

高血圧肥満ラット(SHR/NDmc-cp)の脂肪組織における ホルモン刺激による中性脂肪分解能の検討

張替 直輝

武庫川女子大学薬学部

はじめに

近年、豊かさゆえの美食や飽食、欧米型の高カロリー食品の摂取、運動不足などのライフスタイルの変化に伴って、脂質や糖質などの代謝異常が集積したメタボリックシンドロームが増加している。メタボリックシンドロームは、腹周囲径増大、中性脂肪高値、HDL 低値、血圧高値、空腹時血糖高値の中の3項目以上を集積した状態と定義され、個々の疾患による傷害の程度は軽度であっても集積することで心血管症の発病の危険度が上昇する。従って、このメタボリックシンドロームの病態は、一つのメカニズムや一つの分子の異常だけでなく、個々の疾患の複合で生じる異常についても考慮しなくては説明することはできない。複合疾患の代表として高血圧と肥満が挙げられる。両疾患は正の相関を示すことから、肥満が高血圧の有病率と発症率に関係するとされている。この両疾患に関わる機構として交感神経系と視床下部-下垂体-副腎皮質軸が挙げられる。しかし、この両者の亢進は血圧上昇と脂肪分解を起こすことから、これらの機構の側面からは高血圧と肥満の両立を説明することは難しい。

この問題を探索する手段の一つに動物モデルを使用した解析が挙げられる。高血圧を自然発症する SHR ラットは未だにその発症要因は完全に解明されていない。しかし、その高血圧の発症に副腎が関与することやストレス時の血圧上昇に関与する第一染色体に異常があることから、交感神経系と視床下部-下垂体-副腎皮質軸が高血圧に関与していることが示唆される。その SHR ラットに Leptin の受容体異常(cp/cp)を導入した SHR/NDmc-cp ラットは高血圧と肥満を呈する。そこで、これらのラットを使用して脂肪組織での代謝制御を検討することにより、交感神経系と視床下部-下垂体-副腎皮質軸の側面から、高血圧と肥満が両立する機構を探索した。

1. 生理学パラメーターと白色脂肪組織の特徴

本研究では、12週齢の雄の WKY ラット、SHR/NDmc-cp (+/+)ラット、SHR/NDmc-cp (cp/cp)ラットを使用し、各群4匹で検討した。cp/cp は、WKY と比べて収縮期血圧が有意に増加し、更に、WKY や+/+ と比べて体重も有意に増加した(Table 1)。白色脂肪組織においても、cp/cp は WKY や+/+ と比べて、精巣周囲、後腹膜、腸管膜、皮下の各領域で重量の増加と細胞の肥大を呈し、腸管膜と皮下においては Glyceride 含量も増加した。このように、cp/cp は高血圧と肥満の両方を呈する動物モデルであることが確認できた。

Table 1. Physiological parameters and characteristics of white adipose tissue in WKY, SHR/NDmc-cp(+/+) and SHR/NDmc-cp(cp/cp) rats

	WKY	SHR/NDmc-cp(+/+)	SHR/NDmc-cp(cp/cp)
Body weight (g)	344.3 ± 11.0	335.3 ± 5.4	451.0 ± 28.0 *,#
Blood pressure (mmHg)	106.8 ± 14.4	160.0 ± 11.3 *	143.7 ± 18.6 *
Adipose tissue			
Weight (g)			
Epididymal	4.94 ± 0.32	3.40 ± 0.26 *	8.76 ± 0.70 *,#
Retroperitoneal	6.05 ± 0.53	4.50 ± 0.23	13.55 ± 1.92 *,#
Mesentric	2.83 ± 0.26	2.65 ± 0.18	6.61 ± 0.86 *,#
Subcutaneous	8.81 ± 0.82	8.52 ± 0.53	42.12 ± 1.78 *,#
Cell size (μm)			
Epididymal	79.5 ± 7.1	87.0 ± 3.7	136.9 ± 7.1 *,#
Retroperitoneal	92.1 ± 3.2	88.4 ± 6.9	135.6 ± 11.9 *,#
Mesentric	63.8 ± 5.0	69.3 ± 5.4	127.3 ± 15.2 *,#
Subcutaneous	70.3 ± 9.0	70.2 ± 4.3	137.5 ± 14.1 *,#
Glycerides (μmol/tissue mg)			
Epididymal	1.06 ± 0.06	1.04 ± 0.08	1.12 ± 0.08
Retroperitoneal	0.99 ± 0.07	1.01 ± 0.08	0.99 ± 0.11
Mesentric	0.89 ± 0.04	0.90 ± 0.08	1.07 ± 0.09 *,#
Subcutaneous	0.72 ± 0.25	0.61 ± 0.10	1.06 ± 0.10 *,#

