

肥満糖尿病病態に対する抗血小板薬シロスタゾールの新規改善作用と
その病態形成における脂肪血管新生誘導機構の解明

2017年3月

富山大学大学院医学薬学教育部

博士後期課程 薬科学専攻

小野木 康弘

目次

緒論.....	1
第1章 本研究の背景と目的.....	2
第1節 本邦における肥満症および糖尿病の罹患率の増加と治療上の課題.....	2
第2節 インスリンシグナル.....	2
第3節 脂肪組織肥大化に伴う慢性炎症とインスリン抵抗性.....	3
第4節 シロスタゾールの薬理作用.....	3
第5節 脂肪組織肥大化における血管新生の意義.....	4
第6節 本研究の目的.....	5
第2章 2型糖尿病モデルマウスに対するシロスタゾール投与が脂肪組織の慢性炎症およびインスリン抵抗性に与える影響.....	6
第1節 目的.....	6
第2節 実験方法.....	6
第1項 実験試薬.....	6
第2項 実験動物.....	6
第3項 糖・インスリン負荷試験.....	6
第4項 組織化学的解析.....	7
第5項 Real-time PCR.....	7
第6項 RAW264.7細胞および3T3-L1脂肪細胞の培養.....	7
第7項 インスリン誘導性2-deoxyglucose取り込みの測定.....	8
第8項 Western blotting.....	8
第10項 統計解析.....	8
第3節 結果.....	9
第1項 シロスタゾール投与による耐糖能およびインスリン感受性の変化.....	10
第2項 シロスタゾールの投与による脂肪組織の形態変化.....	11
第3項 シロスタゾールの投与による脂肪組織の炎症性サイトカイン発現の変化.....	12
第4項 培養脂肪細胞のTNF α 誘発性糖取り込み減少に対するシロスタゾールの効果.....	13
第5項 培養脂肪細胞のTNF α 誘発性インスリンシグナル低下に対するシロスタゾールの効果.....	14
第6項 培養脂肪細胞におけるシロスタゾールによるインスリンシグナル改善効果に対するPKA阻害剤とPPAR γ 拮抗薬の影響.....	15
第7項 培養マクロファージのLPS誘発性炎症性変化に対するシロスタゾールの効果.....	16
第4節 考察.....	17
第5節 小括.....	18

第3章 肥満病態形成におけるペリサイトの動的变化を起点とした	
脂肪血管新生誘導機構の解明	20
第1節 目的	20
第2節 実験方法	20
第1項 実験試薬	20
第2項 実験動物	20
第3項 核磁気共鳴画像法 MRI による体組成の解析	20
第4項 小動物用代謝計測システムによるエネルギー代謝の計測	22
第5項 糖・インスリン負荷試験	22
第6項 正常血糖高インスリンクランプ試験	22
第7項 骨髄由来マクロファージの培養	22
第8項 マウス胎仔線維芽細胞の培養	22
第9項 脂肪組織片の培養	23
第10項 脂肪細胞と間質血管細胞分画の分離	23
第11項 Flow cytometry を用いた細胞分析と細胞分取	23
第12項 組織化学的解析および免疫組織化学的解析	24
第13項 免疫蛍光染色法による組織学的解析	24
第14項 Real-time PCR	25
第15項 Western blotting 法	26
第16項 統計解析	26
第3節 結果	27
第1項 高脂肪食負荷による血管新生関連因子の発現変化	27
第2項 全身性 <i>Pdgfrb</i> 欠損マウスを用いた実験のプロトコールと欠損効率	29
第2項 <i>Pdgfrb</i> 欠損による体重推移および体脂肪蓄積の変化	30
第3項 <i>Pdgfrb</i> 欠損マウスの脂肪細胞の形態変化	31
第4項 <i>Pdgfrb</i> 欠損による脂肪細胞分化と細胞増殖の変化	32
第5項 <i>Pdgfrb</i> 欠損による肥大化脂肪組織の慢性炎症の変化	33
第6項 <i>Pdgfrb</i> 欠損による脂肪組織の血管密度と血管構造の変化	35
第7項 脂肪血管ペリサイトの局在変化における PDGFR β シグナルの役割	35
第8項 高脂肪食負荷により脂肪組織で増加する PDGF-B の産生細胞の探索	38
第9項 <i>Pdgfrb</i> 欠損による異所性脂質蓄積の変化	40
第10項 <i>Pdgfrb</i> 欠損によるエネルギー消費の変化	40
第11項 <i>Pdgfrb</i> 欠損による糖代謝の変化	40
第4節 考察	43
第5節 小括	45
総括	46
参考文献	48
謝辞	54

緒論

肥満は2型糖尿病による心血管疾患の発症リスクを著しく高める。現在、本邦では男性の4人に1人、女性の5人に1人は肥満である。超高齢社会を迎えた本邦において、罹病期間の長期化から糖尿病性合併症および心血管疾患の深刻化が懸念される。高齢者の糖尿病治療の問題点として、インスリンやスルホニル尿素薬による重症低血糖、尿糖排泄薬剤による脱水および筋力低下が挙げられる。さらに、高齢者では脱水の併発や腎機能低下を考慮して、インスリン抵抗性改善系に分類されるピグアナイドの使用も制限される。肥満2型糖尿病の基盤病態である脂肪組織肥大化に伴うインスリン抵抗性を治療標的とした新たな薬剤は、高齢者糖尿病を治療する際のこれらの問題を解決し、現代の社会ニーズに合致した治療に繋がる可能性が考えられる。また医療経済の視点から、既存薬の新規薬効を見出し、糖尿病治療の課題を解決することも重要である。

肥満によるインスリン抵抗性の誘導機構として、脂肪組織における慢性炎症が提唱されている。過剰なエネルギー摂取により肥大化した脂肪組織からはケモカインが分泌され、炎症性マクロファージの浸潤を導く。炎症性マクロファージが産生する炎症性サイトカインは脂肪細胞の炎症性変化を誘導するため、マクロファージと脂肪細胞との間に悪循環が形成され、慢性炎症が進展する。また、脂肪組織の慢性炎症は全身へと波及し、肝臓の糖産生の亢進および骨格筋と脂肪細胞での糖取り込みの減少により、持続的な高血糖が惹起される。したがって、脂肪組織の慢性炎症を是正する薬剤は、全身のインスリン抵抗性を改善することが期待される。

肥満の進展において、脂肪組織を栄養する血管の新生は脂肪組織肥大化の律速段階である。脂肪細胞の増大による局所的な低酸素状態は、血管新生因子の産生とこれに伴う血管新生を誘導し、脂肪組織のさらなる肥大化を促す。成熟した毛細血管では、ペリサイト（周皮細胞）が血管内皮細胞によって形成される管腔を被覆し、血管内皮細胞の増殖活性を抑制するため、血管新生は静止状態にある。したがって、成熟血管からのペリサイトの離脱が、血管新生の静止状態から活性化状態への契機となると考えられる。しかしながら、脂肪組織の肥大化において血管構造が再構築される誘導機構は不明である。

抗血小板薬シロスタゾールは動脈硬化に起因する慢性動脈閉塞症に対する治療薬であり、基礎疾患として肥満、脂質異常および糖尿病を有する患者に対し用いられている。今までの報告により、シロスタゾールはインスリン抵抗性改善作用を有する可能性が示唆されることから、本検討では、第2章において肥満に伴う脂肪組織の慢性炎症と糖代謝異常に対するシロスタゾールの改善効果につき検証した。また、肥満は脂肪組織の慢性炎症進展の主要因であり、その病態理解のために脂肪組織肥大化の機序の解明が重要である。しかし、脂肪組織の環境変化に応答した血管新生の誘導機構は未知な点が多い。血管新生因子のひとつ platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) はペリサイトに発現する受容体 PDGF- β receptor (PDGFR β) に作用し、ペリサイトの走化性を調節する。そこで、第3章ではペリサイトの動的变化に着目し、脂肪組織肥大化に伴う血管新生および糖代謝に対する PDGFR β の関与について検討した。脂肪組織肥大化と慢性炎症のメカニズムを明らかにすることで、インスリン抵抗性改善を標的とした治療戦略の有用性を探究した。

第1章 本研究の背景と目的

第1節 本邦における肥満症および糖尿病の罹患率の増加と治療上の課題

厚生労働省が5年ごとに実施する糖尿病の有病率に関する国民健康・栄養調査によると、平成24年の時点においてわが国では糖尿病が強く疑われる人は950万人とされており、これは成人男性の15.2%、女性の8.7%に該当する。さらに、糖尿病の可能性を否定できない人を含めると2050万に上ると推計され、成人の5人に1人は糖尿病または糖尿病予備軍であると考えられる（厚生労働省、平成24年「国民健康・栄養調査」）。日本の糖尿病患者の90%以上は2型糖尿病であり、その病態はインスリン抵抗性とインスリン分泌能の低下に基づく持続的な高血糖である（清野ほか、2012）。2型糖尿病の発症には遺伝的素因に加え、過食や運動不足による肥満が重要な要因であると考えられている。平成27年国民健康・栄養調査によれば、成人男性の4人に1人、女性の5人に1人が肥満であると報告されている（厚生労働省、平成27年「国民健康・栄養調査」）。肥満は耐糖能障害、脂質異常症および高血圧症などの病態が集積するメタボリックシンドロームを誘引し、糖尿病発症の原因となる（Mukai et al., 2009; Sasaki et al., 2010）。さらにこれらの疾患は、動脈硬化を背景とした心血管イベント発症の危険因子となることから（清野ほか、2012）、肥満によるインスリン抵抗性を是正することは重要な課題である。さらに、超高齢社会を迎えた本邦において、罹病期間の長期化から糖尿病性合併症（神経症、腎症、網膜症）および心血管疾患の深刻化が懸念される。これらの疾患は著しい生活の質の低下を招くため、食事療法、運動療法および薬物療法による良好な血糖コントロールが求められる。しかし、高齢者の糖尿病薬物治療の問題点として、インスリンやスルホニル尿素薬による重症低血糖、尿糖排泄薬剤による脱水および筋力低下（サルコペニア）が挙げられ、また脱水の併発や腎機能低下を考慮しインスリン抵抗性改善系に分類されるビッグアナイドの使用も制限される。そのため、インスリン抵抗性の改善を標的とした新たな作用機序を有する薬剤が期待される。

