

「血管内皮-成熟脂肪細胞ネットワークによる脂肪組織恒常性維持機構の解明」
神戸薬科大学 臨床薬学研究室 池田 宏二

1 研究の背景と目的

脂肪組織は骨格筋に匹敵する血管網を有しており、全身の中でも特に血管密度の高い臓器の一つである。肥満初期には脂肪細胞の肥大に伴って脂肪組織の血管新生が亢進し、一定の血管密度が維持されるが、肥満の進展に伴い脂肪組織の血管密度は低下し、相対的虚血に陥る。その結果、脂肪細胞が低酸素状態に晒されることが、脂肪組織の機能異常を引き起こす大きな要因であると考えられている。しかしながら、脂肪組織の血管新生制御機構には不明な点が多い。また血管新生を制御する血管内皮細胞は様々な因子を分泌して各種臓器の恒常性維持にも関わること（アンジオクライン）が知られているが、脂肪組織におけるアンジオクラインの存在・役割はほぼ未解明である。私達は脂肪組織において血管内皮-成熟脂肪細胞ネットワークが存在し、脂肪組織の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えた。本研究課題では未知の血管内皮-成熟脂肪細胞ネットワークの存在とその概要を明らかとし、脂肪細胞機能調節の新しい分子機構を解明する。更に、本ネットワークの破綻が肥満に伴う脂肪機能不全の原因となることを明らかとし、肥満・メタボリック症候群に対する新規の治療標的を提供することを目的とする。

2 研究方法・研究内容

私達は成熟脂肪細胞で高い発現を示し、その発現が血管内皮細胞によって制御されている遺伝子の探索を DNA マイクロアレイ法により行った。その結果、興味深い新規分子を発見した (Nrg4)。Nrg4 は成熟脂肪細胞に多く存在し、その発現は血管内皮細胞によって負に調節されていた。

本研究課題では以下の研究手法により Nrg4 を介した血管内皮細胞-成熟脂肪細胞ネットワークとその役割を明らかとする

① Nrg4 による血管内皮機能調節の検討

- ・リコンビナント Nrg4 蛋白でヒト微小血管内皮細胞を刺激し、Akt や ERK などの細胞内シグナル伝達分子の活性化を検討する。
- ・ヒト微小血管内皮細胞のアポトーシス、遊走能、増殖能、マトリゲル上での管腔形成能をリコンビナント Nrg4 蛋白の存在下・非存在下で検討し、Nrg4 の血管新生能に対する効果を *in vitro* で解析する

② Nrg4 の脂肪機能恒常性維持における役割の検討

Nrg4 を欠損する Nrg4 ノックアウトマウスに通常食を与えて、6 週齢から 18 週齢まで毎週体重を測定し、野生型と比較する。

- ・野生型・Nrg4-KO マウスを用いて糖負荷テスト、インスリン負荷テストを行い、これらマウスの耐糖能、インスリン感受性を評価する。
- ・野生型・Nrg4-KO マウスを用いて呼吸商、酸素消費量、体脂肪率、活動量を測定し、エネルギー代謝の変化を解析する。
- ・野生型・Nrg4-KO マウスの直腸温を測定する。さらに寒冷条件下で直腸温の変化を経時的に測定することでこれらマウスの熱産生能を比較検討する。
- ・野生型・Nrg4-KO マウスより白色脂肪・褐色脂肪を摘出し、切片を作成の上、微小血管を

isolectin で染色して脂肪血管密度を比較検討する。

- ・摘出した脂肪組織から RNA および蛋白を抽出し、Real-time PCR 法や Western blot 法にて白色脂肪の炎症マーカーおよび各種アディポカイン、褐色脂肪の uncoupling protein (UCPs)、PPARs および脂肪酸酸化酵素群の発現を比較検討する。

3 研究成果

Nrg4 は成熟脂肪細胞で非常に多く発現しているのに対して、その受容体である ErbB4 は脂肪細胞にはほとんど発現しておらず、血管内皮細胞で高い発現を示すことがわかった (図 1a および 1b)。またリコンビナント Nrg4 でヒト微小血管内皮細胞を刺激したところ、Akt および ERK の細胞内シグナル伝達分子の活性化が誘導され、この活性化は ErbB4 阻害により消失した (図 1c)。さらに Nrg4 は血管内皮細胞の増殖能・管空形成能を亢進させ、内皮アポトーシスを抑制することがわかった (図 1d-f)。さらにマトリゲルプラグアッセイによる *in vivo* 血管新生の解析でも Nrg4 は血管新生を増強させることが明らかとなった (図 1g)。以上の結果から成熟脂肪細胞が分泌する Nrg4 は paracrine 的に血管内皮細胞に作用し、血管新生を誘導することが明らかとなった。