Values are mean ± SD (n=4). Comparisons between each animal were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher PLSD test. * p<0.05 vs. WKY. # p<0.05 vs. SHRNDmc-cp(+/+).

2. ホルモンによる中性脂肪分解

各ラットの精巣周囲、後腹膜、腸管膜、皮下の各脂肪組織に対して、Norepinephrine (NE) 及び Adrenocorticotropic hormone (ACTH) による脂肪分解能を Glycerol 放出量にて検討した。脂肪組織 100 mg に対して 3 % BSA 含有 Krebs-Ringer buffer (1.15 mM Ca, pH 7.4) 900 μ L を加えてハサミで刻み、懸濁液を作製した。0.01mM と 0.1mM NE、0.5U と 5U ACTH の終濃度になるように各々調整した溶液を組織懸濁液に添加した。また、同様の検討を終濃度 0.1mM Isobutylmethylxanthine (IBMX) の存在下でも検討した。その懸濁液を 95 % O₂-5 % CO₂ 通気下で 37 °C 60 分間振盪後、溶液を回収し、溶液中の Glycerol 量を酵素 (Glycerol dehydrogenase) 法にて測定した。

一方、肥満に伴い脂肪細胞は肥大化するため、各脂肪組織で組織重量あたりの細胞数は異なると考えられる。それを補正するため、各脂肪組織 100 mg から DNA を Phenol/Chloroform 抽出し、260 nm の吸光度にて算出した。各脂肪懸濁液から得られた Glycerol 量と DNA 量の比を算出し、vehicle と各ホルモンのその比率の差を Glycerol 放出量 (Glycerol μ g / DNA μ g) とした。

WKY と +/+ の精巣周囲、後腹膜、腸管膜の各脂肪組織では、NE 添加で Glycerol 放出量が有意に増加し、精巣周囲と腸管膜では ACTH 添加でも有意に増加した (Table 2)。一方、WKY と +/+ の皮下脂肪では NE や ACTH 添加で Glycerol 放出量に変化がなく、皮下脂肪では NE などのホルモン刺激による脂肪分解能が低いという従来の報告と一致した。脂肪分解シグナルの cAMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼを阻害する IBMX の併用において、WKY と +/+ の精巣周囲、後腹膜、腸管膜の各脂肪組織では NE や ACTH 添加による Glycerol 放出量が増加することから、これらのホルモンの脂肪分解は従来の報告通り cAMP を介するものと考えられた。

一方、cp/cp の精巣周囲や後腹膜では、NE 添加で Glycerol 放出量は変化しなかった。腸管

膜では NE 添加で Glycerol 放出量が有意に増加したが、WKY や +/+ と比べてその増加は約半分以下であった。また、ACTH 添加では各脂肪組織で Glycerol 放出量は変化しなかった。ホルモン刺激による Glycerol 放出が低下する現象は IBMX 存在下でも起こることから、cAMP よりも下流の脂肪分解シグナルの異常が cp/cp の脂肪分解能低下の要因の一つになっていると考えられた。

Table 2. Hormone stimulated glycerol releases and effects of 0.1mM isobutylmethylxanthine (IBMX) on the releases in WKY, SHR/NDmc-cp(+/+) and SHR/NDmc-cp(cp/cp) rats

