with 3H-triolein. Leptin decreased RI uptake in inguinal and epididymal white adipose tissue (WAT) and leptin increased RI uptake in brown adipose tissue (BAT). Endothelial cell is known to be leptin target organs and plays an important role in lipid uptake and obesity. We investigated the role of endothelial leptin signaling by using endothelial leptin receptor KO mouse (EC-ObR KO). The net uptake of labeled FFA was decreased in BAT in EC-ObR KO. These data suggest that leptin inhibits lipid uptake through endothelial Ob-R and endothelial cells shift fat distribution toward brown adipose tissue.

研究分野：内分泌

キーワード：レプチン 内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (Mets) は肥満症を基盤として耐糖能異常、高中性脂肪血症、低 HDL 血症、高血圧が集積し動脈硬化の高リスク群を形成することから、その病態解明は心血管イベントを阻止する上で極めて重要である。Mets では耐糖能異常・脂質代謝異常を介して血管内皮障害が引き起こされ、血管拡張不全や接着分子発現亢進により動脈硬化の発症に寄与すると従来は考えられてきた。しかし、申請者らは脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR を血管内皮細胞特異的に欠損させると CD36、aP2 等の遺伝子発現低下を介して遊離脂肪酸 (FFA) の取り込みやリポ蛋白リパーゼ (LPL) の作用が減弱し、乳び血清・著明な高中性脂肪血症をきたすことを報告した。更に内皮細胞は FFA 取り込みのゲートキーパーとして働き、その障害は高血圧の発症のみならず、脂質異常症を惹起し、脂肪重量を調節することを明らかにした (Kanda et al. J Clin Invest. 2009)。しかし、肥満症・Mets 進展において血管内皮細胞がどのような役割を果たしているかは不明であった。レプチンは脂肪細胞由来のアディポサイトカインで、その血中濃度は体脂肪の増加に比例し、体内の脂肪含有量を各臓器に伝える働きがある。主に視床下部のレプチン受容体 (LEP-R) を介して摂食抑制やエネルギー代謝を亢進させ体重、特に体脂肪量を減少させる。肥満患者では血中レプチン濃度は上昇しているもののレプチンを投与しても減量効果が得られないことから、肥満症の原因としてレプチンの作用不足 (=レプチン抵抗性) が存在すると推定されている。一方レプチンは交感神経を活性化して高血圧を惹起する (J Clin Invest. 2000)。肥満においては高レプチン血症により血圧が上昇し代謝における抗肥満作用が減弱しているため (選択的レプチン抵抗性) Mets の発症に寄与すると考えられる。レプチンシグナルが阻害される ob/ob マウスや db/db マウスでは脂肪組織においては FFA の取り込みが増加し、脂肪細胞が肥大することが報告されていることから (JBC. 1999) 中枢のみならず末梢のレプチン抵抗性は肥満症の成因に重要な役割を果たす (PNAS. 2005)。肥満組織には豊富な血管網が存在し、内皮細胞においても LEP-R は発現していることから脂肪細胞から分泌されたレプチンの内皮細胞に対するパラクライン作用が想定されている (Diabetes. 2000)。しかし、代謝特に肥満症における内皮レプチンシグナルの意義は明らかではない。

肥満は動脈硬化のリスク因子であるのみならず、慢性腎臓病のリスク因子でもある。アルブミン尿が出現すると末期腎不全及び動脈硬化のリスクが上昇する。ステノ仮説では、肥満、糖尿病におけるアルブミン尿は全身の血管内皮障害における腎臓の表現型を反映しているとされる (Diabetologia 1998)。

全身の血管内皮障害により NO 産生が低下し、その結果、心血管イベントが増加し、腎臓では糸球体内血管内皮障害による NO 産生の低下や、podocyte 障害からアルブミン尿が増加すると推定されているが、その正確な機序に関しては不明である。近年内皮細胞、ポドサイトの両者から VEGF 等が分泌され糸球体障壁の恒常性維持されており、その破綻がアルブミン尿の増加に寄与することが知られるようになった。腎障害におけるレプチンの報告では肥満腎症患者の腎生検サンプルと比較した検討により糸球体において脂質に関する遺伝子の増加、レプチン受容体の遺伝子発現が約 2.16 倍増加することが報告されている (Endocrinology 2006)。レプチンは肥満患者のみならず慢性腎不全患者で血中濃度が増加する。腎血管内皮細胞にもレプチン受容体が発現している。又、レプチン受容体を欠損したズッカーラットや db/db マウスでは蛋白尿の増加、糸球体肥大が生じるが、レプチンの直接作用か、脂質異常症、糖尿病による腎障害か不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では以下のレプチンの作用について内皮レプチンシグナルが関与するか否かを検討した。

脂質代謝調節：脂肪細胞肥大に伴って分泌されたレプチンが、周囲の血管内皮細胞に作用し脂肪組織内への FFA・TG の取り込みを減少させる機序させるか否か。更にその機序について検討した。

更に肥満、糖尿病におけるアルブミン尿の出現に腎血管内皮障害の関与が推定されているがその機序は不明であった。内皮細胞におけるレプチンシグナルの腎機能障害における役割を検討した。

## 3. 研究の方法

我々はレプチン受容体 floxed マウスと Cadherin Cre マウスを交配し、Cre/loxP システムを用いて血管内皮細胞特異的にレプチン受容体を欠損させたマウスを作製した。

### 脂質調節モデル

高脂肪食肥満マウス (20 週負荷) db/db マウス (レプチン受容体異常マウス、5 週齢)、ob/ob マウス (レプチン欠損マウス、5 週齢) を使用した。4 時間の禁食後、olive oil 10ul/gBW を投与し、投与前後の血中脂質を測定した。RI 標識された triolein を経口投与し、脂質の組織分布を測定した。

