

# 「肥満症」におけるエネルギー・脂質代謝制御と血管新生制御との連関の解明

尾池 雄一

熊本大学大学院医学薬学研究部 (医)

## 1. 研究のねらい

我が国では65歳以上の人口が4人に1人という超高齢化時代に突入し、社会が『健康長寿』を真剣に考えないといけない状況になっている。一方でインスリン抵抗性、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧などが一個体に集積し階層的、相互的に連関しながら重症化し、『健康長寿』を脅かす心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患に発展する危険性が高まる「メタボリックシンドローム」という病態の増加が注目されている。実際に、厚生労働省の2004年国民健康・栄養調査では40歳から74歳までの男性の2人に1人、女性の5人に1人がメタボリックシンドロームに該当し、その予備軍を含めると1960万人にのぼることが明らかにされている。このように生活習慣(ライフスタイル)が関連する疾患が増加の一途をたどり、今後益々心筋梗塞、脳血管疾患、がんなど健康長寿のみならず生命を脅かす疾患の増加が予想される。それ故、生活習慣が関連する疾患に対する有効な予防、早期診断、治療法の開発が医学的のみならず社会的にも重要な意義を持つ。生活習慣に依存した様々なストレス刺激に対して生体の恒常性を維持させ、疾患の発症を阻止しようとする生体防御システムが我々生物には備わっているが、詳細な機構解明は未だ十分ではない。近年、組織特異的遺伝子欠損マウスが自在に作製されるようになり、生体防御システムにおける個別の臓器の役割が明らかにされてきた。その成果により、脂肪組織、骨格筋、肝臓、消化管、脳、血管、血球細胞などが様々な生理活性物質を分泌して遠隔臓器、細胞の機能を調節する複雑かつ巧妙な臓器間クロストークによる生体防御システムが注目されている。そのために分子、細胞レベルで得られた成果を個体レベルで統合して理解することの重要性が求められている。近年、我々の研究によりANGPTLファミリー分子は個体レベルで様々な遠隔臓器を標的とし、多彩な機能を示すことが明らかになってきており、臓器間クロストークによる生体防御シグナルシステムで重要な役割が示唆されている。本研究では、メタボリックシンドロームの基盤病態の一つである「内臓脂肪型肥満」を研究対象に発症、進展への生体防御機構にANGPTLファミリー分子がどのように関わっているかを解明し新規治療法、診断法開発を目指した基礎研究を行う。さらに生体の脂質蓄積・分解・燃焼・消費システムにおける恒常性維持の分子基盤解明、さらには新しい代謝過程の発見、新しい生理活性代謝産物の同定、血管新生制御とエネルギー、脂質代謝制御の連関解明、新規創薬標的の特定を目指す。

