慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	内分泌ホルモンによる内皮機能に基づいた脂肪機能制御
Sub Title	The role of endothelial cells on adipocyte metabolism
Author	神田, 武志(Kanda, Takeshi) 伊藤, 裕(Itō, Hiroshi) 脇野, 修(Wakino, Shū)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	血管内皮細胞は白色脂肪細胞への脂質の取り込みを増加させ白色脂肪重量を調節するが、全身のエネルギーバランスが内皮機能に影響を及ぼすメカニズムは不明である。空腹時に胃から分泌されるグレリンは、主に中枢神経系を介して摂食亢進、脂肪蓄積を増加させる。グレリン受容体(GHSR) 欠損マウスでは高脂肪食摂取後の白色脂肪重量の低下をきたすが、高脂肪食摂取に対する内皮グレリン/ GHSRシグナルの役割は不明であった。本研究によりグレリンは内皮に存在する受容体を介して脂質を取り込み白色脂肪重量を増加させることを明らかとした。 Endothelial cells are known to regulate adiposity by lipid uptake from the blood circulation to white adipocytes. However, the mechanism underlying the regulation of endothelial transport by systemic energy balance remains unclear. Ghrelin, a gastric peptide, conveys nutritional information and increases adiposity mainly through the central nervous system. The deficiency of its receptor, growth hormone secretagogue-receptor (GHSR), leads to reduced adiposity after high fat intake. This study demonstrated that endothelial GHSR plays an important role in endothelial function and controls lipid metabolism in response to ghrelin. The findings also suggest that the endothelium regulates white adipocyte metabolism.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2016 ~ 2018 課題番号 : 16K09812 研究分野 : 内分泌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K09812seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　５ 月 ３０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０９８１２

研究課題名（和文）内分泌ホルモンによる内皮機能に基づいた脂肪機能制御

研究課題名（英文）the role of endothelial cells on adipocyte metabolism

研究代表者
神田　武志（Kanda, Takeshi）

慶應義塾大学・腎臓内分泌代謝内科・講師

研究者番号：８０３１７１１４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：血管内皮細胞は白色脂肪細胞への脂質の取り込みを増加させ白色脂肪重量を調節するが、全身のエネルギーバランスが内皮機能に影響を及ぼすメカニズムは不明である。空腹時に胃から分泌されるグレリンは、主に中枢神経系を介して摂食亢進、脂肪蓄積を増加させる。グレリン受容体（GHSR）欠損マウスでは高脂肪食摂取後の白色脂肪重量の低下をきたすが、高脂肪食摂取に対する内皮グレリン/ GHSRシグナルの役割は不明であった。本研究によりグレリンは内皮に存在する受容体を介して脂質を取り込み白色脂肪重量を増加させることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
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、肥満症ならびに脂肪蓄積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。肥満症では耐糖能異常・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。本研究により血管内皮細胞はグレリンを介して体内の負エネルギーバランス時に脂質を吸収することが明らかとなり、新たな内皮細胞の機能が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Endothelial cells are known to regulate adiposity by lipid uptake from the blood circulation to white adipocytes. However, the mechanism underlying the regulation of endothelial transport by systemic energy balance remains unclear. Ghrelin, a gastric peptide, conveys nutritional information and increases adiposity mainly through the central nervous system. The deficiency of its receptor, growth hormone secretagogue-receptor (GHSR), leads to reduced adiposity after high fat intake.
This study demonstrated that endothelial GHSR plays an important role in endothelial function and controls lipid metabolism in response to ghrelin. The findings also suggest that the endothelium regulates white adipocyte metabolism.