内皮特異的レプチン受容体欠損マウスとコントロールマウスに同様に経口脂質負荷試験を行った。

### 血管透過性検査

Olive oil 負荷後 2 時間後に Evans Blue (50mg/ml) を投与し、1 時間後に臓器別の血管透過性を測定した。

コントロールマウス及び内皮特異的レプチン受容体欠損マウスの心臓及び白色脂肪組織より微小血管内皮細胞を分離し、遺伝子発

現、FFA 取り込み、血管透過性に関して検討を行った。

#### 腎障害モデル

野生型マウスにレプチンを 0.5 µg/BW 腹腔内に単回投与し、2 時間後の腎臓における STAT3-P の染色を行った。

内皮特異的レプチン受容体欠損マウスに 45% 高脂肪食を 24 週負荷し、尿 alb、尿 Cr、病理を検討した。

コントロールマウス及び内皮特異的レプチン受容体欠損マウスの心臓より微小血管内皮細胞を分離し、遺伝子発現を検討した。

#### 4. 研究成果

RI 標識された 3H-triolein を経口投与した所、ob/-マウスに比較し ob/ob マウスでは白色脂肪組織 (WAT) において TG の吸収が増加し褐色脂肪組織 (BAT) において減弱した。ob/ob マウスにレプチンを投与すると WAT への TG の吸収が抑制され、BAT への吸収が回復した。次に内皮特異的レプチン受容体欠損マウスについて解析した。内皮細胞におけるレプチン受容体の遺伝子発現量は 90% 以上低下していることを確認した。また、白色脂肪細胞、骨格筋でのレプチン受容体の低下は認めなかった。レプチンにより低下した WAT における TG の吸収が内皮特異的レプチン受容体欠損マウスで増加し、逆に BAT では減弱した。レプチン受容体欠損内皮細胞では GPIHBP1、CD36 など TG 吸収に関わる遺伝子発現が増加しており、WAT における内皮特異的レプチン受容体欠損マウスの TG 吸収増加所見と一致した。又、BAT における TG 吸収は血管透過性の増加が関与する。ob/ob マウスでは BAT における TG 吸収低下に一致して血管透過性が低下していたが、レプチン投与により改善した。また対照マウスに比較し内皮特異的レプチン受容体欠損マウスでは血管透過性は有意に低下しており、レプチン受容体欠損内皮細胞では VEGF 受容体等の血管透過性に関する遺伝子発現並びに血管透過性の有意な低下を認めた。以上よりレプチンは臓器特異的な内皮レプチンシグナルを介して、WAT から BAT に TG 吸収を移行させて抗肥満作用を呈すると考えられた。

次に腎障害のモデルについて検討を行った。レプチンは長鎖型のレプチン受容体 ObRb の Tyr1138 リン酸化を誘導し STAT3 を活性化することが知られている。そこでレプチンを腹腔内投与 2 時間後、sacrifice し、リン酸化 STAT3 抗体で染色を行った。糸球体を中心に染色されることが確認され、レプチンは糸球体に主に作用していると考えられた。そこで、血管内皮細胞特異的レプチン受容体欠損マウスとコントロールマウスに高脂肪食負荷を行った。高脂肪負荷による腎組織の変化に関しては糸球体面積はコントロールマウス (WT マウス) で  $3269 \pm 129 \mu\text{m}^2$ 、内皮特異的レプチン受容体欠損マウスで  $2874 \pm 110 \mu\text{m}^2$  と内皮特異的レプチン受容体欠損マウスで

は脂肪食負荷による糸球体肥大が抑制された。masson's trichrome 染色の検討により糸球体内の線維化は内皮特異的レプチン受容体欠損マウスで有意に抑制された。尿アルブミンはコントロールマウス  $656 \pm 0.052\text{g/Cr}$ 、内皮特異的レプチン受容体欠損マウス  $0.453 \pm 0.064\text{g/Cr}$  と内皮特異的レプチン受容体欠損マウスで低値であった。またレプチン下流遺伝子である TGF-1、PAI-1 の発現量が内皮特異的レプチン受容体欠損マウスの内皮細胞では抑制された。以上より内皮レプチンシグナルの欠損は TGF-1、PAI-1 の遺伝子発現の抑制を介して高脂肪食誘導肥満において腎保護的に作用すると考えられた。

#### 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 1 件)

【肥満と腎臓】肥満に関連する病態と腎障害 血管内皮細胞機能異常と腎障害 査読なし

神田 武志

東京医学社 腎と透析 78 巻 4 号 180 Page537-540

〔学会発表〕(計 2 件)

血管内皮レプチン受容体の脂質吸収における役割

浦井秀徳, 神田武志, 林香, 河邊博史, 脇野修, 伊藤裕

2015 年 12 月 11 日心血管内分泌学会 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

血管内皮レプチン受容体の肥満腎症における役割

浦井秀徳, 神田武志, 脇野修, 小松素明, 林晃一, 伊藤裕

2015 年 6 月 5 日腎臓学会 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

神田 武志 (KANDA, Takeshi)  
慶應義塾大学・保健管理センター・講師  
研究者番号：80317114

(2)研究分担者

小松 素明 (KOMATSU, Motoaki)  
慶應義塾大学・医学部腎臓内分泌代謝科・助教  
研究者番号：70528687

(3)連携研究者

伊藤 裕 (ITO, Hiroshi)  
慶應義塾大学・医学部腎臓内分泌代謝科・教授  
研究者番号：40252457

脇野 修 (WAKINO, Shu)  
慶應義塾大学・医学部腎臓内分泌代謝科・准教授  
研究者番号：50265823