第2節 インスリンシグナル

食物摂取による血糖値の上昇に伴い膵β細胞から分泌されたインスリンは肝臓、骨格筋および脂肪細胞などのインスリン標的組織のインスリン受容体に結合することで細胞内シグナルを活性化し、血糖降下作用を示す（Saltiel et al., 2001）。インスリンが結合した insulin receptor (IR) はチロシンキナーゼ活性により自己リン酸化するとともに、IR substrate (IRS) のチロシン残基のリン酸化を導く。リン酸化 IRS によって活性化された phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) は、細胞膜構成リン脂質の phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂) を Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PIP₃) へ変換する。PIP₃は3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) に結合し、Akt の Thr308 残基をリン酸化する。また Akt は、mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) により Ser473 残基がリン酸化されることで、完全な酵素活性を示す。筋細胞および脂肪細胞における Akt の活性化は glucose transporter (GLUT) 4 を細胞内から細胞膜へ移行させ、糖取り込みを誘導する。またインスリンは、脂肪細胞の脂肪分解を抑制し中性脂肪の合成を促進させることで、エネルギー貯蔵に働く。

第3節 脂肪組織肥大化に伴う慢性炎症とインスリン抵抗性

肥満による全身のインスリン抵抗性の病態形成には、脂肪組織における慢性炎症が関与することが明らかになってきた。脂肪組織内の微小環境は、さまざまな免疫細胞が相互作用することで均衡が保たれているが、脂肪組織の慢性炎症におけるマクロファージの役割について、現在注目が集まっている。脂肪組織のマクロファージは機能的に、炎症性活性を有する M1-マクロファージと抗炎症性活性を有する M2-マクロファージに大別される。*In vitro* 実験系において、M1-マクロファージは、lipopolysaccharide (LPS) または interferon (IFN) γ などの Th1 サイトカインによって活性化され、tumor necrosis factor (TNF) α および interleukin (IL)-6 などの炎症性サイトカインを産生する (Mantovani et al., 2004; Lumeng et al., 2007)。一方、M2-マクロファージは、IL-4 または IL-13 などの Th2 サイトカインによって活性化し、IL-10 などの抗炎症性サイトカインを産生する (Mantovani et al., 2004)。また脂肪組織において、M1 マクロファージは cluster designation (CD) 11c、M2 マクロファージは CD206 に代表される固有の細胞表面抗原を発現する (Fujisaka et al., 2009 and 2013)。

正常な脂肪組織では M2-マクロファージが常在し、インスリン感受性の維持に関与する (Lumeng et al., 2007)。一方、肥大化した脂肪組織では monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 の産生が高まるため、M1-マクロファージは脂肪組織へと遊走し、炎症性サイトカインを産生することで、インスリン抵抗性の誘導に関わる (Kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006)。マクロファージは細胞死に至った脂肪細胞の周囲に集積し、crown-like structure (CLS) と呼ばれる特徴的な組織臓を呈する (Murano et al., 2008)。肥満患者において、CLS の数はインスリン抵抗性と正相関することが示されている (Apovian et al., 2008)。その機序として、M1-マクロファージから産生される炎症性サイトカインは、脂肪細胞の c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を介して、IRS の Ser307 残基のリン酸化と IRS のタンパク分解を誘導し、インスリン作用を減弱させることが示されている (Gual et al., 2005; Ikubo et al., 2009)。脂肪細胞におけるインスリン作用の減弱は、脂肪分解を亢進させて遊離脂肪酸の分泌を高める。M1-マクロファージは、パターン認識受容体である toll-like receptor (TRL) 4 を介して遊離脂肪酸を認識することで、MCP-1 および TNF α などの炎症性サイトカインを産生する (Shi et al., 2006; Suganami et al., 2007)。これらの結果、肥大化脂肪組織では、マクロファージと脂肪細胞が悪循環を形成し、慢性炎症が進展する。さらに、脂肪組織の慢性炎症は全身へと波及し、肝臓の糖産生の亢進および骨格筋と脂肪細胞での糖取り込みの減少により、持続的な高血糖が惹起される (Hotamisligil et al., 1993; Shoelson et al., 2006)。このように、脂肪組織の慢性炎症において、マクロファージは中心的役割を果たしており、全身のインスリン抵抗性の進展に寄与すると考えられる。

第4節 シロスタゾールの薬理作用

シロスタゾールは血小板凝集抑制作用と末梢血管拡張作用を有する抗血小板薬であり、肥満、脂質異常および糖尿病を基礎疾患とした慢性動脈閉塞症に対する治療薬として使用される。シロスタゾールは受容体を介さず、直接細胞内の cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) 3 活性を選択的に阻害することで、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 濃度を上昇させ、血小板凝集能を抑制する (Gresele et al., 2011)。さらに、シロスタゾールは抗血小板作用に加え、インスリン抵抗性の改善効果を有することが示唆されている。シロスタゾール投与は肥満 2 型糖尿病マウスの血糖値を低下させ、大動脈壁の炎症性サイトカイン産生と酸化ストレスを抑制する (Park et al., 2009)。また、シロスタゾール投与は肥満 2 型糖尿病マウスにおいて、インスリン感受性を亢進させる血清アディポネクチン濃度を上昇させる (Park et al., 2009)。シロスタゾールは PDE3B 活性の抑制作用に加え、

peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ に対するアゴニスト様作用を有することが示されている。PPAR γ は脂肪細胞分化を正に制御するマスターレギュレーターであり、アディポネクチンおよび GLUT4 の発現を調節する転写因子である (Kubota et al., 1999 and 2006)。シロスタゾールは前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化を促進し、GLUT4 発現誘導を介してインスリン誘導性の糖取り込みを亢進する (Park et al., 2008)。しかし、脂肪組織のマクロファージの炎症活性および成熟脂肪細胞のインスリン抵抗性に対するシロスタゾールの直接作用は明らかではない。

第 5 節 脂肪組織肥大化における血管新生の意義

肥満の進展において、脂肪組織を栄養する血管の新生は脂肪組織肥大化の律速段階である。脂肪組織では毛細血管が高度に発達し、酸素、栄養素、血球細胞および骨髄細胞の供給に寄与する (Cao 2010)。脂肪組織の発達段階において、脂肪細胞の新生に先行して血管ネットワークが構築される。また、肥満の進展においても新生血管周囲に脂肪細胞の新生が認められ、脂肪組織の肥大化を規定することが示されている (Bråkenhielm et al., 2004; Kolonin et al., 2004; Nishimura et al., 2007)。このような血管新生は、脂肪細胞の増大による細胞内および組織内の局所的な低酸素状態が引金となり誘導される。肥大化した脂肪組織では、脂肪細胞および間質、特に CLS の M1-マクロファージにおいて低酸素状態にさらされる (Fujisaka et al., 2013)。低酸素部位では、転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF) 1α の安定化と活性化により、vascular endothelial growth factor (VEGF)-A などのさまざまな血管新生因子が誘導される (Gerhardt et al., 2003; Ye et al., 2007)。脂肪組織の発達段階において、血管新生部位に浸潤するマクロファージが血管新生能を有することが示唆されている (Cho et al., 2007)。また脂肪組織の肥大化において、脂肪細胞から分泌される VEGF-A は血管新生を誘導し、組織恒常性の維持に寄与すると考えられる (Elias et al., 2012; Shimizu et al., 2014; Sun et al., 2012; Sung et al., 2013; Robciuc et al., 2016)。このように、脂肪組織の肥大化における血管新生の重要性が示されている。

Platelet-derived growth factor (PDGF)-B は、胎生期の管腔形成、創傷治癒および腫瘍増殖における血管新生に寄与する血管新生因子である (Hosaka et al., 2013; Uhl et al., 2003)。血管内皮細胞によって形成される新生血管は、ペリサイト (周皮細胞) により被覆されることで成熟化する (Armulik et al., 2005)。その際、PDGF-B はペリサイトの走化性を制御する。すなわち、血管内皮細胞由来の PDGF-B はペリサイトに発現する PDGF- β receptor (PDGFR β) を介してペリサイトを誘引し、管腔へのペリサイトの接着を促す (Andrae et al., 2008; Heldin et al., 1999; Lindahl et al., 1997)。成熟血管ではペリサイトが血管内皮細胞の増殖活性を抑制するため、血管新生は静止状態にある。したがって、成熟血管からのペリサイトの離脱が、血管新生の静止状態から活性化状態への契機となると考えられる (Pouyssegur et al., 2006)。しかし、脂肪組織の肥大化において、既に成熟した血管が脱成熟化し、血管新生が誘導されるリモデリング機構の多くは不明である。さらに、PDGF-B/PDGFR β シグナルが脂肪組織の血管新生と全身の糖代謝に与える影響も全く未知である。

第 6 節 本研究の目的

本邦では、肥満患者の増加と寿命の延長から肥満関連疾患の増加と深刻化が懸念されており、肥満病態の解明による新たな治療法の開発戦略の基盤となる知見が求められている。また医療経済の視点から、既存薬の新規薬効を見出し、糖尿病治療の課題を解決することも現代の社会ニーズに合致した戦略と考えられる。本研究では、動脈硬化に起因する慢性動脈閉塞症に対する治療薬として使用される抗血小板薬シロスタゾールに着目した。本薬剤はインスリン抵抗性改善作用を有することが示唆されるため、肥満に伴う脂肪組織の慢性炎症と糖代謝異常に対するシロスタゾールの改善効果について、肥満 2 型糖尿病 db/db マウスを用いて検証した。また、脂肪組織の肥大化には血管新生が深く関わることから、本研究では成熟血管のリモデリング機構におけるペリサイトの役割に着目し、肥満病態との関連が未解明な血管新生因子 PDGF-B の肥満病態における意義につき、PDGFR β コンディショナルノックアウトマウスを用いて検討した。これらの研究成果より、脂肪組織肥大化と慢性炎症の進展メカニズムを明らかにし、インスリン抵抗性改善を標的とした治療戦略の有用性を追究した。

第2章 2型糖尿病モデルマウスに対するシロスタゾール投与が脂肪組織の慢性炎症およびインスリン抵抗性に与える影響

第1節 目的

肥満関連疾患の基盤病態はインスリン抵抗性であり、その要因として脂肪組織における慢性炎症が挙げられる。肥満脂肪組織に浸潤する炎症性マクロファージと脂肪細胞との悪循環は慢性炎症を進展させ、全身の代謝臓器のインスリン抵抗性を惹起する。これまで、シロスタゾールがインスリン抵抗性改善効果と抗炎症効果を示すことが報告されている (Park et al., 2009)。そこで本検討では、肥満糖尿病 db/db マウスに対する長期的なシロスタゾールの投与が、脂肪組織の形態と慢性炎症および全身の糖代謝に与える影響を調べた。さらに、その機序を解明するため、成熟分化した 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、TNF α 誘発性のインスリン抵抗性に対するシロスタゾールの直接的な保護機構について解析した。さらに、RAW264.7 細胞を用いて、シロスタゾールの炎症抑制機構を検討した。