研究分野：内分泌

キーワード：グレリン　血管内皮細胞　肥満

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

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、肥満症ならびに脂肪蓄積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。肥満症では耐糖能異常・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、研究代表者らは脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPARγを血管内皮細胞特異的に欠損させると CD36、aP2 等の脂質吸収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(図１)。更に血管内皮細胞は 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、脂肪サイズ・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、体内のエネルギー代謝状態に応じて血管内皮機能がどのように変化して脂肪重量を調節するのかいまだ不明である。

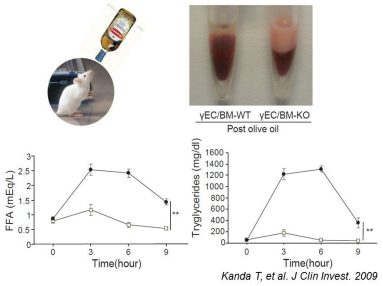


図1　内皮PPARγ欠損マウスではオリーブオイル負荷後血清乳びを認め、遊離脂肪酸、中性脂肪の上昇が観察される。
Kanda T, et al. J Clin Invest. 2009

体内には大きく分けて 2 種類の脂肪細胞、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞が存在する。白色脂肪組織（white adipose tissue; WAT）はエネルギーの貯蔵と放出を担い、褐色脂肪組織（brown adipose tissue; BAT）はエネルギーの消費と散逸を担う。これまでヒトでは胎児期のみに褐色脂肪細胞が存在すると考えられてきたが、PET などによる解析機能の向上により成人においても BAT が活発に働いていることが明らかとなった。BAT は糖や FFA を基質として熱産生を行うが、肥満マウスではこの機能が低下しエネルギー消費の低下から肥満が持続する。更に BAT の機能として血中の TG rich なリポタンパクであるカイロミクロンや VLDL 由来の FFA を血管透過性の亢進から積極的に取り込み寒冷刺激時に熱産生を行うことが示され（Nat Med 2011)、BAT の機能回復が抗肥満治療並びに血中中性脂肪の低下をもたらすことが示唆されている（Diabetes 2015)。

グレリンは成長ホルモン分泌を誘導する G 蛋白質共役型受容体の内因性リガンドとして日本人研究者、児島、寒川らにより胃から同定されたペプチドホルモンである（Nature 1999)。グレリンは空腹等の負のエネルギーバランス時に分泌され、レプチンと拮抗する働きがあり中枢に作用し摂食亢進と脂肪蓄積作用を有するが、末梢組織へのグレリンの作用も寄与することが推定されている(Nature 2001,PNAS 2014 等) 。これまで血管内皮細胞でのグレリンシグナルの脂質代謝、肥満症における意義は明らかではなかった。研究代表者らは血管内皮細胞の遺伝子発現について検討を行ったところ、グレリン刺激により PPARγ、aP2 の発現量の上昇が認められた。そこで全身グレリン受容体欠損マウス（GHSR 欠損マウス）（J Clin Invest. 2005）で生体内でのグレリンシグナルの抑制の意義を検討した。野生型マウスと GHSR 欠損マウスを比較したところ、脂質経口負荷後の血中 FFA、TG は野生型と比較して GHSR 欠損マウスで上昇しており、グレリンの GHSR を介したシグナルにより生体内へ脂質の取り込みが増加すると考えられた。更に内皮特異的に GHSR を発現したマウスでは GHSR 欠損マウスと比較して脂質の取り込みが増加していた。以上よりグレリンが内皮 GHSR に作用し、PPARγや aP2 の発現上昇から白色脂肪組織内への更なる脂質の取り込みを上昇させ脂肪蓄積作用を有するのではないかと仮説を立てた。

２．研究の目的

空腹時に胃から分泌されるグレリンは摂食増加のみならず、エネルギー消費低下により体重増加、脂肪蓄積作用をもたらす。血管はこれまで栄養物等を受動的に隣接臓器に送達すると考えられてきたが、研究代表者らは血管内皮細胞が能動的に遊離脂肪酸の取り込みを行うことを報告した。本研究の目的は『グレリンが中枢神経に作用するのみならず、血管内皮の Growth Hormone Secretagogue receptor(GHSR)を介して白色脂肪組織への脂質の取り込みを増加させ脂肪蓄積作用を有すること。一方、褐色脂肪組織への脂質の取り込みは抑制して褐色脂肪組織の機能低下から体重増加を維持させる。更に内皮グレリン GHSR シグナルは高血圧、動脈硬化の発症に関与する。』という仮説を遺伝子改変動物および細胞培養系を用いて検証することである。

