

論文の内容の要旨

論文題目 核内受容体型転写因子とアディポカインの心血管疾患における
病態生理的意義

氏名 添田 光太郎

現在、心血管疾患は重要な死亡原因の一つである。本邦でもその重要性ゆえ対策が急務となっている。心血管疾患の原因として高脂肪食と運動不足、それに伴う肥満が大きな問題となっているが、これらは心血管疾患の主要なリスクファクターである糖尿病の増加の要因でもある。

糖尿病はインスリン作用の不足により生じる慢性の高血糖を主徴とする代謝症候群であるが、2007年の国民健康・栄養調査では日本全国の「糖尿病が強く疑われる人」と「糖尿病の可能性を否定できない人」の有所見者数は2200万人に達し、その増加への対処は国家的課題と位置づけられている。成人糖尿病の約95%が2型糖尿病であると考えられているが、特に近年の2型糖尿病の発症増加には、ライフスタイルの変化が大きく関与している。即ち、食生活の欧米化や身体活動度の低下といった生活習慣が肥満を形成し、インスリン抵抗性を増強し、糖尿病発症に促進的に作用していると考えられている。

糖尿病の合併症は細小血管障害と大血管障害に分類され、後者に分類される冠動脈疾患は直接死亡にも結びつき得ることから特に重要と考えられている。また、冠動脈疾患のほかにも心筋肥大、心室の拡張障害、自律神経障害などの機序により、糖尿病患者は心不全をきたしやすく、2型糖尿病やメタボリックシンドロームから心不全をきたす過程で冠動脈疾患と左室肥大 (left ventricular hypertrophy; LVH) は主要かつ重要な病態であると考えられている。これらの心血管疾患を含む糖尿病合併症の発症進展因子の一つとして注目されている酸化ストレスは、生体内の活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) による酸化反応が亢進している状態を指し、各臓器における ROS の病的増加もまた糖尿病そのものの発症・進展に寄与すると考えられている。また、後述のアディポネクチン作用を高める効果の点でも、ROS を軽減する抗酸化剤は病態改善に有用である可能性があると考えられた。

そこで私は、冠動脈疾患の背景として重要な動脈硬化の動物モデルであるカフ傷害モデ

ルを用いて、抗酸化物質であるβカロテンを豊富に含み、かつ核内受容体型転写因子レチノイドX受容体(retinoid X receptor; RXR)の活性化作用を有するドナリエラ抽出物(9 *cis*-β carotene *Dunaliella bardawil* extract; 9CDE)の病態改善効果について検討し(「研究1」)、LVHの動物モデルとして横行大動脈結紮モデルを用いて、後述のアディポネクチン・AdipoRシグナルの心血管疾患における病態生理的意義について検討した(「研究2」)。

アディポネクチンは、糖尿病自体の病態と様々な合併症の形成に関与する生理活性物質として注目されている。アディポネクチンは、ヒト脂肪組織遺伝子ライブラリーに高頻度に出現し、脂肪組織特異的に発現した遺伝子 apM1 (adipose most abundant gene transcript 1) の産物で、244 アミノ酸からなる分泌タンパク質であり、正常ヒト血中には4〜30μg/mL という高濃度で存在している。また、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用を併せ持つが、分泌量は肥満による脂肪細胞肥大化に伴い減少する性質を有する。

また、アディポネクチンは2種類の受容体 AdipoR1、AdipoR2 を介して作用することが明らかにされている。AdipoR1 は骨格筋、肝臓に豊富に発現し、細胞内では AMPK を活性化して糖取り込みを促進し、糖新生を抑制し、かつ脂肪燃焼を促進し、脂肪合成を抑制する。また、AdipoR2 は肝臓、血管内皮に高発現し、細胞内では peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα)の活性化を介して脂肪燃焼、抗炎症作用、活性酸素消去作用を有している。

アディポネクチンは以上のように抗糖尿病作用を有し、アディポネクチンの遺伝的・後天的欠乏は2型糖尿病、メタボリックシンドローム、心血管疾患の主要な原因と考えられている(アディポネクチン仮説)。すなわち、遺伝素因としてのアディポネクチン遺伝子多型と、高脂肪食、運動不足など肥満をきたす環境因子によりアディポネクチンが欠乏し、標的臓器でのアディポネクチン作用不足により2型糖尿病、メタボリックシンドローム、心血管疾患の発症が促進されると考えられている。また、肥満は同時に AdipoR1、AdipoR2 の発現も低下させ、標的臓器でのアディポネクチン作用はさらに低下し得る。

まず、カフ傷害モデルにおいて 9CDE の投与により新生内膜形成を抑制できるか検討した(「研究1」)。従来βカロテンは抗酸化物質として知られていたが、特に 9CDE に多く含まれる 9 *cis*-β carotene には RXR の活性化作用があり、PPAR や LXR と相互作用することで抗糖尿病作用を有することが明らかになっていた。また、共同研究者の報告では PPARα