第2節 実験方法

第1項 実験試薬

シロスタゾールは大塚製薬株式会社 (Tokushima, Japan) から提供を受けた。ヒトインスリンは Novo Nordisk (Copenhagen, Denmark) から提供を受けた。ポリクローナル抗リン酸化 Tyr⁶¹² 特異的 IRS1 抗体、モノクローナル抗 Akt 抗体およびポリクローナル抗 TLR4 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。ポリクローナル抗 IRS1 抗体は Millipore (Billerica, MA, USA) から購入した。ポリクローナル抗リン酸化 Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵ 特異的 JNK 抗体、ポリクローナル抗リン酸化 Ser³⁰⁷ 特異的 IRS1 抗体およびポリクローナル抗リン酸化 Thr³⁰⁸ 特異的 Akt 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) から購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から購入した。トリパンブルー溶液 (0.4%) は和光純薬工業株式会社から購入した (Osaka, Japan)。その他すべての試薬は和光純薬工業株式会社またはシグマアルドリッチジャパンから試薬特級のものを購入した。

第2項 実験動物

すべての実験は国立大学法人富山大学実験取扱規則に則り、動物委員会の承認を受けた実験計画に基づき行った。雄性の BKS.Cg-m+/m+/J (m+/m+) および BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/J (db/db) は動物繁殖研究所 (Ibaraki, Japan) から購入した。マウスは 23-25°C で管理された 12 時間の明暗サイクル (7 時点灯) の部屋で自由摂食および自由飲水下で飼育した。マウスには通常食を給餌した。8 週齢の m+/m+ および db/db マウスを 3 群に分け、通常食とシロスタゾール (0, 100 または 300 mg/kg/day) 混合食を 4 週間給餌した。

第3項 糖・インスリン負荷試験

糖およびインスリン負荷試験は既報に基づいて行った (Wada et al., 2013)。6 時間絶食下において、マウスにグルコース (2 g/kg) またはインスリン (0.75 または 4 U/kg) を腹腔内投与後 0, 15, 30, 60 および 120 分において尾静脈から採血し、グルコースセンサー (ニプロフリースタイルセンサー、NIPRO, Osaka, Japan) によって血糖値を測定した。

第4項 組織化学的解析

組織学的解析は既報に基づいて行った (Wada et al., 2013)。摘出した精巣上体脂肪組織を 4% パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、パラフィン包埋した。厚み 6 μm の切片を hematoxylin-eosin (HE) で染色した。組織標本を正立顕微鏡 (BX61; Olympus, Tokyo, Japan) で撮影した。脂肪細胞面積を VH Analyzer (VH-H1A5; Keyence, 大阪、日本) を用いて、一検体あたり 300 細胞以上の細胞面積を計測し、解析した。

第5項 Real-time PCR

各組織および培養細胞からの Total RNA の抽出は TRIsure (Bioline Reagents Ltd., London, UK) を使用した。Total RNA からの cDNA の作製は Primer Script™ RT Reagent Kit (for Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社、Shiga, Japan) を用いた。Real-time PCR は SYBR® Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) を用い、Mx3000P QPCR system (Agilent Technologies., CA, USA) により定量した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の遺伝子発現により補正した。定量に用いたプライマー配列を Table 1 に示す。

Table 1 プライマー配列

	Forward	Reverse
MCP-1	CCA CTC ACC TGC TGC TAC TCA T	TGG TGA TCC TCT TGT AGC TCT CC
CD11c	ATG TTG GAG GAA GCA AAT GG	CCT GGG AAT CCT ATT GCA GA
TNF- α	AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA	GGC ACC ACT AGT TGG TTG TCT TTG
PPAR γ	TCG CTG ATG CAC TGC CTA TG	TGT CAA AGG AAT GCG AGT GGT C
TLR4	CCT GGC TGG TTT ACA CGT C	GAC ATT GCA GAA ACA TTC GC
18S rRNA	GTA ACC CDT TGA ACC CCA TT	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG

第6項 RAW264.7 細胞および 3T3-L1 脂肪細胞の培養

マウス由来 RAW264.7 マクロファージ様細胞 (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA) は 10% FBS を含む DMEM で、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。既報に基づいて、3T3-L1 前駆脂肪細胞 (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA) は 10% donor bovine serum (DBS; Gibco, Kanagawa, Japan) を含む DMEM で 37 °C、10% CO₂ 条件下で培養した (Wada et al., 2011)。70%コンフルエントの段階で継代し、100%コンフルエントに達した後に 10% DBS を含む DMEM で 3 日間培養した。分化誘導のために、10% fetal calf serum (FCS; Gibco, Kanagawa, Japan)、250 nM dexamethasone、0.5 mM isobutyl methylxanthine および 500 nM insulin を添加した培養液に交換した。分化誘導から 3 日後、分化メディウムを 10% FCS と 500 nM insulin を含む DMEM に交換した。以後実験に使用するまで、10% FCS を含む DMEM で培養し、3 日毎に培養液を交換した。実験には分化誘導後 10-12 日の細胞を使用した。

第7項 インスリン誘導性 2-deoxyglucose 取り込みの測定

3T3-L1 脂肪細胞は 6-well plates で培養し、無血清条件下で 10 μ M シロスタゾールを 3 時間処置した。さらに TNF α (40 ng/ml) を 12 時間処置した。その後、シロスタゾールと TNF α を添加した 1% fatty acid free bovine serum albumin を含む Krebs ringer phosphate-HEPES buffer (pH7.4) (10 mM HEPES, 131.2 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 2.5 mM NaH₂PO₄) に交換し、37 °C で 2 時間インキュベートした後、各種濃度の insulin で刺激を行った。インスリン刺激 15 分後、0.1 μ Ci の [³H]-2-deoxyglucose (GE Healthcare Bioscience Inc., Uppsala, Sweden) を添加した。4 分後、10 μ M cytochalasin B 添加により反応を停止させた。細胞を PBS で 3 回洗浄し、0.2 mM SDS/0.2 N NaOH で溶解した。細胞内へ取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

第8項 Western blotting

3T3-L1 脂肪細胞は 6-well plates で 16 時間、無血清条件下で培養した。細胞は 10 μ M シロスタゾールを 3 時間処置した。さらに TNF α (40 ng/ml) を 14 時間処置した。Protein kinase A (PKA) 阻害剤 KT5720 (Alexis Chemicals, CA, USA) および PPAR γ 拮抗薬 GW9662 (Sigma Aldrich, MO, USA) はシロスタゾール添加の 1 時間前に処置した。細胞を 1.7 nM insulin で 5 分間刺激後、回収した。RAW264.7 マクロファージは 10 または 20 μ M シロスタゾールを 16 時間処置後、LPS (100 ng/ml) で 3 時間刺激し、回収した。細胞を溶解液 (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM sodium deoxycholate, 1 mM β -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na₃VO₄, 50 mM sodium fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, and 10 μ M leupeptin, pH 7.4) により溶解した。4 °C、15 分間の溶解後、不溶性画分を遠心分離により除いた。細胞溶解液を 7.5% SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene difluoride membranes (PVDM) に転写した。メンブレンは 2.5% bovine serum albumin (BSA) または 5% non-fat milk を添加した tris buffered saline-Tween 20 (TBS-T; 50 mM Tris, 150 mM NaCl および 0.1% Tween 20, pH 7.5) に浸漬し、2 時間室温でブロッキングした。メンブレンを一次抗体と 4 °C で 16 時間反応させた。メンブレンを TBS-T で洗浄後、horseradish peroxidase 標識二次抗体と反応させ、ECL 試薬 (GE Healthcare Bioscience Inc., Uppsala, Sweden) を用いた化学発光法によりルミノイメージアナライザー (LAS-4000; Fujifilm, Tokyo, Japan) にて検出した。

第10項 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は one-way ANOVA による分散分析解析の後、多重検定比較を Bonferroni's テスト (YSTAT 2004) により行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

第3節 結果

Table 2. シロスタゾールを投与した m+/m+ および db/db マウスにおける血清パラメーター変化およびエネルギー代謝の変化

	m+/m+	m+/m+	m+/m+	db/db	db/db	db/db
Cilostazol (mg/kg/day)	0	100	300	0	100	300
Body weight (g), 8 wk-old	20.5 ± 0.4	20.3 ± 0.2	20.6 ± 0.5	35.6 ± 0.8 ^a	35.6 ± 0.8 ^a	35.6 ± 0.8 ^a
Body weight (g), 12 wk-old	22.5 ± 0.5	22.6 ± 0.4	23.5 ± 0.6	42.2 ± 1.2 ^a	44.0 ± 1.5 ^a	44.3 ± 1.1 ^a
Food intake (kcal/day)	11.7 ± 1.5	12.7 ± 1.3	12.7 ± 0.6	20.8 ± 1.0 ^a	19.7 ± 1.1 ^a	20.0 ± 0.6 ^a
Fasting glucose (mg/dL)	50.4 ± 3.0	50.1 ± 4.6	46.5 ± 2.9	235.8 ± 51.1 ^a	169.9 ± 30.6 ^a	153.9 ± 30.4 ^{ab}
Fasting insulin (ng/mL)	0.43 ± 0.09	0.34 ± 0.06	0.47 ± 0.07	2.84 ± 0.61 ^a	3.59 ± 0.56 ^a	3.03 ± 0.55 ^a
Metabolic chamber analysis (Dark phase)						
VO ₂ (mL/min/kg)	65.4 ± 1.7	62.2 ± 0.9	57.1 ± 2.2	36.7 ± 4.0 ^a	34.4 ± 2.8 ^a	35.3 ± 2.4 ^a
VCO ₂ (mL/min/kg)	58.8 ± 2.2	55.3 ± 1.4	51.1 ± 2.5	29.9 ± 3.2 ^a	27.9 ± 2.5 ^a	28.3 ± 2.1 ^a
Energy exp. (kcal/min/kg)	323.1 ± 8.7	306.5 ± 5.0	282.1 ± 11.4	178.2 ± 19.2 ^a	166.9 ± 13.8 ^a	171.0 ± 11.5 ^a
RQ (mL/min)	0.90 ± 0.02	0.89 ± 0.01	0.89 ± 0.02	0.81 ± 0.01 ^a	0.80 ± 0.02 ^a	0.79 ± 0.02 ^a
Locomotor activity (counts/h)	2948 ± 423	2247 ± 186	3516 ± 517	779 ± 178 ^a	568 ± 173 ^a	775 ± 205 ^a
Metabolic chamber analysis (Light phase)						
VO ₂ (mL/min/kg)	53.7 ± 1.3	52.3 ± 1.0	47.3 ± 1.5	29.5 ± 1.2 ^a	29.0 ± 1.2 ^a	29.5 ± 1.1 ^a
VCO ₂ (mL/min/kg)	45.5 ± 1.4	43.4 ± 1.4	44.3 ± 3.5	24.3 ± 1.6 ^a	24.4 ± 2.0 ^a	22.9 ± 1.5 ^a
Energy exp. (kcal/min/kg)	262.3 ± 6.5	254.3 ± 5.4	231.3 ± 7.5	141.9 ± 5.7 ^a	139.5 ± 5.6 ^a	142.0 ± 5.5 ^a
RQ (mL/min)	0.84 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.77 ± 0.01 ^a	0.76 ± 0.02 ^a	0.77 ± 0.02 ^a
Locomotor activity (counts/h)	915 ± 226	740 ± 112	831 ± 150	292 ± 59 ^a	209 ± 44 ^a	371 ± 75 ^a