		Norepinephrine		ACTH	
		0.01 mM	0.1mM	0.5U	5U
Epididymal adipose tissue					
WKY	None	0.97 ± 0.19 **	1.47 ± 0.32 **	0.66 ± 0.22 **	0.68 ± 0.53 **
	IBMX	2.74 ± 0.34 **	2.68 ± 0.45 **	2.21 ± 0.59 **	2.54 ± 0.47 **
SHR/NDmc-cp(+/+)	None	1.10 ± 0.27 **	1.68 ± 0.43 **	0.68 ± 0.08 **	0.88 ± 0.10 **
	IBMX	2.14 ± 0.70 **	2.12 ± 0.66 **	1.56 ± 0.24 **	1.61 ± 0.31 **
SHR/NDmc-cp(cp/cp)	None	0.18 ± 0.42	0.75 ± 0.40	0.50 ± 0.53	0.66 ± 0.45
	IBMX	0.73 ± 0.37	1.01 ± 0.24	0.39 ± 0.75	0.41 ± 0.27
Retroperitoneal adipose tissue					
WKY	None	1.02 ± 0.35 **	1.43 ± 0.55 **	0.10 ± 0.20	0.42 ± 0.15
	IBMX	1.54 ± 0.77 **	1.90 ± 0.60 **	1.26 ± 0.30 **	1.05 ± 0.45 *
SHR/NDmc-cp(+/+)	None	1.55 ± 0.59 **	2.71 ± 0.79 **	1.36 ± 0.38 *	1.46 ± 0.54 **
	IBMX	2.62 ± 1.01 **	3.34 ± 0.43 **	2.28 ± 0.44 **	2.03 ± 0.54 **
SHR/NDmc-cp(cp/cp)	None	0.21 ± 0.11	0.41 ± 0.22	-0.12 ± 0.28	0.12 ± 0.35
	IBMX	0.36 ± 0.16	0.37 ± 0.35	0.22 ± 0.55	0.11 ± 0.27
Mesenteric adipose tissue					
WKY	None	1.68 ± 0.78 **	2.02 ± 0.72 **	0.96 ± 0.66 *	1.00 ± 0.70 *
	IBMX	2.92 ± 0.69 **	3.19 ± 0.31 **	2.92 ± 0.73 **	2.33 ± 0.53 **
SHR/NDmc-cp(+/+)	None	2.40 ± 0.51 **	2.98 ± 0.36 **	1.39 ± 0.34 **	1.55 ± 0.44 **
	IBMX	3.47 ± 0.32 **	3.69 ± 0.55 **	3.62 ± 0.28 **	3.61 ± 0.50 **
SHR/NDmc-cp(cp/cp)	None	0.61 ± 0.33 *	1.04 ± 0.13 **	0.33 ± 0.30	0.41 ± 0.32
	IBMX	1.29 ± 0.12 **	1.10 ± 0.39 **	0.95 ± 0.31 **	0.84 ± 0.27 **
Subcutaneous adipose tissue					
WKY	None	0.01 ± 0.10	0.02 ± 0.10	-0.07 ± 0.09	-0.03 ± 0.16
	IBMX	0.57 ± 0.16	0.57 ± 0.21	0.28 ± 0.14	0.42 ± 0.16
SHR/NDmc-cp(+/+)	None	0.30 ± 0.31	0.45 ± 0.30	0.00 ± 0.27	0.04 ± 0.18
	IBMX	0.96 ± 0.53	1.01 ± 0.62	0.71 ± 0.47	0.89 ± 0.54
SHR/NDmc-cp(cp/cp)	None	-0.05 ± 0.17	0.25 ± 0.39	-0.16 ± 0.18	-0.08 ± 0.21
	IBMX	0.46 ± 0.24	0.58 ± 0.36	0.44 ± 0.13	0.27 ± 0.27

Glycerol releases are represented by the difference of ratio of glycerol to DNA between vehicle and hormonal stimulation groups (Δ Glycerol μ g/ DNA μ g). Values are mean \pm SD (n=4). Comparisons to vehicle group were analyzed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni test. * p< 0.05, ** p<0.01 vs. vehicle.