活性化薬であるフェノフィブラートとともに投与されることで相加的にアディポネクチン・AdipoR シグナルを増強する可能性が示唆されていた。

大腿動脈周囲にポリエチレン製チューブを留置し、新生内膜形成を惹起するカフ傷害モデルを野生型マウスに対して用い、メチルセルロース中に懸濁して経口投与を行い、メチルセルロースのみを投与した対照群に対し比較を行った。9CDE 投与群では大腿動脈に垂直な断面のヘマトキシリン・エオジン染色像で、新生内膜面積は 37%有意に抑制されたが、中膜面積には有意差を認めなかった。内膜中膜比は 35%有意に抑制され、9CDE は動脈硬化抑制効果を有する可能性が示唆された。(内膜面積: 2340 ± 280 vs $1470 \pm 290 \mu\text{m}^2$, $p=0.04$ 、中膜面積: 14200 ± 820 vs $13400 \pm 550 \mu\text{m}^2$ 、内膜中膜比: 0.17 ± 0.02 vs 0.11 ± 0.02 , $p=0.04$ (コントロール群($n=9$) vs 9CDE 群($n=6$)、平均±標準誤差)) 私達のグループの検討で、血管内皮ではAdipoR2以下のシグナルが動脈硬化抑制的に働く可能性も示されており、9CDE の投与により、全身の耐糖能改善のみならず血管局所でもアディポネクチン・AdipoR シグナルが増強されている可能性もあり、今後の検討が期待された。

次に、TAC モデルを用いて検討した(「研究2」)。このモデルでは横行大動脈に縮窄を作成し、慢性的に心筋に圧負荷を与え、心肥大が惹起される。本研究では、横行大動脈に 27G 針の径の間隙を残して結紮した。TAC 2 週間後まで徐々に心筋細胞の肥大が進みその後は肥大が停止し(心筋細胞横断面積 TAC 2wk; 178 ± 14 vs $287 \pm 11^*$, (コントロール ($n=3$) vs TAC ($n=3$), $*p<0.05$), TAC 1mo; 153 vs $287 \pm 8.7 \mu\text{m}^2$ (コントロール ($n=2$) vs TAC ($n=3$))), FS (fractional shortening) は 2 週間後まで保たれたものの、その後徐々に低下した。(TAC 2wk; 0.36 ± 0.05 vs 0.29 ± 0.03 , (コントロール($n=3$) vs TAC ($n=9$)), TAC 1mo; 0.31 ± 0.03 vs $0.22 \pm 0.03^*$ (コントロール ($n=5$) vs TAC ($n=9$), $*p<0.05$)) これらは TAC 後 2 週間の代償期の後に非代償期に至ることを表している。

以上より TAC2 週間後においては、心肥大が完成し連続的に不全心に移行する前段階で、代償期の終末期にあると考えられた。また、TAC2 週間後の心臓では、転写レベルで BNP は 5.5 倍($p<0.05$)、1 型コラーゲンは 5.4 倍、3 型コラーゲンは 7.5 倍(ともに $p<0.01$)まで有意に上昇を認め、慢性圧負荷と心筋線維化を反映していると考えられた。(コントロール $n=10$, TAC $n=11$) また、既知の AdipoR1 の下流遺伝子である PGC-1 α は 46%、AdipoR2 の下流遺伝子である PPAR α は 50%共に有意に低下を認め、その他脂肪酸酸化に関連するペ

ルオキシソーム β 酸化の律速酵素である acyl CoA oxidase (ACO) は 32% ($p < 0.05$)、ミトコンドリア β 酸化の律速酵素 medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) は 53% ($p < 0.01$)、長鎖アシル CoA のミトコンドリア内への取り込みを担う carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) は 33% ($p < 0.01$) 有意に低下を認めた。(コントロール $n=10$, TAC $n=11$) また、AdipoR1 は 18%、AdipoR2 は 16% 共に有意に低下を認めた。(AdipoR1; 1 ± 0.05 vs 0.82 ± 0.05 , AdipoR2; 1 ± 0.05 vs 0.84 ± 0.05 (ratio, コントロール ($n=10$) vs TAC ($n=11$), とともに $p < 0.05$)) 心肥大・心不全では、心筋の相対的虚血が生じ、エネルギー代謝が好氣的脂質代謝から嫌氣的に回転可能な解糖系にシフトすると考えられているが、脂肪酸酸化関連遺伝子を制御する AdipoR1、AdipoR2 の発現が肥大心で低下していることは、このようなエネルギー代謝の転換の要因のひとつに AdipoR1、AdipoR2 の発現量低下が関与している可能性があることを示唆している。

以上の結果を受け、心不全におけるアディポネクチン・AdipoR シグナルの病態生理的意義を明らかにするため AdipoR 欠損マウス、心筋特異的 AdipoR 欠損マウスの作製・解析が進行中である。

本研究に示された通り、AdipoR は心血管疾患において病態生理的意義を有している可能性があり、抗酸化物質を投与するなどしてアディポネクチン・AdipoR シグナルを増強する、あるいは AdipoR アゴニストの開発・実用化を目指すことが重要と考えられた。