値は平均値 ± 標準偏差で示した (n = 8/群)。^aP < 0.01 はシロスタゾール非投与の m+/m+ マウスとの比較。^bP < 0.05 はシロスタゾール非投与の db/db マウスとの比較。

第1項 シロスタゾール投与による耐糖能およびインスリン感受性の変化

シロスタゾール投与による糖代謝への影響を検討するため、糖負荷試験 (GTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) を行った。非肥満の対照マウスである m+/m+ マウスの糖負荷試験およびインスリン負荷試験において、耐糖能およびインスリン感受性に与えるシロスタゾールの影響はほとんど認められなかった (Figure 1A, B)。一方、肥満 2 型糖尿病モデル db/db マウスに対するシロスタゾールの投与は、糖負荷試験において濃度依存的に耐糖能を改善させ、インスリン負荷試験において濃度依存的にインスリン感受性を亢進させた (Figure 1C, D)。同様の結果が各試験の曲線下面積の比較において認められた (Figure 1E, F)。

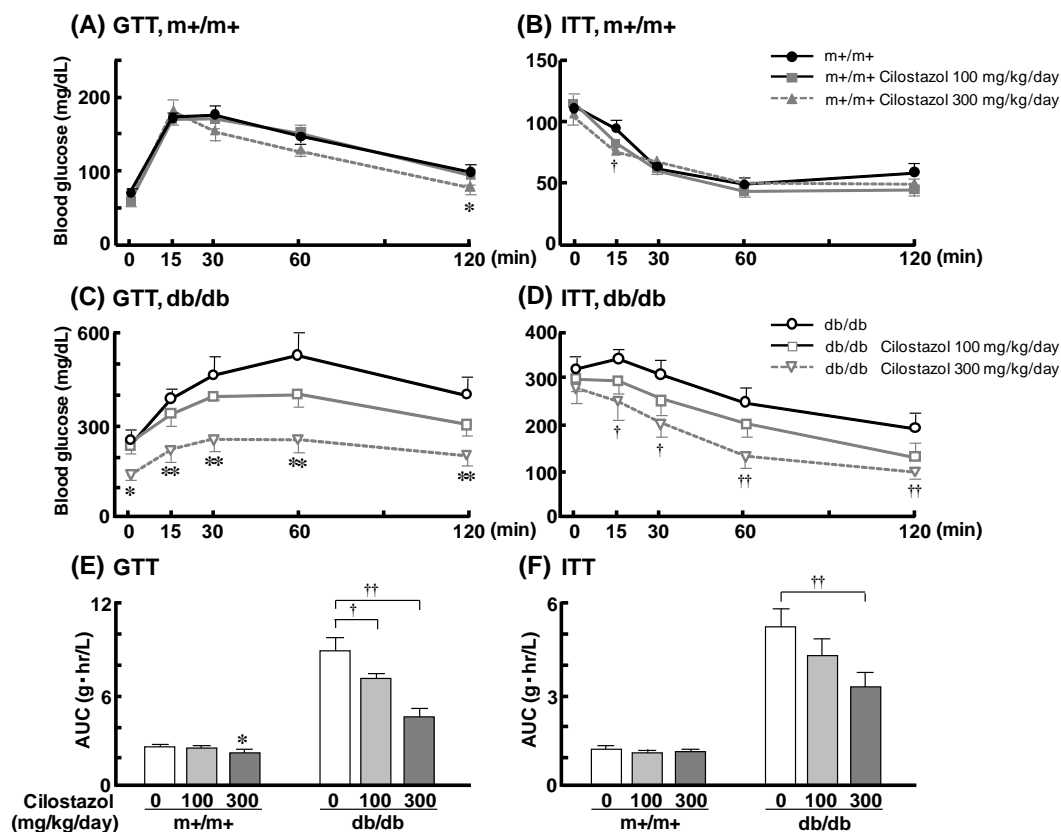


Figure 1. シロスタゾールの投与が m+/m+ および db/db マウスの耐糖能およびインスリン感受性に与える影響

シロスタゾール (0, 100 または 300 mg/kg/day) を m+/m+ (A, B) および db/db マウス (C, D) に 4 週間経口投与した。(A, B) 糖負荷試験 (GTT) における血糖値。(B, D) インスリン負荷試験 (ITT) における血糖値。m+/m+ マウスに対して 0.75 U/kg in、db/db マウスに対して 4 U/kg インスリンを腹腔内投与した。(E, F) GTT (E) および ITT (F) における 120 分間の曲線下面積 (AUC) の平均値。値は平均値 ± 標準偏差で示した (n = 6-8/群)。* $P < 0.05$ および ** $P < 0.01$ はシロスタゾール非投与の m+/m+ マウスとの比較。† $P < 0.05$ および †† $P < 0.01$ はシロスタゾール非投与の db/db マウスとの比較。(●) m+/m+, (■) m+/m+ Cilostazol 100 mg/kg/day, (▲) m+/m+ Cilostazol 300 mg/kg/day, (○) db/db, (□) db/db Cilostazol 100 mg/kg/day および (▽) db/db Cilostazol 300 mg/kg/day。

第2項 シロスタゾールの投与による脂肪組織の形態変化

シロスタゾール投与が、db/db マウスの精巣上体脂肪組織における脂肪細胞の肥大化に与える影響を形態学的に解析した。db/db マウスの脂肪細胞面積は m+/m+マウスに比べて顕著に増大した (Figure 2A-C)。シロスタゾール 100 および 300 mg/kg/day の投与は、m+/m+マウスの脂肪細胞面積を変化させなかった (Figure 2A, C)。興味深いことに、db/db マウスの脂肪細胞面積は、シロスタゾールの投与濃度依存的に顕著に縮小した (Figure 2B, C)。細胞サイズの頻度分布を解析したところ、db/db マウスにおいて認められる肥大化した脂肪細胞の割合は、シロスタゾール投与により顕著に減少し、1000 μm^2 以下の脂肪細胞の割合が増加した (Figure 2B, right panel)。一方、db/db マウスにおいてシロスタゾール投与による脂肪重量の変化は認められなかった (Figure 2D)。

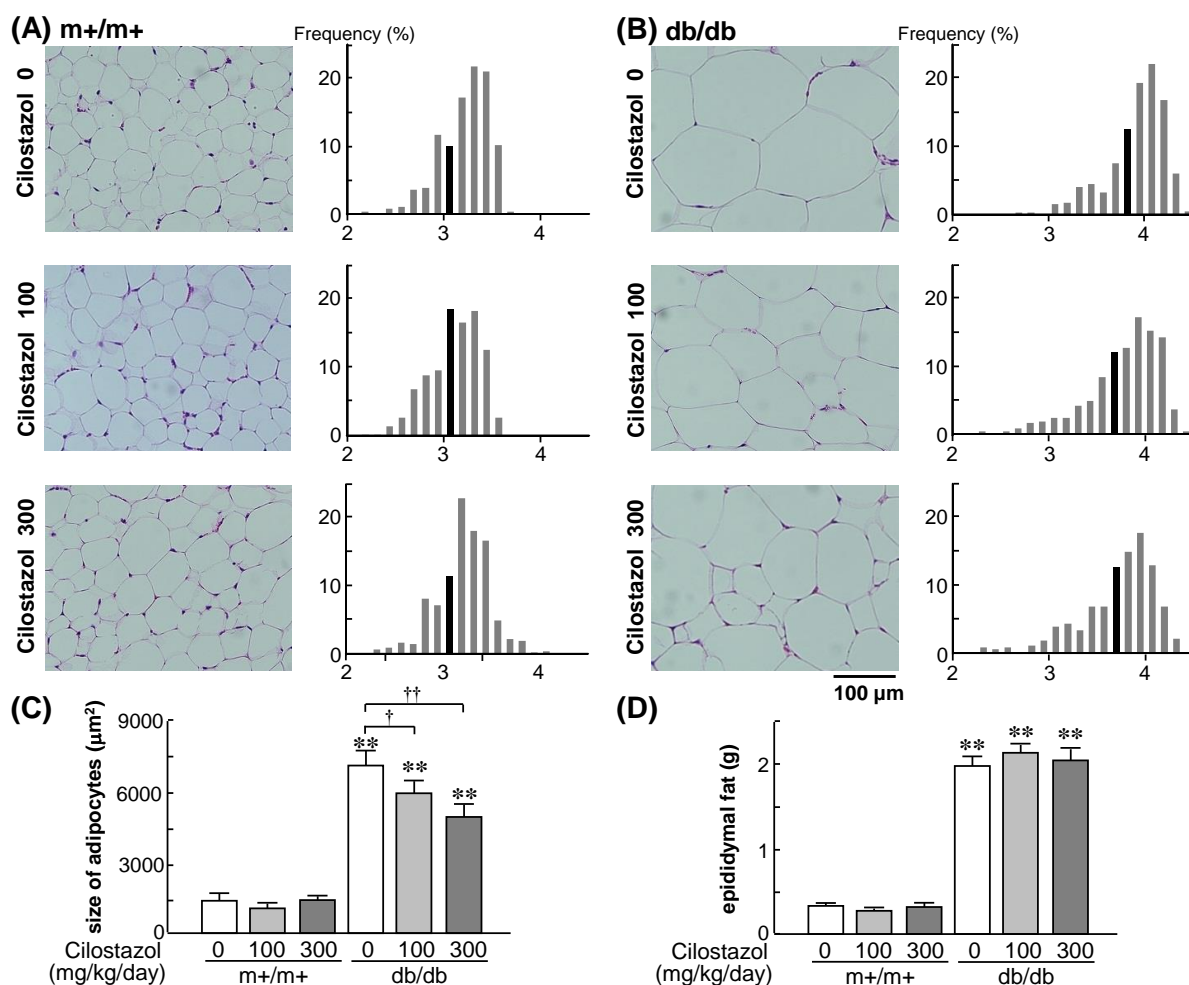


Figure 2. シロスタゾールの投与による脂肪組織の形態変化

シロスタゾール投与 4 週間後に摘出した m+/m+ (A) と db/db (B) マウスの精巣上体脂肪組織の hematoxylin-eosin 染色画像と脂肪細胞面積 (面積の対数值) の頻度分布。スケールバー: 100 μm 。(C) シロスタゾールを投与した m+/m+ と db/db マウスの精巣上体脂肪組織における平均脂肪細胞面積。(D) シロスタゾールを投与した m+/m+ と db/db マウスの精巣上体脂肪組織の組織重量。値は平均値 \pm 標準偏差で示した ($n = 8$ /群)。* $P < 0.05$ および ** $P < 0.01$ はシロスタゾール非投与の m+/m+ マウスとの比較。† $P < 0.05$ および †† $P < 0.01$ はシロスタゾール非投与の db/db マウスとの比較。