3. 脂肪分解に関する遺伝子の発現量

cp/cp の脂肪組織でホルモン刺激による脂肪分解能が低下している要因を解明するため、NE と ACTH に対するレセプターである adrenergic receptor 3 (Adrb3) と melanocortin receptor 2 (Mc2r) や cAMP 以降の脂肪分解シグナルで脂肪分解に重要な役割を果たしている Perilipin (Plin) と Hormone sensitive lipase (Hsl) の遺伝子発現量を定量 PCR で検討した。各ラットの精巣周囲、後腹膜、腸管膜、皮下の各脂肪組織から、Sepasol RNA I super (Nacalai tesque) で RNA を抽出し、SYBR RT-PCR kit (Takara) で cDNA 作製と PCR 試料調整をし、ABI PRISM7000 (Applied biosystems) で定量 PCR を行った。各プライマーは Entrez Nucleotides database で取得した配列より作製し、電気泳動及び解離曲線で特異性を確認し、RNA 相当量 0.5 ng から 32 ng の cDNA 量の範囲で作製した検量線が p = 0.99 以上の相関性であることを確認した。各脂肪組織の各遺伝子発現量は β -Actin 発現量で補正した。

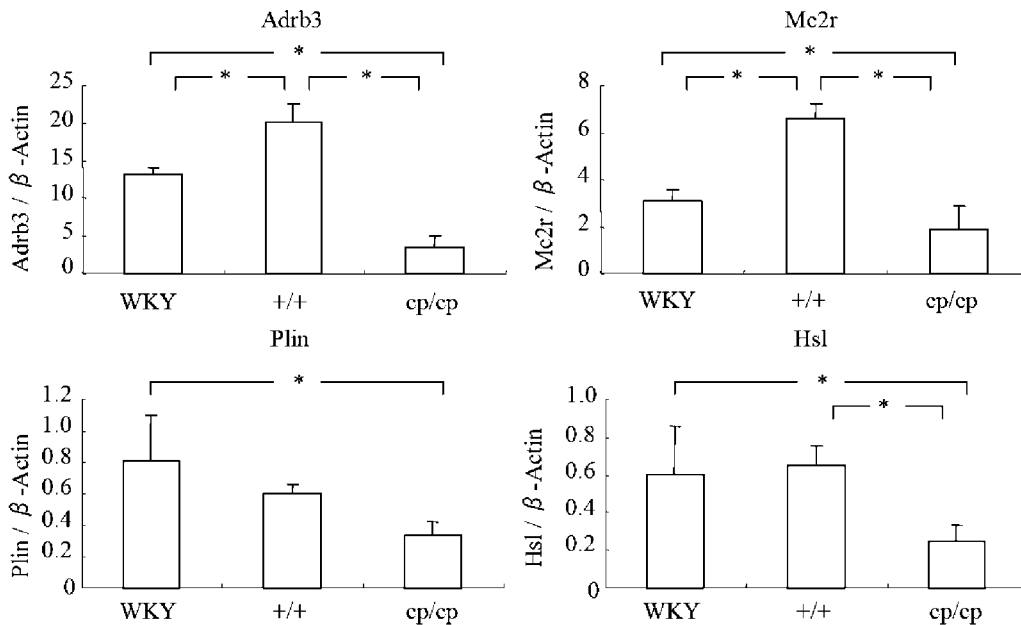


Fig. 1. Differences of β 3-adrenergic receptor (Adrb3), melanocortin receptor 2 (Mc2r), perilipin (Plin) and hormone sensitive lipase (Hsl) mRNA expressions in epididymal adipose tissue in WKY, SHR/NDmc-cp(+/+) and SHR/NDmc-cp(cp/cp) rats. Values are mean \pm SD (n=4). Comparisons between each animal were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher PLSD test. * p<0.05.