（１）グレリンの脂質代謝調節の機序の解明：空腹や中鎖脂肪酸の刺激によって分泌されたグレリンが、血管内皮細胞に作用し内皮 PPARγ の発現上昇等を介して FFA・TG の取り込みを WAT へ増加させる機序の解明。

（２）グレリンの褐色脂肪組織機能調節の機序の解明：グレリンが BAT 機能低下から体重増加作用を有する事が報告されているが、グレリンの内皮 GHSR シグナルおよび交感神経活性調節作用が BAT における脂質の取り込みを減少させ、BAT 機能を低下させるか否かを明らかに

する。
（３）高血圧・動脈硬化への内皮グレリンシグナルの関与を明らかにする

３．研究の方法

（１）マウス
UT Southwestern Medical Center の Zigman 博士から提供された GHSR 欠損マウスは内在性 GHSR 対立遺伝子内に loxP 隣接転写ブロッキングカセットを含む。GHSR 欠損マウスを VE−カドヘリン−Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配させることにより、血管内皮細胞において GHSR を選択的に発現するマウスを作製した。全てのマウスは、食物と水を自由に摂取させながら、１２時間の明暗周期で飼育した。
試験前に、全てのマウスに標準的なペレット食（脂肪から４．３８％のカロリー；ＣＥ－２、ＣＬＥＡ、日本）を与えた。６週齢から始めて１２週間、高脂肪食（ＨＦＤ；脂肪から 60%カロリー；Ｄ１２４９２、Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｄｉｅｔｓ Ｉｎｃ.）を用いて肥満マウスを作成した。低脂肪食を与えられたマウスは、全体を通して標準的な固形飼料を用いた。グレリン治療のために、アシル化グレリン（ＡＧ）ペプチドを合成し、1.0mg/kg のＡＧを生理食塩水に溶解し、１日目から５日目まで毎日２回投与した。対照マウスには生理食塩水を注射した。

(２)代謝検査
経口脂肪負荷試験のために、標準的な固形飼料を消費するマウスを一晩絶食させた後、オリーブオイルを強制経口投与し（10ml/kg)、続いて尾静脈血中の血清ＦＦＡおよびＴＧレベルを測定した。グレリン処置マウスについては、グレリン投与の１時間後に、マウスにオリーブオイルを与えた。腹腔内脂肪負荷試験のために、マウスに２００μＬのイントラリピッド２０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）脂肪エマルジョンを腹腔内注射した。耐糖能試験は 6 時間の絶食期間の後に行った。血中グルコース濃度を、腹腔内グルコース注射（1g/kg）の前後および 15,30,60,120 および 180 分後に測定した。

（３）トリオレイン由来 3 H 放射能の臓器分布
経口脂肪耐性試験は、[９，１０−３Ｈ（Ｎ)]　- トリオレイン（３７０ｋＢｑ／一匹）と共に１００μＬのオリーブオイルを強制経口投与することによって実施した。放射能測定のために、臓器および血液サンプルを SOLVABLE（10 mg 臓器あたり 0.1 mL; PerkinElmer）に可溶化し、200μL をシンチレーション液でカウントし、トリグリセリドに富むリポタンパク質（TRL）の取り込みを１分あたりの崩壊数（dpm）として計算した。

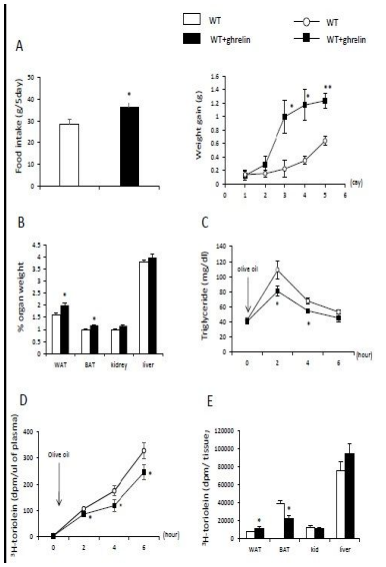
（４）マウス内皮細胞の単離
細胞間接着分子−２（ＩＣＡＭ－２）および血小板 - 内皮接着分子−1（ＰＥＣＡＭ－１）に対するＤｙｎａｂｅａｄ結合抗体（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ）を用いて副睾丸白色脂肪組織から微小血管内皮細胞を単離した。