第3項 シロスタゾールの投与による脂肪組織の炎症性サイトカイン発現の変化

シロスタゾールの投与が、db/db マウスの精巣上体脂肪組織における慢性炎症に与える影響を検討するため、炎症性サイトカインの遺伝子発現変化を解析した。db/db マウスにおける MCP1、炎症性 M1 マクロファージマーカー CD11c および TNF α の遺伝子発現は、m+/m+ マウスに比べて顕著に増加した (Figure 3A-C)。シロスタゾールの投与は、db/db マウスに認められる炎症性サイトカイン遺伝子発現を濃度依存的に抑制した (Figure 3A-C)。シロスタゾール投与によるこれらの変化は PPAR γ の遺伝子発現においても同様であった (Figure 3D)。

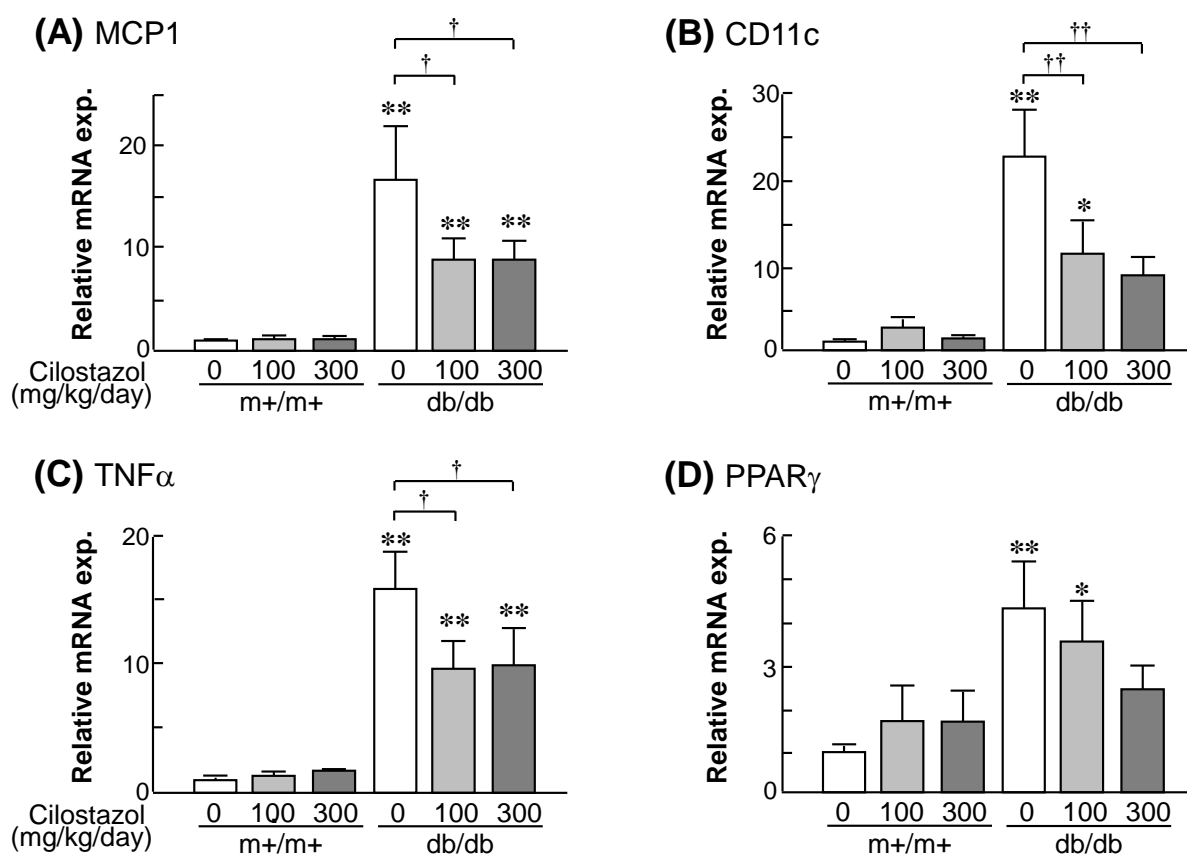


Figure 3. シロスタゾール投与による精巣上体脂肪組織における炎症性サイトカイン発現変化

シロスタゾール投与 4 週間後に摘出した m+/m+ および db/db マウスの精巣上体脂肪組織における MCP1 (A)、CD11c (B)、TNF α (C) および PPAR γ (D) の mRNA 発現変化。値は平均値 \pm 標準偏差で示した (n = 8/群)。* P <0.05 および ** P <0.01 はシロスタゾール非投与の m+/m+ マウスとの比較。† P <0.05 および †† P <0.01 はシロスタゾール非投与の db/db マウスとの比較。

第4項 培養脂肪細胞の TNF α 誘発性糖取り込み減少に対するシロスタゾールの効果

シロスタゾール処置が成熟脂肪細胞のインスリン感受性に与える影響について、3T3-L1 脂肪細胞を用いてインスリン誘導性の細胞内への 2-DG 取り込みを検討した。In vitro 実験系においてインスリン抵抗性状態を模倣するため、3T3-L1 脂肪細胞に TNF α を前処置した。インスリン誘導性の細胞内への 2-DG 取り込みは TNF α 処置により減弱した (Figure 4)。シロスタゾールの単独処置は、インスリン誘導性 2-DG 取り込みに影響を与えなかった (data not shown)。しかし、シロスタゾールの前処置は、TNF α 処置によるインスリン誘導性 2-DG 取り込みの抑制を消失させた (Figure 4)。よって、シロスタゾール処置は、成熟脂肪細胞における TNF α 誘導性インスリン抵抗性を直接的に減弱させることが示唆される。

3T3-L1 adipocytes

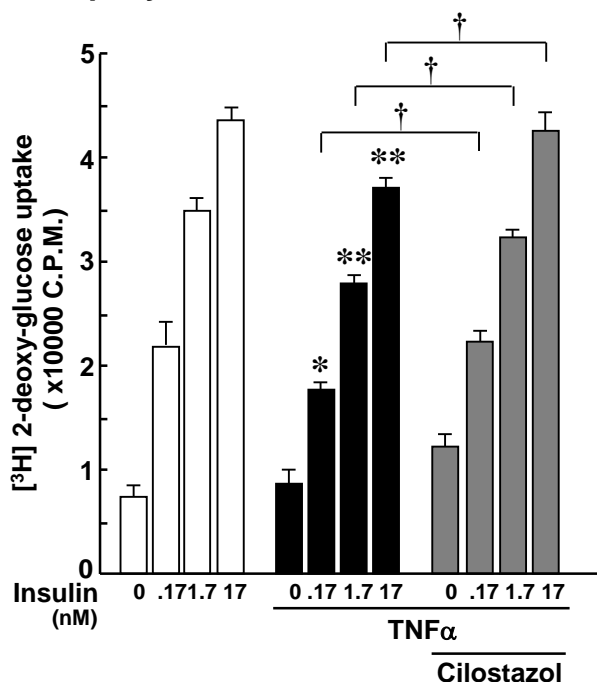


Figure 4. 培養脂肪細胞の TNF α 誘発性糖取り込み減少に対するシロスタゾールの効果

シロスタゾールおよび TNF α を 14 時間前処置した 3T3-L1 成熟脂肪細胞を各濃度のインスリンで 15 分間刺激した。その後 4 分間、[³H]-2-DG を細胞内へ取り込ませた。各測定は一検体二組で行った。結果は 9 回の独立した実験結果の平均値±標準偏差で示した。* P <0.05 および ** P <0.01 は同濃度インスリン刺激を行った対照群と TNF α 処置群との比較。† P <0.05 は TNF α 処置群に同濃度インスリン刺激を行ったシロスタゾール非処置群とシロスタゾール処置群との比較。

第5項 培養脂肪細胞の TNF α 誘発性インスリンシグナル低下に対するシロスタゾールの効果

シロスタゾール処置による TNF α 誘発性インスリン抵抗性の抑制機構を明らかにするため、3T3-L1 脂肪細胞におけるストレスシグナルおよびインスリンシグナルを検討した。3T3-L1 脂肪細胞に対するシロスタゾール処置は、TNF α 処置による JNK のリン酸化と、IRS1 のタンパク分解を誘導する IRS1 の Ser307 残基のリン酸化を抑制した (Figure 5A, B)。一方、3T3-L1 脂肪細胞に対するシロスタゾールの前処置は、TNF α による IRS1 の Tyrリン酸化の低下、IRS1 タンパク量の低下および Akt のリン酸化の低下を軽減させた (Figure 5C-E)。したがって、3T3-L1 脂肪細胞に対するシロスタゾール処置は、TNF α による JNK 活性化を介したインスリン抵抗性を軽減させることが示唆された。

