

内皮細胞の代謝シグナルに注目した臓器機能調節機構

東京医科歯科大学 医学部附属病院 糖尿病・内分泌・代謝内科

土屋 恭一郎

1. はじめに

血管は体内最大の臓器間ネットワークを形成する器官であり、血液の供給を介して個々の臓器の機能維持に必須の役割を果たす。血管内皮細胞は血管の最内層に存在する単層の細胞であり、内腔と血管壁を隔てるバリアーとして機能する。一方で、血管内皮細胞は血液中の因子の変化を刻々と感受し、一酸化窒素 (nitric oxide: NO)、プロスタグランジン、アンジオテンシン II など多くの生理活性物質を産生・分泌する。これらの生理活性物質は血管平滑筋、または血管内皮細胞自身に作用し、血管トーン、血管平滑筋の増殖、凝固、炎症、酸化ストレスなどのバランスを保つことで、血管の構造および機能的恒常性を維持している。しかし、種々の動脈硬化危険因子の存在下では、血管壁局所の酸化ストレス、炎症、脂質の蓄積などが血管内皮機能を障害し、血管トーンの調節異常を初めとする機能的異常、さらにはプラーク形成、狭窄・閉塞といった器質的異常につながる。すなわち、血管内皮機能障害は動脈硬化という血管の機能・器質的異常の進展過程のごく早期に出現し、心血管疾患の原因としての恒常性維持機構の破綻の端緒となる病態といえる。

動脈硬化危険因子の中で、インスリン抵抗性を基盤とする糖・脂質代謝異常は生体における「代謝ストレス」として、局所の酸化ストレスや炎症を介して血管を含む種々の臓器機能異常の原因となることが知られている。興味深いことに、申請者らの知見を含めて、血管内皮細胞のインスリンシグナルが NO 産生、炎症、および酸化ストレス等の基本的な血管内皮細胞機能を制御していることが近年報告され (Cell Metab. 2010;11:379-89, Cell Metab. 2012;15:372-81)、インスリン抵抗性が細胞自律的に内皮細胞機能障害を惹起することが明らかとなった。加えて、血管内皮細胞にはブドウ糖、アミノ酸、脂質等の栄養因子の代謝機構も存在しており、インスリンやグルカゴン等の代謝関連内分泌物質、またブドウ糖、アミノ酸、脂質等の栄養因子により活性化される細胞内「代謝シグナル」が、単独あるいは相互作用しながら血管内皮細胞、さらには血管機能の恒常性維持に関与している可能性がある。

以上の様に、血管内皮細胞の代謝シグナルが血管そのものの機能調節に重要であることが明らかになりつつあるが、血管内皮細胞が血管以外の末梢臓器の機能調節に関わっているかどうかは明らかでない。特に、血管内皮細胞の内分泌器官としての側面から、代謝シグナルに連動して何らかの生理活性物質が産生され、血管による臓器間ネットワークを介して、または局所的に末梢臓器の実質細胞に作用して臓器機能を調節する可能性が想定されるものの、現状で明らかな報告は無い。そこで本研究では、内分泌器官としてのECに着目し、生理的条件下での代謝シグナルに連動する内分泌応答機構を解明し、それに伴い産生される生理活性物質の作用を明らかにすることを目的とする (図1)。具体的には、代謝シグナル活性化を誘導機構とする血管内皮細胞由来生理活性物質とその機能を明らかにし、代謝ストレス下では代謝シグナル異常により生理活性物質の産生が質的・量的に変化し、末梢臓器の実質細胞に作用して臓器機能異常を促進的または代償的に修飾する可能性について検討したい。

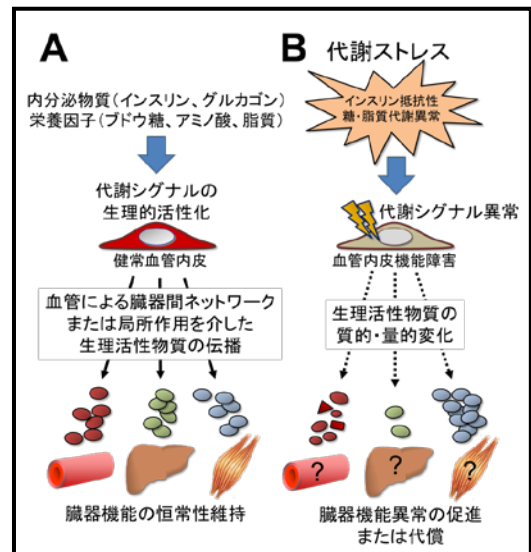


図1 本研究の作業仮説 (A) 代謝ストレスの非存在下では、血管内皮細胞の代謝シグナルは生理的に機能し、生理活性物質の産生調節を介して末梢臓器機能の恒常性維持に関与している。(B) 代謝ストレスの存在下では、代謝シグナル異常に伴う質的・量的な生理活性物質の変化をきたし、末梢臓器機能異常に対し促進的または代償的に作用する。

Cell Metab. 2010;11:379-89, Cell Metab. 2012;15:372-81)、インスリン抵抗性が細胞自律的に内皮細胞機能障害を惹起することが明らかとなった。加えて、血管内皮細胞にはブドウ糖、アミノ酸、脂質等の栄養因子の代謝機構も存在しており、インスリンやグルカゴン等の代謝関連内分泌物質、またブドウ糖、アミノ酸、脂質等の栄養因子により活性化される細胞内「代謝シグナル」が、単独あるいは相互作用しながら血管内皮細胞、さらには血管機能の恒常性維持に関与している可能性がある。