（５）カイロミクロン（CM）産生
4 匹の 16 時間絶食マウスに 1000μg/ g の F-127 を腹腔内注射してリポタンパク質リパーゼ（LPL）活性を阻害した。F-127 注射の２分後、マウスにオリーブオイルを強制経口投与して、腸のＣＭ産生を測定した。投与前（０時間）および後（１および２時間）に血液を採取し、血中中性脂肪値を酵素的に測定した。

（６）ヘパリン投与後の血漿中の LPL 活性の測定
オリーブオイルを投与してから２時間半後に、マウスにヘパリンナトリウム(２００Ｕ)を腹腔内注射した。30 分後、静脈穿刺を行い、血漿を単離して凍結し、そしてリパーゼ活性を LPL Activity Assay Kit（Cell Biolabs、Inc.）を用いてアッセイした。

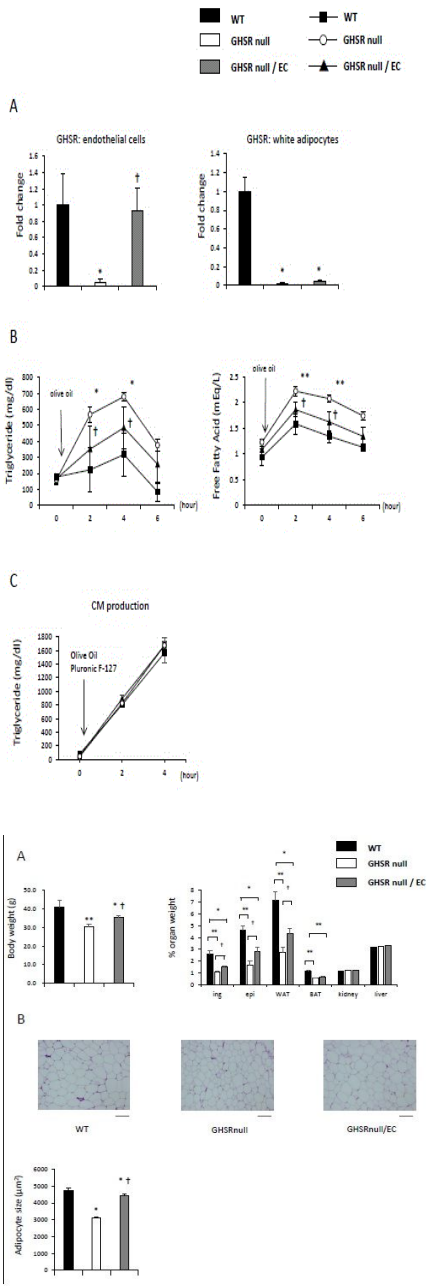
４．研究成果

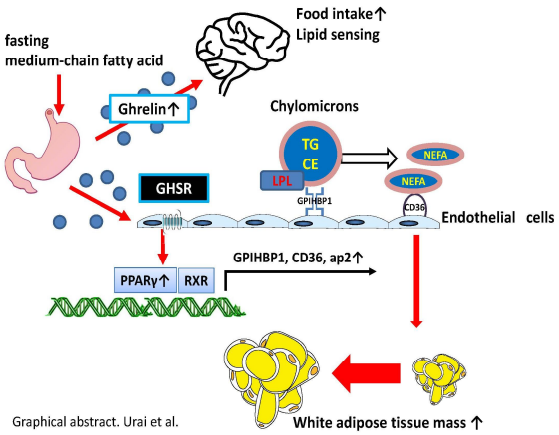
まず、グレリンの血清脂質に対する影響について検討を行った。グレリンを 5 日間投与すると摂餌量が増加し、体重は増加し白色脂肪重量は増加した（右図)。野生型マウスにおいてオリーブオイル負荷後の血中トリグリセリド（TG）は低下し、ＴＧクリアランスを増加させた。ラジオアイソトープ（RI）標識された 3H-triolein を経口投与し脂質の臓器分布を検討したが、白色脂肪において増加していた。GHSR 欠損マウスではこれらの効果は認められなかった。一方、GHSR 欠損マウスにおける脂質経口投与後の遊離脂肪酸