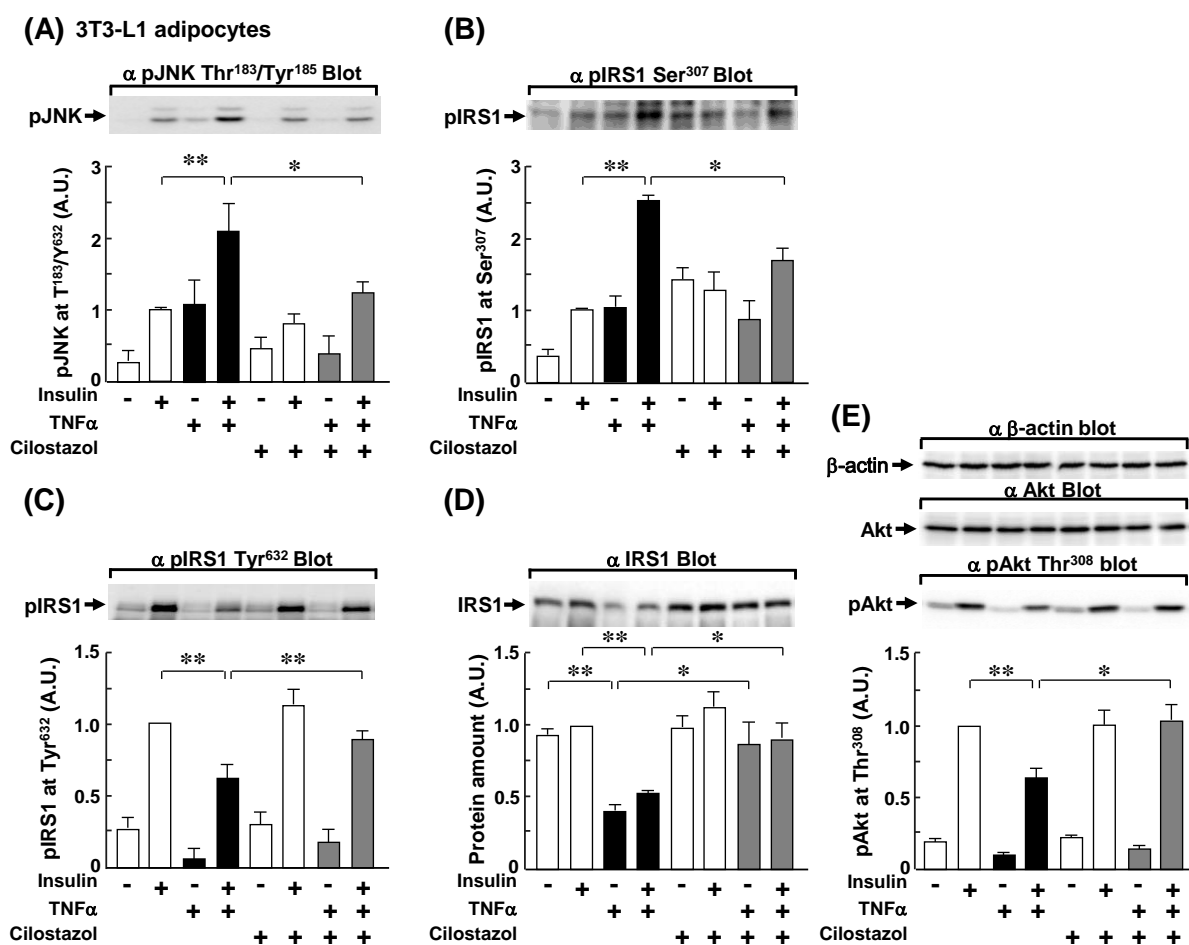


Figure 5. 培養脂肪細胞の TNF α 誘発性インスリンシグナル低下に対するシロスタゾールの効果

3T3-L1 脂肪細胞は無血清条件下でシロスタゾールを 3 時間処置し、その後 TNF α を 14 時間処置した。1.7 nM insulin で細胞を 5 分間刺激し、western blotting 法により解析した。(A) リン酸化 JNK、(B) IRS1 の Ser³⁰⁷ 残基リン酸化、(C) IRS1 の Tyr⁶³² のリン酸化、(D) IRS1 量、(E) Akt の Thr³⁰⁸ 残基のリン酸化、Akt 量および β -actin 量を示した。結果は 3-5 回の独立した実験結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。* $P < 0.05$ および ** $P < 0.01$ は指示された群間の比較。

第 6 項 培養脂肪細胞におけるシロスタゾールによるインスリンシグナル改善効果に対する PKA 阻害剤と PPAR γ 拮抗薬の影響

3T3-L1 脂肪細胞の TNF α 誘発性インスリン抵抗性に対するシロスタゾールの改善効果の機序を明らかにするため、PKA 阻害剤および PPAR γ 拮抗薬を用いて PKA と PPAR γ の関与を検証した。TNF α 処置は IRS1 の Tyrリン酸化、IRS1 発現および Akt のリン酸化を低下させた (Figure 6A-C)。これらの低下はシロスタゾール処置によって抑制された。シロスタゾール処置による抑制効果は、PPAR γ 拮抗薬 GW9662 前処置ではなく、PKA 阻害剤 KT5720 前処置により減弱した (Figure 6A-C)。KT5720 または GW9662 単独処置による IRS1 および Akt1 のタンパク量とリン酸化レベルは変化を認めなかった (data not shown)。これらの結果から、シロスタゾール処置によるインスリン抵抗性抑制効果は PKA 依存的経路を介することが示唆される。

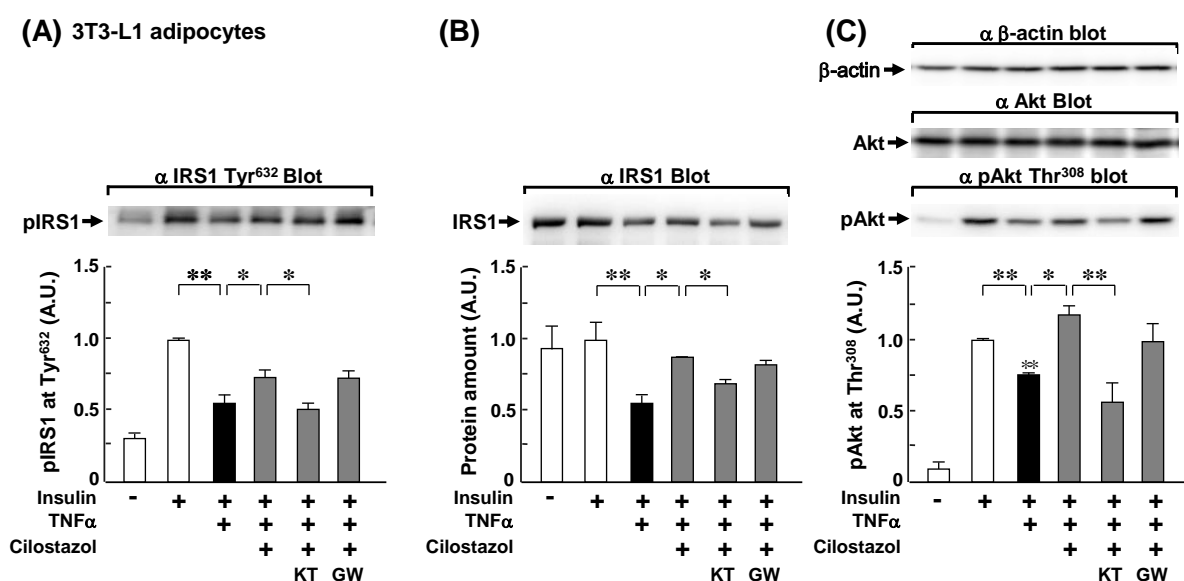


Figure 6. 培養脂肪細胞におけるシロスタゾールによるインスリンシグナル改善効果に対する PKA 阻害剤と PPAR γ 拮抗薬の影響

3T3-L1 脂肪細胞は無血清条件下で KT5720 または GW9662 を 1 時間処置後、シロスタゾールを 3 時間処置し、さらに TNF α を 14 時間処置した。1.7 nM insulin で細胞を 5 分間刺激し、western blotting 法により解析した。(A) IRS1 の Tyr⁶³² のリン酸化、(B) IRS1 量、(C) Akt の Thr³⁰⁸ 残基のリン酸化、Akt 量および β -actin 量を示した。結果は 9 回の独立した実験結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。 $*P<0.05$ および $**P<0.01$ は指示された群間の比較。

第7項 培養マクロファージの LPS 誘発性炎症性変化に対するシロスタゾールの効果

脂肪組織マクロファージはインスリン抵抗性の進展に重要な役割を果たすことから、LPS 処置による RAW264.7 マクロファージ様細胞の炎症性変化に対するシロスタゾールの効果を検討した。RAW264.7 細胞に対するシロスタゾール単独処置は、TNF α の遺伝子発現に影響を与えなかった (Figure 7A)。一方、RAW264.7 細胞に対するシロスタゾール前処置は、LPS 誘発性の TNF α 遺伝子発現の増加を顕著に抑制した (Figure 7A)。さらに、RAW264.7 細胞に対するシロスタゾール前処置は、LPS 非刺激下と刺激下の両条件において TLR4 の遺伝子発現およびタンパク量を顕著に低下させた (Figure 7B, C)。シロスタゾールを投与した db/db マウスにおいて TNF α 遺伝子発現の低下が認められたことから、db/db マウスの精巣上体脂肪組織における TLR4 遺伝子発現を解析した。RAW264.7 細胞の結果と一致して、db/db マウスの脂肪組織において増加する TLR4 遺伝子発現はシロスタゾール投与により、顕著に抑制された (Figure 7D)。