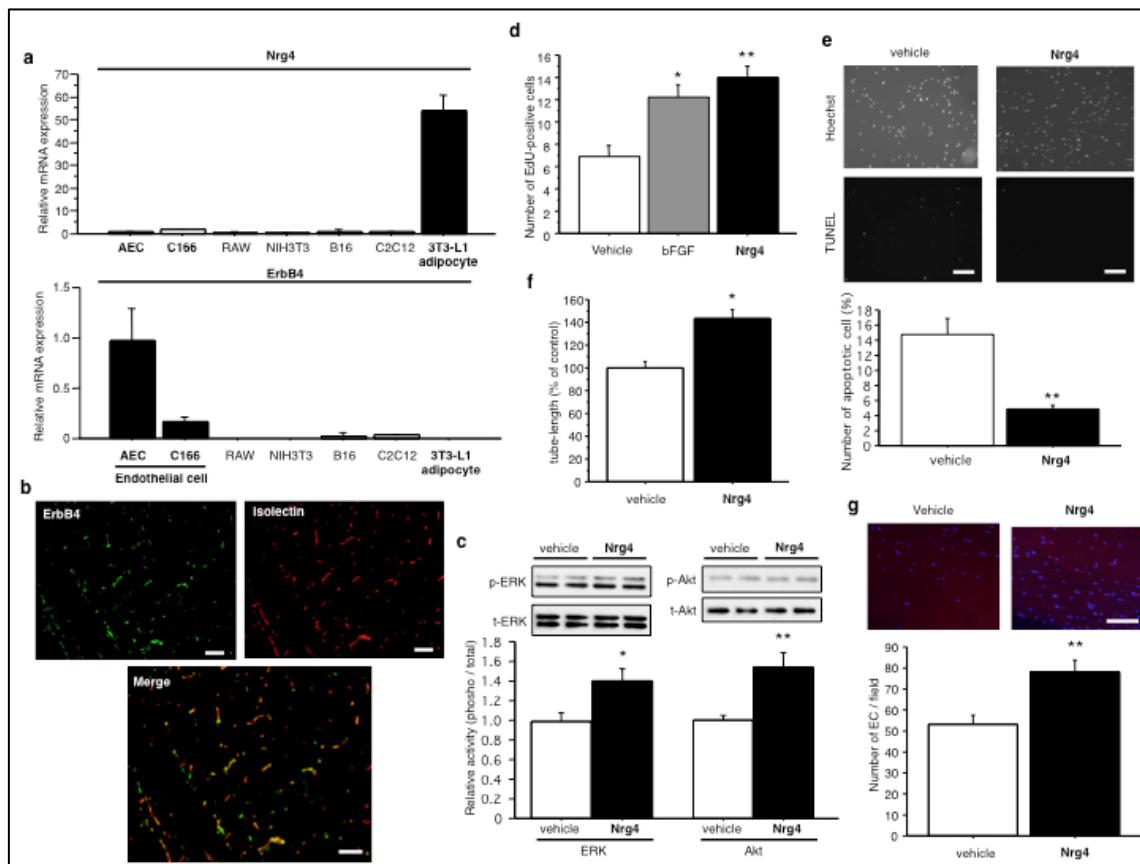


図 1. a) 様々な細胞における Nrg4 および ErbB4 の発現。b) 白色脂肪における ErbB4 の免疫組織染色。c) Nrg4 刺激による血管内皮 Akt, ERK シグナルの活性化。d-f) Nrg4 による血管内皮細胞の増殖 (d)、アポトーシス (e)、管腔系性能 (f) への作用。g) マトリゲルプラグアッセイ。

次に Nrg4 を介した血管内皮—成熟脂肪ネットワークの破綻が全身の代謝にどのような影響を与えるかを検討するため、私達は Nrg4 ノックアウトマウスを作出した。高脂肪食を与えて