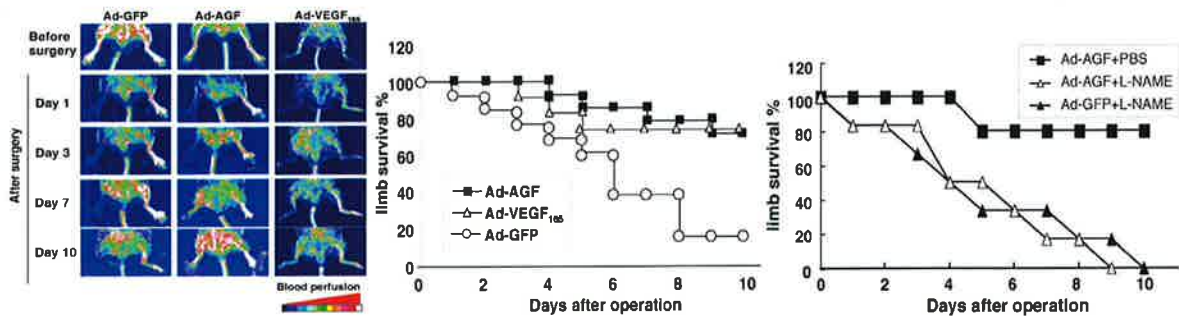
## 2. 研究成果

### AGF/Angpt16に関する成果

(背景)我々はこれまでにAGF/Angpt16の遺伝子欠損マウスが内臓脂肪型肥満を呈し、脂質代謝異常、糖代謝異常などメタボリックシンドロームの表現型を示すこと、逆にAGF/Angpt16をCAGプロモーター制御下に発現亢進させたマウスが高脂肪食負荷による肥満病態形成及び脂質代謝異常、糖代謝異常に対して抑制的な表現型を示すことより、AGF/Angpt16が抗肥満、抗糖尿病因子であることを明らかにしてきた(Oike et al. Nat Med 2005)。一方でAGF/Angpt16をK14プロモーター制御下に皮膚表皮の基底層細胞に発現亢進させたマウスでは、皮下で健全な血管の新生が亢進していることを明らかにしてきた(Oike et al. PNAS 2003, Blood 2004)。本研究では、AGF/Angpt16を研究対象として、血管新生制御とエネルギー代謝制御の連関解明を目的とし研究を行った。

(結果)AGF/Angpt16によって誘導される血管は健全であることを示してきたが、マウス下肢虚血モデルを用いた研究により、虚血部にアデノウイルスを用いてAGFタンパクを発現させると、強力な血管新生因子であるVEGFと遜色なく、新規な血管新生と側副血行路の形成が促進されることにより、血流が回復し虚血によっておこる下肢の自然切断のイベントが著明に減少することを見出し、血管再生医療への血管新生因子としてのAGF/Angpt16の機能を明らかにした。また、血管内皮細胞を用いたin vitroの実験でAGF/Angpt16によってERK-eNOS経路が活性化すること、

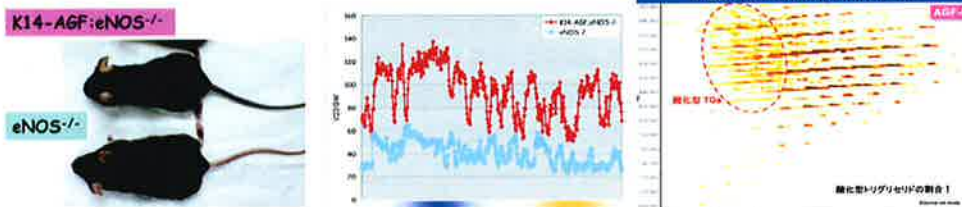
ERKの活性化を阻害することにより、AGF/Angpt16によって促進される血管内皮細胞の走化性がみられなくなることを見出した。またマウスにおいてNO阻害剤のL-NAME投与やeNOSの遺伝子欠損マウスでは、AGF/Angpt16によるマウス下肢虚血の改善が減弱することより、AGF/Angpt16の血管新生因子としての機能にはERK-eNOS-NO経路の活性化が重要であることを見出した(ATVB 2008)。



骨格筋などのインスリン感受性臓器で末梢血管が増えることは、抗肥満、抗インスリン抵抗性に対して有利であることが知られているため、AGF/Angpt16の血管新生作用と代謝作用(抗肥満作用)は何らかのリンクは存在していると考えているが、興味深いことにeNOS KOマウスではAGF/Angpt16の血管新生作用が減弱していたが、AGF/Angpt16の抗肥満作用はみられたため、基本的にはAGF/Angpt16の代謝作用(抗肥満作用)は、血管新生に非依存的にも有することを見出した(論文準備中)。

メタボローム解析により、AGF/Angpt16の遺伝子欠損マウスが示す内臓脂肪型肥満の特徴としては、①肝臓のリン脂質及びトリグリセリドにおいて、SFAやMUFAに対してPUFAの比率が減少する。②PUFAの中でもEPAはアラキドン酸やDHAに比べて比率が高い。③内臓脂肪のトリグリセリドの解析で、酸化型トリグリセリドが蓄積されており、肥満発症時にこれが増加傾向にあることなどが判明した。肥満の脂肪組織における脂質成分及び酸化状態の改善が内臓脂肪型肥満に伴うメタボリックシンドロームの新規治療標的になる可能性が考えられた。