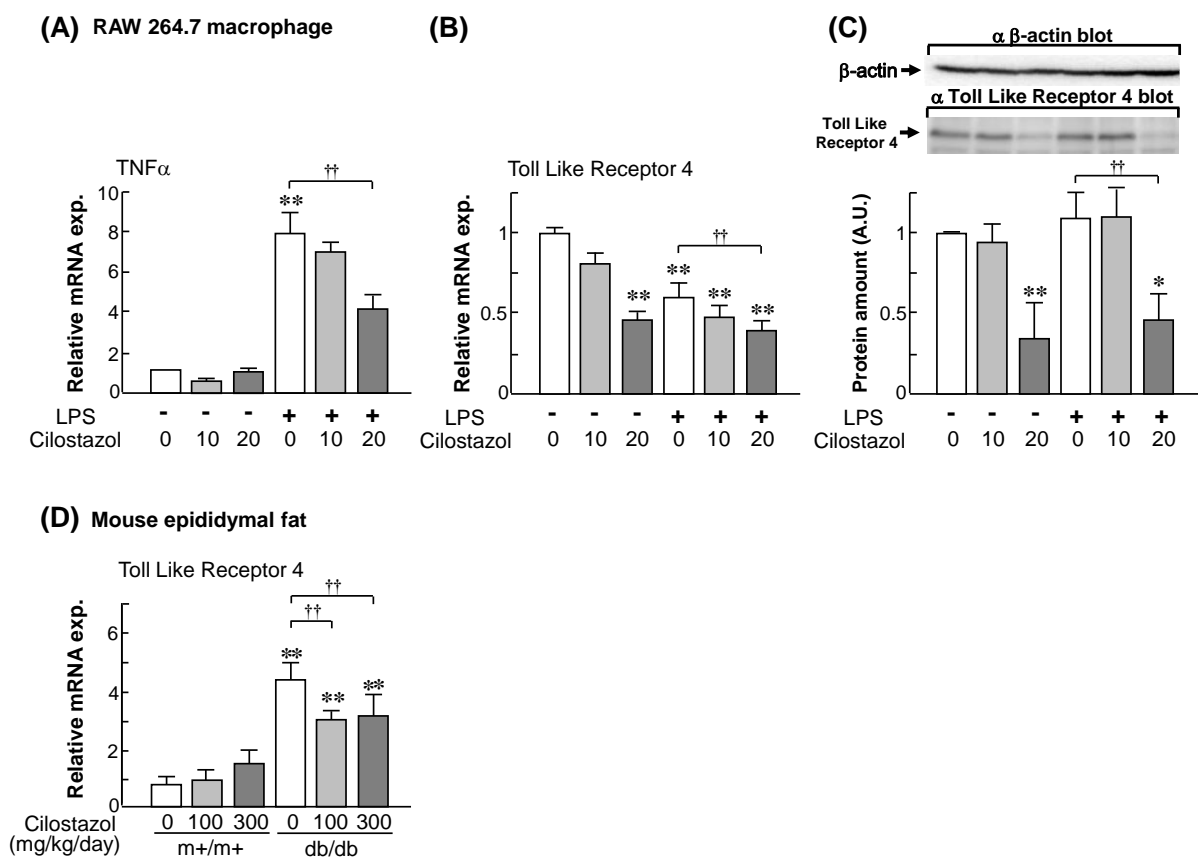


Figure 7. 培養マクロファージの LPS 誘発性炎症性変化に対するシロスタゾールの効果

RAW264.7 細胞を 10 または 20 μ M シロスタゾールで 16 時間処置し、100 ng/mL LPS で 3 時間刺激後、回収した。(A) TNF α および (B) TLR4 の mRNA 発現変化。(C) TLR4 および β -actin のタンパク量。結果は 4-8 回の独立した実験結果の平均値 \pm 標準偏差で示した。* P <0.05 および ** P <0.01 は指示した群間の比較。(D) シロスタゾールを m+/m+ および db/db マウスに 4 週間投与後、摘出した精巣上体脂肪組織における TLR4 の mRNA 発現。値は平均値 \pm 標準偏差で示した ($n = 8$ /群)。** P <0.01 はシロスタゾール非投与の m+/m+ マウスとの比較。†† P <0.01 はシロスタゾール非投与の db/db マウスとの比較。

第4節 考察

シロスタゾールは抗血小板薬として広く使用されており、糖尿病患者に対する使用も増加している (Ferreiro et al., 2010; Gresele et al., 2011)。これまでの知見から、*in vivo* と *in vitro* において、シロスタゾールが糖代謝に対し有益な作用を有することが示唆されている (Chang et al., 2001, Park et al., 2008; Park et al., 2009; Park et al., 2011)。しかし、その作用機序はいまだ不明な点が多い。脂肪組織リモデリングと慢性炎症は、肥満に関連するインスリン抵抗性の進展に密接に関与する (Osborn et al., 2012; Sun et al., 2011)。本研究では、脂肪組織の形態変化と慢性炎症に焦点をあて、インスリン抵抗性状態におけるシロスタゾールの作用機序を解明し、シロスタゾールがインスリン抵抗性の進展を促進するマクロファージと脂肪細胞との悪循環を効果的に防御することを新たに提示した。

シロスタゾール投与は *db/db* マウスの耐糖能異常とインスリン抵抗性を改善させた (Figure 1)。シロスタゾールの4週間投与は、正常マウスである *m+/m+* および肥満糖尿病 *db/db* マウスの摂食量、エネルギー消費、自発運動量、体重および脂肪重量に影響しなかったため、シロスタゾール投与による糖代謝改善作用はエネルギーバランスの変化には起因しないと考えられた (Table 2, Figure 2)。脂肪組織の炎症性遺伝子の発現解析において、シロスタゾール投与は、*db/db* マウスに認められる MCP1、M1 マクロファージマーカー CD11c および TNF α の mRNA 発現を濃度依存的に抑制した。したがって、本知見は糖恒常性の維持におけるシロスタゾールの有益な作用は、脂肪組織の慢性炎症の抑制に関連することが示唆される。

db/db マウスに対する12日間の30 mg/kg/day シロスタゾール投与は血糖値、血中インスリン濃度を低下させることが示されている (Park et al., 2009)。本検討で用いたシロスタゾールの濃度は既報と比較して高濃度であるが、マウスを用いた実験においては一般的な濃度である (Lee et al., 2005; Kim et al., 2011)。さらに、100 mg/kg/day のシロスタゾールを投与した場合の血清中シロスタゾール濃度は約 0.5-1.5 g/mL であり (data not shown)、ヒトにおける有効血中濃度 (0.5-1.0 g/mL) とほぼ同等である。したがって、本研究で使用した投与濃度はシロスタゾールの治療効果を評価するために妥当な濃度設定であると考えられる。

これまでに 3T3-L1 前駆脂肪細胞において、シロスタゾールは PPAR γ の転写活性を増加させることが示されている (Park et al., 2008; Park et al., 2009)。一方、我々は 3T3-L1 成熟脂肪細胞において、TNF α 誘発性インスリン抵抗性に対するシロスタゾールの抑制効果は PPAR γ 拮抗薬では解消されなかった (Figure 6)。このことは、成熟脂肪細胞では PPAR γ が十分に活性化されており、シロスタゾール処置によるさらなる PPAR γ 活性化が引き起こされなかったことに起因すると考えられる。一方 *in vivo* において、脂肪組織は未分化な前駆脂肪細胞から成熟分化した肥大化脂肪細胞まで、さまざまな分化段階にある脂肪細胞が存在する。肥満 Zucker ラットに対する PPAR γ 作動薬トログリタゾンの投与は、小型脂肪細胞数の増加、後腹膜脂肪組織における PPAR γ 遺伝子の発現低下およびインスリン抵抗性の改善を示す (Okuno et al., 1998)。また、他の PPAR γ 作動薬ピオグリタゾンは、高脂肪食負荷マウスの脂肪組織において、CD11c 陽性 M1 macrophages、CLS の形成および MCP1 と TNF α 遺伝子発現を低下させることが示されている (Fujisaka et al., 2009)。本研究では組織学的解析により、シロスタゾールは *db/db* マウスの精巣上体脂肪組織において、脂肪細胞の肥大化を抑制し、小型脂肪細胞を増加させた (Figure 2)。したがって、マウス脂肪組織において、シロスタゾールが PPAR γ を介した脂肪細胞分化の促進、インスリン感受性の小型脂肪細胞の増加および局所的な炎症の抑制によってインスリン抵抗性を改善した可能性が考えられる。

一方、3T3-L1 成熟脂肪細胞において、シロスタゾールは PKA 依存的経路を介して TNF α 誘発性インスリン抵抗性を抑制した。シロスタゾールによる PKA 依存的経路の活性化は、シロスタゾールによる PDE3B の抑制に起因すると考えられる。PDE3 は PDE3A と PDE3B の 2 つのアイソフォームが存在する。PDE3A は主に血小板、血管平滑筋および心筋細胞に発現する一方、PDE3B は主に脂肪細胞、肝細胞、膵 β 細胞およびマクロファージに発現することが知られている (Bender et al., 2006; Gresele et al., 2011)。脂肪細胞において、PDE3B はインスリンと cAMP による脂肪分解の制御に重要な役割を果たす (Carmen et al., 2006)。さらに、PDE3B 欠損マウスは脂肪細胞の縮小を示す (Choi et al., 2006)。したがって、シロスタゾールを投与した db/db マウスに認められる脂肪細胞の縮小は、脂肪分解の亢進に起因する可能性が考えられる。しかし、脂肪分解酵素である hormone-sensitive lipase の遺伝子発現は m+/m+ および db/db マウスにおいてシロスタゾール投与による変化は認められなかった (data not shown)。我々の in vivo の結果とこれまでの報告を考え合わせると、db/db マウスの糖代謝改善において、シロスタゾールによる PPAR γ の活性化は重要な機構であると考えられる。

これまでの報告で、シロスタゾールは J774 マウスマクロファージ細胞株において、LPS 誘発性 TNF α 遺伝子発現を抑制し、ヒト THP1 単球細胞株において LPS 誘発性 MCP1 遺伝子発現を抑制することが示されている (Park et al., 2011; Tsai et al., 2008)。さらに本検討では、シロスタゾール処置は LPS 誘発性 TNF α 遺伝子発現を濃度依存的に抑制することを示した。シロスタゾールの抗炎症作用の詳細な機序は十分検討されていないが、Park らは J774 マウスマクロファージ細胞株においてシロスタゾールが heme oxygenase 1 (HO1) の発現増加を介して NF κ B 活性を抑制することにより炎症性サイトカイン発現低下を引き起こすと報告した (Park et al., 2011)。マウス腹腔マクロファージにおいて、HO1 は TLR4 と Caveolin 1 との相互作用を促進させることで、TLR4 のアダプタータンパクである MyD88 との相互作用を抑制することが報告されている (Wang et al., 2009)。しかし本研究では、RAW264.7 細胞においてシロスタゾールによる TLR4 と Caveolin 1 との相互作用は検出できなかった (data not shown)。マクロファージにおいて、LPS 誘発性の TLR4 発現の抑制が炎症反応のネガティブフィードバック機構としてはたらくことが示されている (Nomura et al., 2000)。興味深いことに、我々は RAW264.7 マクロファージにおいて、シロスタゾールが TLR4 の遺伝子発現およびタンパク発現を効果的に抑制することを見出した。さらに、db/db マウスに対するシロスタゾールの投与は、精巣上体脂肪組織における TLR4 遺伝子発現を抑制した (Figure 7)。LPS は TLR4 を介して TNF α の遺伝子発現を誘導することから、シロスタゾールの抗炎症効果の新たな機序として TLR4 発現低下の重要性が考えられる。