肥満を誘導したところ Nrg4-KO マウスは野生型マウスと同程度の食事摂取であるにも関わらず著しい体重増加を示し、Nrg4-KO マウスは肥満しやすいことがわかった（図 2a-c）。そこでこれらマウスのエネルギー消費量を検討したところ Nrg4-KO マウスではエネルギー消費量が著明に減少しており、また呼吸商が増加していることが明らかとなった（図 2d および 2e）。脂肪酸酸化によるエネルギーを熱に変換する臓器である褐色脂肪は最もエネルギー消費量が多い臓器であり、その熱産生能は血管密度と密接に関わっている。Nrg4 は白色脂肪だけでなく、褐色脂肪でも多く発現しているため、私達は褐色脂肪の血管密度を検討した。その結果、Nrg4-KO マウスでは褐色脂肪の血管密度が有意に低下しており、また褐色脂肪における熱産生および脂肪酸酸化関連遺伝子群の発現が総じて低下し、加えて深部体温も低下していることがわかった（図 2f-h）。

更に私達は、高脂肪食を与えた Nrg4-KO マウスでは肥満によるインスリン抵抗性が増悪することを見出し、その中心的なメカニズムとして白色脂肪の低酸素状態および慢性炎症の増悪が考えられた（図 3a-f）。以上のデータから Nrg4 を介した血管内皮—成熟脂肪ネットワークの破綻は脂肪血管新生の減少を招き、その結果、肥満および肥満関連代謝異常が進展・増悪することが明らかとなった。

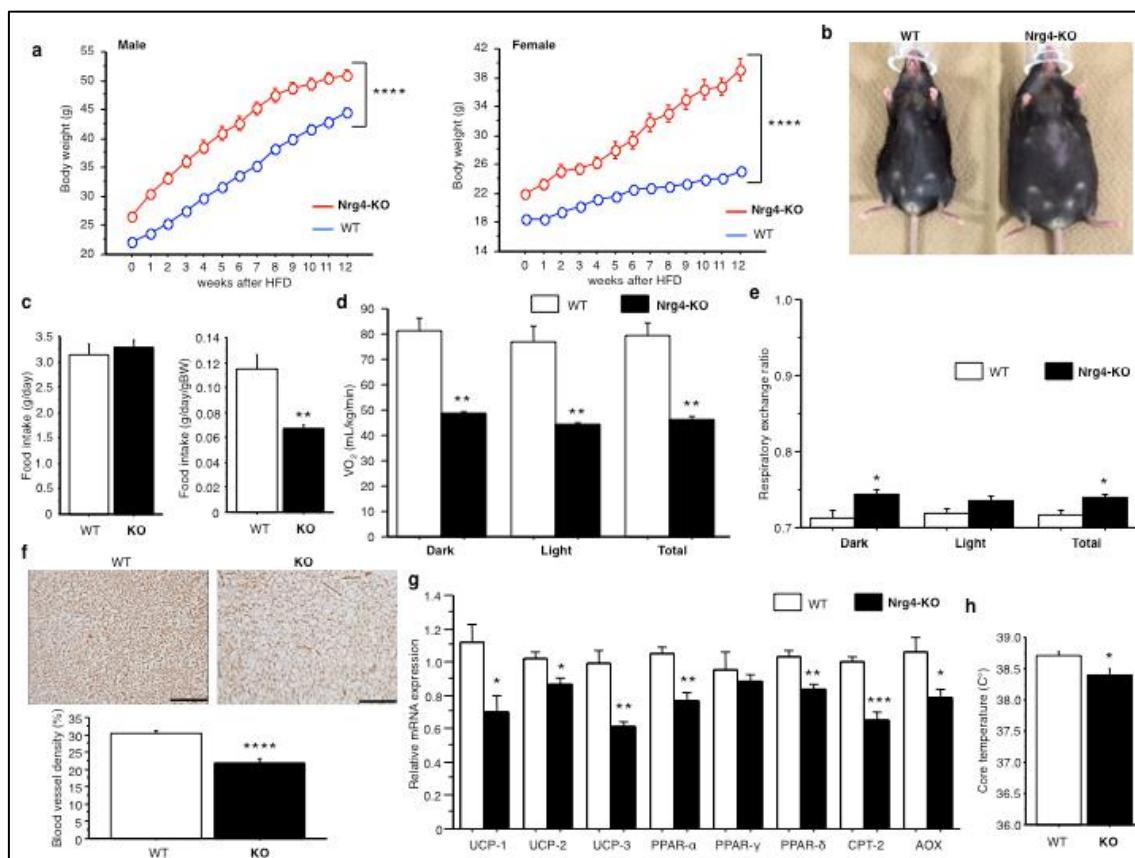


図 2. a) 高脂肪食を与えた野生型および Nrg4-KO マウスの体重。b) 高脂肪食を与えた野生型および Nrg4-KO マウスの写真。c) 食事摂取量。d) エネルギー消費量。e) 呼吸商。f) 褐色脂肪の血管密度。g) 褐色脂肪における遺伝子発現。h) 深部体温。