### 6M male



### Angpt12に関する成果

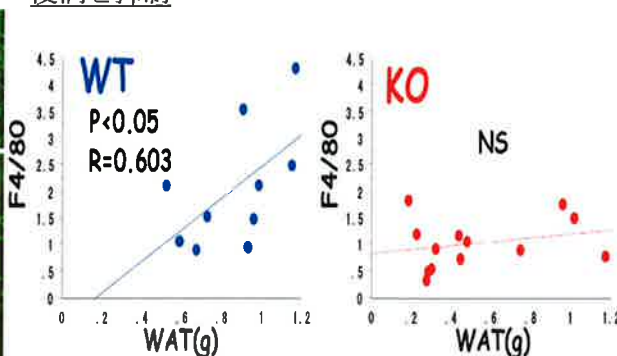
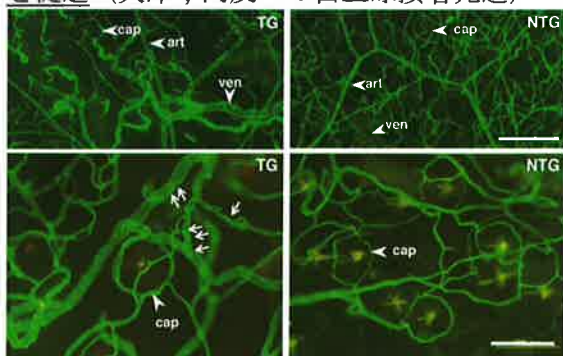
(背景) 動脈硬化病変部の動脈壁内の微小血管であるVasa vasorumで血管の増加(血管新生)や、動脈硬化巣にマクロファージの浸潤など血管壁リモデリングが進み動脈硬化病態が進展すると考えられている。近年、肥満形成時の脂肪組織でも、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインや増殖因子により脂肪組織へのマクロファージの浸潤、活性化が惹起され、さらにはそのマクロファージから分泌される炎症性サイトカインにより脂肪細胞が活性化され、さらに脂肪からの病態を促進させるアディポサイトカインの分泌を増大させるといった悪循環が脂肪細胞の形態学的変化である脂肪組織リモデリングを引き起こし、インスリン抵抗性増悪などのメタボリックシンドローム病態進展に関与することが解明されつつある。多くの研究からMCP-1(CCL2)がこれらの病態形成に関与していることがわかった一方で、その寄与率は予想より低く、我々が予想していたよりもっと複雑な分子機構が存在することが明らかとなってきた。そこで、我々は強力な血球及び血管内皮細胞走化因子であるVEGFシグナルの本病態における役割をこれらの遺伝子欠損マウスを用いて、病態を作製して検討したが、VEGFシグナルの病態形成への寄与はほとんどなかった。つまり、MCP-1やVEGF以外の鍵因子の探索・同定が重要であることが明らかとなってきた。我々はこれまでにゼブラフィッシュを用いた解析により、Angpt12が血管新生因子であることを明らかにしてきた(Kubota, Oike et al. PNAS 2005)。その後、マウスやヒトでは、Angpt12が脂肪組織、血管平滑筋に豊富に発現していることを見出し、内臓脂肪型肥満や動脈硬化の発症、

進展へ Angpt12 がどのように関わっているかを解明し新規治療法、診断法開発を目指した基礎研究を行った。

(結果) ANGPTL2 のメタボリックシンドローム病態との関連を検討するため、ANGPTL2 の ELISA システムを作製し、正常ボランティア (無疾病群)、糖尿病患者群、虚血性心疾患患者群で血中の ANGPTL2 濃度を測定した。血中 ANGPTL2 濃度は、無疾病群では BMI、インスリン値、CRP 値と正相関がみられ、糖尿病患者では、内臓脂肪面積、インスリン抵抗性、CRP 値と正相関がみられ、インスリン感受性とは負の相関が見られることを見出している。また、糖尿病患者や虚血性心疾患患者では、血中濃度が上昇していた。また、ヒトにおいて内科的治療により糖尿病、内臓脂肪肥満状態が改善されたときに、血中 ANGPTL2 濃度もパラレルに変動していた。これらから、ANGPTL2 がメタボリックシンドローム病態と深く関連していることが明らかとなった。次に、ANGPTL2 がこれらの病態の結果なのか原因なのかを血管内皮細胞、マクロファージ細胞を用いた *in vitro* の実験系、及び実験マウスを用いて検討を行った。ANGPTL2 は血管内皮細胞、マクロファージ細胞に対してその走化性を促進させること、特に血管内皮細胞を用いた解析で、その分子機構として Rac を活性化させることがわかった。また、NF- $\kappa$ B を活性化させ炎症シグナルも活性化にも寄与していた。また、Angpt12 を K14 プロモーター制御下に皮膚表皮の基底層細胞に発現亢進させたマウスでは、皮下で炎症性変化を伴った病的な血管形成の促進が認められた。また、ANGPTL2 の遺伝子改変マウスを用いた研究では、ANGPTL2 の発現抑制により肥満形成に伴って認められる脂肪組織へのマクロファージの浸潤抑制、炎症性血管の減少などにより脂肪組織の炎症が抑制され肥満に伴う脂肪組織再構築 (リモデリング) が軽減されており、インスリン抵抗性などの糖代謝異常が改善されていた。反対に脂肪組織に過剰に発現させた場合、肥満がない状態でも病的血管の誘導などで炎症性変化を惹起し、インスリン抵抗性の原因になりうることを見出した。