2. 方法

1. 絶食-再給餌によるマウス大動脈遺伝子発現と血清蛋白の網羅的解析

本研究ではECとして大動脈ECを用い、絶食-再給餌によって個体レベルでECの代謝シグナルを生理的に活性化させることで解析の端緒とする。既に、絶食により大動脈組織の糖新生関連遺伝子 *G6pc*, *Pck1* の発現は増加し、その後の再給餌で著明に減少することを確認済みであり、血管組織でも摂食によりダイナミックに代謝関連遺伝子が発現変動することを見出している。具体的には、野生型マウスを絶食（18時間）群と絶食後再給餌（6時間）群に分け、各々のタイミングで採血後に胸部大動脈を速やかに採取する。大動脈組織はDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析、血清は isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) 法による網羅的蛋白解析に供する。

2. 網羅的解析に基づく候補遺伝子・蛋白の抽出とECでの発現確認

網羅的遺伝子および蛋白解析の結果から、絶食群と絶食後再給餌群で同一方向に変化する遺伝子とその遺伝子産物（蛋白）を抽出する。独立した別実験で同様に大動脈組織と血清を得、real-time RT-PCR法とELISA（またはウェスタンブロッティング）法で結果を確認する。血管構成細胞の中でもEC由来であることを確認するため、初代培養マウス大動脈ECおよび平滑筋細胞での遺伝子発現量をreal-time RT-PCR法で比較する。

3. 候補遺伝子・蛋白の発現誘導機構と生理機能の解析

1と2で抽出され、EC優位に発現が認められた遺伝子において、代謝シグナルとの関連が未知のものについては発現誘導機構の解析を行う。培養野生型大動脈ECに対してブドウ糖、インスリン、アミノ酸または脂質による添加実験を行い、発現変化のスクリーニングを施行する。平行して、培養ECで過剰発現系および発現抑制系を構築し、一酸化窒素産生、酸化ストレス産生、炎症系シグナル等の評価により、EC機能への関与を推測する。加えて、代謝機能への関与を検討するため遺伝子組換え蛋白を作成し、3T3L1脂肪細胞、肝初代培養細胞、C2C12筋細胞などへの添加実験により、糖脂質代謝、さらには脂肪分化等への影響も検討する。これらの検討により有意な表現型が確認された遺伝子については、EC特異的遺伝子改変マウスを作成し、個体レベルの生理的意義を解析する。

3. 結果

「2.方法」に挙げた絶食(F)-再給餌(RF)群によるマウス大動脈遺伝子発現変化について解析を行った。18時間のF後、6時間のRFにより血糖、血清インスリン、血清コレステロール、および血清中性脂肪は有意に増加し、血清遊離脂肪酸は有意に減少した。大動脈組織をGeneChip® Mouse Exon 1.0 ST Arrayによるマイクロアレイ解析に供したところ、RF群で10プローブの増加、27プローブの減少が認められた(表1)。RF群で発現減少した遺伝子群のうち、分泌蛋白をコードする遺伝子AおよびBを見出した。遺伝子Aについては*ob/ob*マウスのRF時大動脈において野生型マウス大動脈より発現が増加しており、遺伝子Bについては*ob/ob*マウスのF時大動脈において野生型マウス大動脈より発現が増加していることを確認した(図2)。

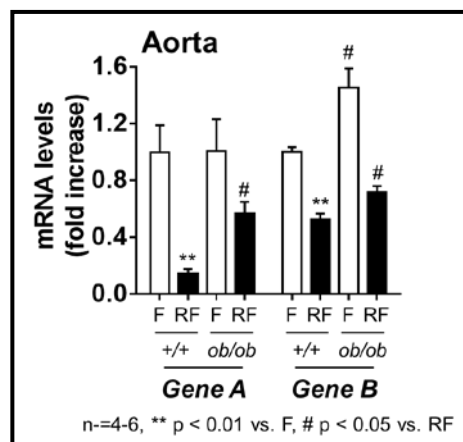


図2 絶食(F)-再給餌(RF)時の野生型(+/+)及び*ob/ob*マウス大動脈における遺伝子A及びBの発現

4. まとめ・考察

絶食-再給餌による代謝シグナルの生理的変化により、大動脈において発現量が減少する、分泌蛋白をコードする遺伝子AおよびBを見出した。肥満マウスの大動脈では発現亢進、または再給餌による発現抑制の減弱が認められ、代謝ストレスによる発現調節異常が示唆された。今後、ECにおける発現量を明らかにし、共培養及び培養上清添加等の*in vitro*の検討から臓器機能調節における役割を明らかにしていく。

5. 発表論文、参考文献

1. Tsuchiya K, Tanaka J, Yu S, Welch C, DePinho RA, Tabas I, Tall AR, Goldberg IJ, Accili D. FoxOs Integrate Pleiotropic Actions Of Insulin In Vascular Endothelium To Protect Mice From Atherosclerosis. **Cell Metab.** 2012;15(3):372-81.
2. Rask-Madsen C, Li Q, Freund B, Feather D, Abramov R, Wu IH, Chen K, Yamamoto-Hiraoka J, Goldenbogen J, Sotiropoulos KB, Clermont A, Gerald P, Dall'Osso C, Wagers AJ, Huang PL, Reikhter M, Scalia R, Kahn CR, King GL. Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. **Cell Metab.** 2010;11(5):379-89.