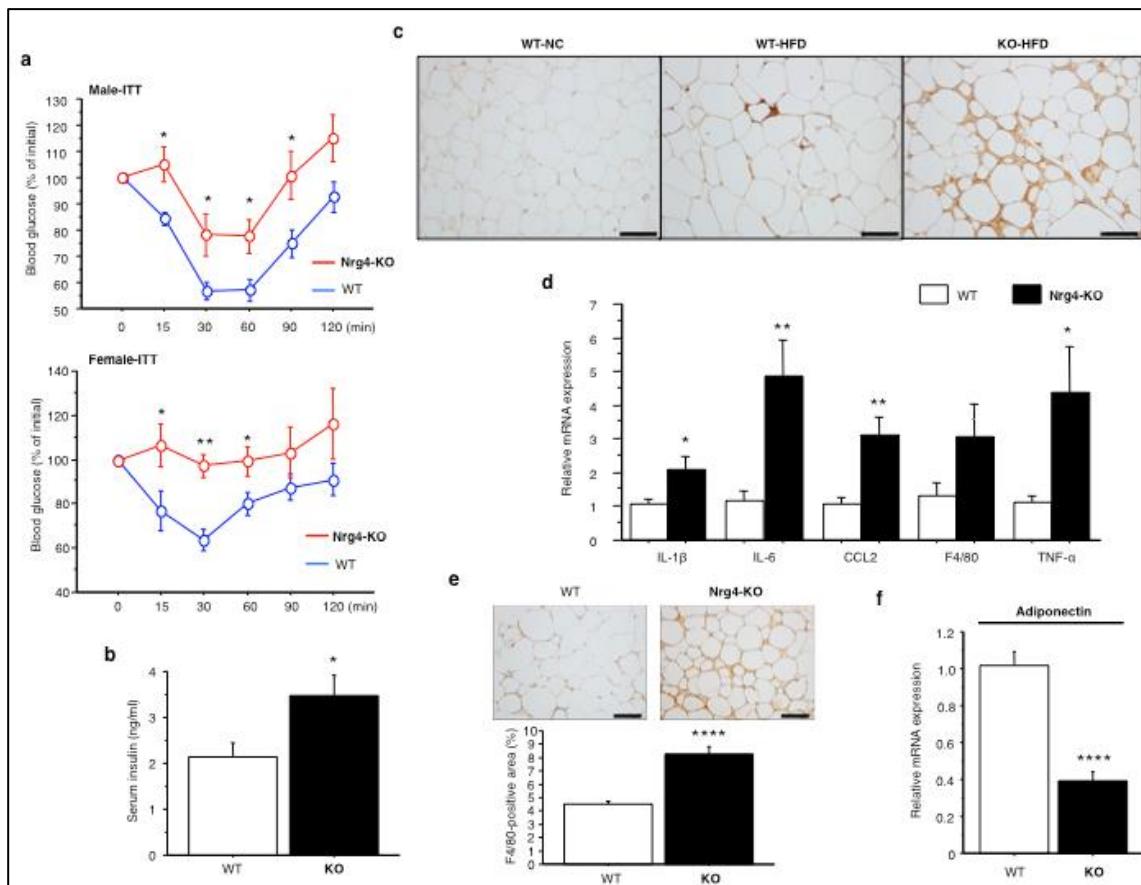


図 2. a) 高脂肪食を与えた野生型およびNrg4-KOマウスのインスリン負荷テスト。b) 血清インスリン濃度。c) Hypoxic プローブによる白色脂肪の免疫染色。d) 白色脂肪における炎症関連遺伝子発現。e) 白色脂肪の F4/80 免疫染色。f) 白色脂肪におけるアディポネクチン発現。

4 生活や産業への貢献および波及効果

肥満・メタボリック症候群は我が国を含む多くの先進国や一部途上国でも増加の一途を辿っており、その健康被害は甚大である。本研究課題により明らかとなった血管内皮—成熟脂肪ネットワークは、肥満・メタボリック症候群に対する新たな治療標的として有望であり、今後全く新しい予防・治療法の開発に将来発展する可能性が大いに期待できる。

本邦では男性の約3割、女性の約2割が肥満であり、また世界の肥満人口は21億人と推定されている。本研究の成果が将来的に新しい予防・治療法の開発に結びつけば、国民の健康長寿に大きく貢献し、また世界中の医療産業に絶大な波及効果もたらすと考えられる。