ANGPTL2 シグナルは血管に炎症性変化を促進 (矢印; 内皮への白血球接着亢進)

ANGPTL2 抑制は肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤を抑制



以上の結果より、ANGPTL2 シグナルが炎症性変化を伴う血管新生、骨髄由来の炎症性細胞の浸潤促進を介して肥満に伴う脂肪組織リモデリング促進に寄与していることが明らかとなり、ANGPTL2 シグナルを減弱させることが肥満に伴う脂肪組織の炎症、糖代謝異常に対する新たな治療戦略になることを見出した (論文投稿中)。次に、脂肪組織リモデリングにおける骨髄由来細胞の役割を明らかにするために、以前我々が血管内皮細胞の分化に重要であることを報告している (J Biol Chem 2004) 細胞周期関連分子のたんぱく質分解を介して細胞周期を抑制的に制御するユビキチンリガーゼ Fbxw7 の骨髄細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製・解析した。結果として、高脂肪食負荷による肥満、メタボリックシンドロームになりにくいことを見出し脂肪組織リモデリングにおける骨髄由来細胞の重要性を認めた (未発表)。予想外に Fbxw7 骨髄細胞特異的欠損マウスは、約半数が T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) を発症したため脂肪組織リモデリングにおける骨髄由来細胞の役割に関する詳細な解析は行えなかった。このマウスの白血病細胞は、正常マウスに移植すると同様の白血病を繰り返しひきおこすことから、その中に白血病幹細胞が存在することが示唆された。さらに日本人の T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) の 44 症例中 8 症例で FBXW7 の遺伝子変異が存在することも確認し、Fbxw7 が造血幹細胞を細胞周期の静止期にとどめ、過剰な細胞分裂に伴う造血幹細胞の枯渇を未然に防いでいるとともに白血病発症を阻止する安全弁としても機能していることを報告した (Genes Dev 2008)。

### 3. 主な発表

#### 論文

- Oike, Y., Akao, M., Kubota, Y. & Suda, T. , Angiopoietin-like proteins: potential new targets for metabolic syndrome therapy, **Trends Mol. Med.** 11, 473-479 (2005)
- Morisada, T., Kubota, Y., Urano, T., Suda, T. & Oike, Y., Angiopoietins and Angiopoietin-like proteins in angiogenesis, **Endothelium** 13, 71-79 (2006)
- Hato T, Tabata M, & Oike Y., The role of angiopoietin-like proteins (Angptls) in angiogenesis and metabolism, **Trends Cardiovasc. Med.** 18, 6-14 (2008)
- Urano, T., Ito, Y., Akao, M., Sawa, T., Miyata, K., Tabata, M., Morisada, T., Hato, T., Kadomatsu T., Yano, T., Yasunaga, K., Shibata, R., Murohara, T., Akaike, T., Tanihara, H., Suda, T. & Oike Y., Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model, **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 28, 827-834 (2008)
- Matsuoka S, Oike Y., Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, & Suda, T., Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL, **Genes Dev.** 22, 986-991 (2008)

#### 招待講演

- Yuichi Oike, Roles of Angiopoietin-like proteins (Angptls) in angiogenesis, XIVth International Vascular Biology meeting (平成 18 年 6 月 6-10 日, Noordwijkerhout, Netherlands)
- Yuichi Oike, Angiopoietin-like proteins (Angptls); potential new targets for metabolic syndrome therapy , The 16th Asian Pacifico Congress of Cardiology (平成 19 年 12 月 12-16 日, Taipei)
- 尾池雄一 肥満を標的としたメタボリックシンドロームの治療戦略 第 28 回日本肥満学会 (平成 19 年 10 月 19-20 日、東京)