（FFA）および TG 値は、野生型マウスと比較して有意に高かった。高脂肪食摂取後の白色脂肪組織（WAT）の重量は、GHSR 欠損マウスで有意に減少し、白色脂肪組織への脂質の取り込みが GHSR 欠損マウスで減少していると考えられた。Cre-loxP システムを用いて、GHSR 欠損マウスの内皮細胞に選択的に GHSR を発現するトランスジェニックマウス（GHSR-EC マウス）を作製し、これらのマウスと GHSR 欠損マウスおよび対照マウスを比較した。まず、GHSR の発現を real time PCR で検討したところ、血管内皮細胞では GHSR-EC マウスで発現の回復が認められたが、白色脂肪細胞では発現の回復が認められなかった（右図）。

経口脂質負荷後 2 時間の GHSR 欠損マウスの血中 TG 値は 566.8±50.9mg/dl で対照マウス 221.6±141.9mg/dl と比較して上昇した。GHSR 欠損マウスで認めた血中 TG の上昇は、GHSR-EC マウスで 351.4±135.7mg/dl と有意に低下した。また、血中のＣM産生には３群間で有意な差は認められなかった。次にラジオアイソトープ（RI）標識された 3H-triolein を経口投与し WAT での脂質の取り込みを評価した。GHSR 欠損マウスは対照マウスマウスと比較して WAT での RI の取り込みが減弱し、GHSR-EC マウスでは、GHSR 欠損マウスで低下した RI の取り込みが回復した。さらに高脂肪食負荷後の GHSR 欠損マウスの体重及び WAT 重量は対照マウスと比較して有意に減少したが、高脂肪食負荷した GHSR 欠損マウスの白色脂肪細胞面積は野生型と比較して縮小した。GHSR 欠損マウスで認めた脂肪細胞の縮小は GHSR-EC マウスでは拡大した。GHSR-EC マウスは、WAT における血清リポタンパク質リパーゼ活性および脂質取り込みを回復させ、WAT 重量を増加させたものと考えられた。培養内皮細胞では、グレリン刺激により FFA の取り込みと、Cd36、Ap2、および Gpihbp1 などの脂質取り込み遺伝子の発現を増加させた。これらの効果は GHSR 欠損マウス由来の内皮細胞では観察されなかった。siRNA により PPARγをノックダウンさせた内皮細胞を用いた実験では、グレリン/GHSR シグナルが内皮の PPARγを介して FFA の取り込みを促進することを明らかにした。以上の検討により内皮 GHSR が内皮機能において重要な役割を果たし、グレリンに反応して脂質代謝、白色脂肪重量を制御すると考えられた（下図）。





Graphical abstract. Urai et al.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　０　件）

〔学会発表〕（計　３　件）
①浦井秀徳、神田武志、小松素明、黒河内新、高橋利奈、長谷川一宏、徳山博文、脇野修、伊藤裕
血管内皮グレリン受容体は白色脂肪組織での脂質の取り込みを増加させ体重増加に寄与する
第 19 回日本抗加齢学会
2019 年

②神田 武志，脇野 修，伊藤 裕
グレリン、レプチンは血管内皮細胞を介して白色脂肪組織での脂質の取り込みを調節する
第 22 回日本心血管内分泌学会
2018 年

③浦井 秀徳，神田 武志，小松 素明，長谷川 一宏，徳山 博文，脇野 修，伊藤 裕
血管内皮グレリン受容体は白色脂肪組織での脂質の取り込みを制御する
第 21 回日本心血管内分泌学会
2017 年

〔図書〕（計　０　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０　件）

○取得状況（計　０　件）

〔その他〕
ホームページ等
http://keio-emn.jp/research/group1/

６．研究組織

(1)研究分担者　なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：伊藤　裕
ローマ字氏名：ITOH, Hiroshi

研究協力者氏名：脇野　修
ローマ字氏名：WAKINO, Shu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。