精巣周囲脂肪において、+/+はWKYに比べてAdrb3及びMc2r発現が有意に増加し(Fig. 1)、この増加は他の脂肪組織でもほぼ同様に生じた。この結果は、精巣周囲、後腹膜、腸間膜の脂肪組織において、NEとACTH添加に伴うGlycerol放出量が+/+の方がWKYよりも多いことと一致した。一方、cp/cpでは、+/+で生じたAdrb3及びMc2r発現の増加が各脂肪組織で消失した。この結果は、精巣周囲、後腹膜、腸間膜の脂肪組織において、WKYと+/+で認められるNEとACTH添加に伴うGlycerol放出がcp/cpで認められないことと一致した。更に、精巣周囲の脂肪組織において、cp/cpでは+/+に比べてHslの発現が有意に低下し(Fig. 1)、この低下は他の脂肪組織でも同様に生じた。また、腸管膜と皮下脂肪組織においては、Plinの発現も有意に低下した。これらの結果は、cp/cpでホルモン刺激によるGlycerol放出が低下する現象がIBMX存在下でも起こることと一致した。

本研究で、高血圧と肥満の両方を起こすcp/cpの脂肪組織では、NEとACTH刺激による脂肪分解が低下していることが明らかになった。更に、cp/cpではNEとACTHに対するレセプターやcAMP以降のシグナルで脂肪分解に重要な蛋白質の遺伝子の発現が減弱していることが明らかになり(Fig. 2)、それらの遺伝子発現の低下が脂肪分解の低下に関与している可能性が考えられた。

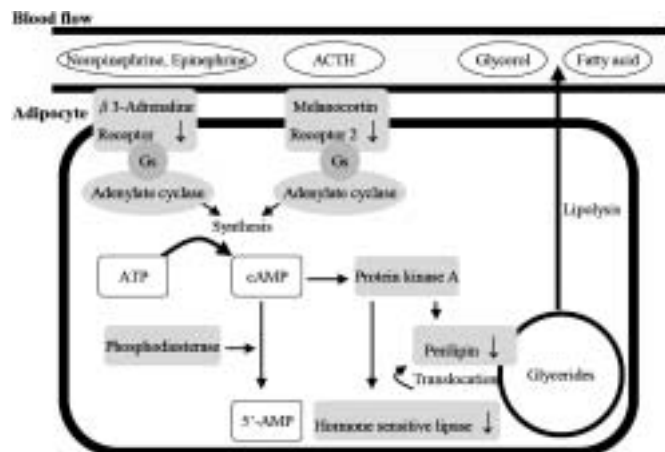


Fig. 2. Schematic diagram of hormonal regulation of lipolysis in white adipose tissue. Decreases of β 3-adrenaline receptor, melanocortin receptor 2, perilipin and hormone sensitive lipase gene expressions in SHR/NDmc-cp(cp/cp) rats.

結語

高血圧のみを示す+/+では、脂肪組織の Adrb3 及び Mc2r 発現が増加していることから、交感神経系と視床下部-下垂体-副腎軸の両機構で脂肪分解が起こり易い状態であった。一方、高血圧と肥満の両方を呈する cp/cp では、+/+で認められた Adrb3 及び Mc2r 発現の増加が消失し、両機構による脂肪分解は抑制されていた。これらのことから、両機構の側面から見たときに、+/+では高血圧と肥満の両立が難しく、cp/cp では高血圧と肥満が両立し易い状態であると考えられた。この高血圧と肥満が両立し易い状態を解析することは、メタボリックシンドロームの予防及び治療に繋がるものと思われる。今後、これらの動物の脂肪以外の組織に対しても交感神経系と視床下部-下垂体-副腎軸の側面から検討し、高血圧と肥満の複合病変の病態を更に解析したいと考えている。

研 究 業 績 目 録

(学会口頭発表)

張替直輝, 扇間昌規, 市川 厚

高血圧肥満ラット(SHR / NDmc-cp)の脂肪組織におけるホルモン刺激による中性脂肪分解能
の検討

日本薬学会第 125 年会 (東京)