第 5 節 小括

シロスタゾールはインスリン抵抗性改善に対して、多面的な薬理活性を有することが示唆された。これまでに報告された PPAR γ を介したシロスタゾールの有益な効果に加え、本知見に基づいて、脂肪組織におけるシロスタゾールのインスリン抵抗性改善モデルを提示した。内臓脂肪型肥満において、炎症性 M1 マクロファージが脂肪組織に浸潤し、その結果、慢性炎症を促進しインスリン抵抗性を誘導する。これと同時に、肥大化した脂肪細胞から分泌される過剰な遊離脂肪酸はマクロファージの TLR4 を活性化し、炎症性サイトカイン産生を刺激する (Suganami et al., 2005)。シロスタゾールは脂肪細胞とマクロファージとの相互作用に介入し、脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性を改善した。この過程において、シロスタゾールは TLR4 の発現を低下させることにより、マクロファージからの

TNF α 産生を抑制した。さらに、シロスタゾールは脂肪細胞において JNK 経路を介した TNF α 誘発性のインスリンシグナルの減弱を解消した。シロスタゾールは同時に PPAR γ を活性化し、マクロファージの炎症反応の抑制と脂肪細胞のインスリン感受性の亢進に寄与した。以上より、肥満 2 型糖尿病を基礎疾患にもつ患者に対する抗血小板治療においてシロスタゾールによる薬物治療の有用性が示唆される。

第3章 肥満病態形成におけるペリサイトの動的変化を起点とした 脂肪血管新生誘導機構の解明

第1節 目的

脂肪組織の肥大化は慢性炎症とこれに伴うインスリン抵抗性の主要因であり、その病態理解のために脂肪組織肥大化の機序の解明が求められる。脂肪組織では脂肪細胞の増大に伴い低酸素状態に陥り、血管新生因子が誘導される (Ye et al., 2007)。血管新生の薬理的阻害および遺伝学的欠損は脂肪組織の肥大化を抑制する (Bråkenhielm et al., 2004; Kolonin et al., 2004; Rupnick et al., 2002)。血管新生因子 PDGF-B は新生血管の成熟過程においてペリサイトの遊走に関与することから (Andrae et al., 2008; Heldin et al., 1999)、PDGF-B/PDGFR β シグナルが脂肪組織の肥大化に関与することが示唆される。そこでペリサイトの動的変化に着目し、食餌性肥満に伴う脂肪組織肥大化と糖代謝における PDGF-B/PDGFR β シグナルの重要性を、PDGFR β コンディショナルノックアウトマウスを用いて検証した

第2節 実験方法

第1項 実験試薬

ヒトインスリンは Novo Nordisk (Copenhagen, Denmark) から提供を受けた。本研究に使用した抗体および ELISA kit は Table. 3 に示した。特記のない限り、他の試薬は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) またはシグマアルドリッチジャパン (Tokyo, Japan) から試薬特級のものを購入した。

第2項 実験動物

すべての実験は国立大学法人富山大学実験取扱規則に則り、動物委員会の承認を受けた実験計画に基づき行った。雄性のマウスは $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で管理された 12 時間の明暗サイクル (7 時点灯) の部屋で自由摂食および自由飲水下で飼育した。C57BL/6 を遺伝的背景にもつ *Pdgfrb*^{flx/flx} マウスは Cre-estrogen receptor トランスジェニックマウスと交配させた (Jackson Laboratory)。これらの出生仔である雄性 Cre-ERTM/*Pdgfrb*^{flx/flx} マウスに対し、全身 *Pdgfrb*-knockout (*Pdgfrb*^{ASYS}-KO) マウスを作製するため、9 週齢において tamoxifen (2.25 mg per 10 g body weight; Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) を 5 日間連日経口投与した (Figure 8E; Shen et al., 2012; Xue et al., 2012)。同腹仔の雄性 *Pdgfrb*^{flx/flx} マウスを対象マウス (FL) として、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスと同じ処置を行った。マウスには通常食として PicoLab Rodent diet 20 (chow: 3.43 kcal/g, PMI Nutrition International) または高脂肪食として 60 kcal% HFD (5.24 kcal/g, D12492, Research Diets Inc.) を 12 週間給餌し、生理学的解析および解剖はこれ以降に行った。各組織のインスリンシグナルを検討するために、6 時間絶食下で 1 U/kg insulin または PBS を尾静脈内投与し、5 分後に組織を摘出したのち、直ちに液体窒素で凍結した。

第3項 核磁気共鳴画像法 MRI による体組成の解析

核磁気共鳴画像法 MRI による体組成の解析は既報に基づいて行った (Yonezawa et al., 2012)。食餌負荷 12-16 週目において、麻酔下で MRmini SA (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) によりマウス腹部冠状切片 T1 強調画像を切片厚 2 mm で 17 枚撮像した。横隔膜から肛門までの各切片画像から皮下脂肪面積、内臓脂肪面積および除脂肪面積を Image J (National Institute of Health, MD, USA) を用いて定量し、切片厚を乗じた値を累積して得られた値を体積とした。

Table 3. 抗体リスト

Antibody (Clone)	Conjugate	Isotype	Dilution ratio	Company	Application
7-AAD			1:100	eBioscience	FC
Akt (B-1)		Mouse	1:200	SCB	WB
CD11c (HL3)	PE	Ar Hamster IgG1	1:100	eBioscience	FC
CD11c (N418)		Ar Hamster	1:100	AbD serotec	IHC
CD13 (ER-BMDM1)		Rat	1:200	AbD serotec	IHC/IF
CD16/CD32		Rat	1:100	BD Bioscience	FC
CD206 (MR5D3)	Alexa 647	Rat IgG2a	1:100	AbD serotec	FC
CD45 (30-F11)	PE/Cy7	Rat IgG2b, κ	1:800	eBioscience	FC
CD45.2 (104)	PE/Cy7	Mouse IgG2a, κ	1:200	BioLegend	FC
F4/80 (CIA3-1)		Rat IgG2b	1:200	AbD serotec	IHC/IF
F4/80 (BM8)	FITC	Rat IgG2a, κ	1:100	eBioscience	FC
F4/80 (BM8)	APC/Cy7	Rat IgG2a, κ	1:100	BioLegend	FC
Hoechst33342			1:500	Wako	IHC/IF
Insulin ELISA kit				Morinaga Institute of Biological Science	ELISA
Isotype control	APC/Cy7	Rat IgG2a, κ	1:100	BioLegend	FC
Isotype control	Alexa 647	Rat IgG2a	1:100	AbD serotec	FC
Isotype control	PE	Ar Hamster IgG1	1:100	eBioscience	FC
Isotype control	FITC	Rat IgG2a, κ	1:100	eBioscience	FC
Ki67 (B56)	Alexa 647	Mouse IgG1, κ	1:20	BD Pharmingen	FC
Ki67 (SoIA15)		Rat IgG2a, κ	1:200	eBioscience	IHC/IF
Leptin ELISA kit				Morinaga Institute of Biological Science	ELISA
NG2		Rabbit	1:200	Millipore	IHC/IF
pAkt Ser473		Rabbit	1:1000	CST	WB
PDGF-BB Immunoassay				R&D systems	ELISA
PDGFR β (958)		Rabbit	1:200	SCB	WB, IHC/IF
PECAM1 (2H8)		Ar Hamster	1:100 1:200	Millipore	FC IHC/IF
Tubulin (11H10)		Rabbit	1:2000	CST	WB
VEGF-A ELISA kit				Sigma Aldrich	ELISA
VEGFR2			1:1000	CST	WB
α -Ar Hamster IgG	Cy3	Goat	1:500	JIR	IHC/IF
α -Ar Hamster IgG	PE	Goat	1:100	eBioscience	FC
α -Rat IgG	Alexa 488	Goat	1:500	Thermo Fisher Scientific	IHC/IF
α -Rabbit IgG	DyLight647	Donkey	1:100	BioLegend	IHC/IF

Ar Hamster: Armenian Hamster, SCB: Santa Cruz Biotechnology, CST: Cell Signaling Technology, JIR: Jackson ImmunoResearch, FC: flow cytometry, WB: western blotting, IHC: immunohistochemistry, IF: immunofluorescence.

第4項 小動物用代謝計測システムによるエネルギー代謝の計測

酸素消費量 (VO₂)、二酸化炭素排出量 (VCO₂)、自発運動量および呼吸商 (RQ) は小動物用代謝計測システム (MK-5000RQ; Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) を用いて、既報に基づき計測した (Yonezawa et al., 2012)。

第5項 糖・インスリン負荷試験

糖負荷試験およびインスリン負荷試験は、6 時間絶食下において、マウスにグルコース (2 g/kg) またはインスリン (0.75 U/kg) を腹腔内投与後 0、15、30、60 および 120 分において尾静脈から採血し、グルコースセンサー (ニプロフリースタイルセンサー、NIPRO、Osaka, Japan) によって血糖値を測定した。また、糖負荷試験中の血漿インスリン濃度を測定するため、グルコース投与後 0、15 および 30 分において尾静脈からヘパリン採血し、4°C、1,000×g で 20 分間遠心した上清を採取した。

第6項 正常血糖高インスリンクランプ試験

高脂肪食負荷 12 週間後に頸静脈カニューレ挿入手術を行い、7-8 日間の回復期間を設けた。6 時間絶食下で正常血糖高インスリンクランプ試験を行った。クランプ試験中は [³H] グルコースを 0.1 μCi/min で 120 分間、持続的に注入した。ヒトインスリンを 2.5 mU/kg/min で注入し、110±20 mg/dL の血糖値を維持するために必要な量の 40%グルコース溶液を注入した。血糖値は 10 分ごとに計測した。インスリン注入後 90 から 120 分において尾静脈から採血を行い、血漿サンプル中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。グルコース注入速度 GIR および内因性糖産生 EGP はインスリン注入後 90 から 120 分間の放射活性値から算出した (Kimura et al., 2012)。

第7項 骨髄由来マクロファージの培養

骨髄由来マクロファージは、8-10 週齢の *Pdgfrb*^{flx/flx} および *Cre-ER*TM/*Pdgfrb*^{flx/flx} マウスの大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞を既報に基づいて分化させることにより得た (Wada et al., 2013)。骨髄細胞はポリ D リジンコーティングを行ったディッシュ上に播種し、10% FCS を添加した RPMI1640 細胞培養液 (Gibco, Kanagawa, Japan) で 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。*Pdgfrb* を欠損させるため、骨髄細胞を 100 nM 4-hydroxytamoxifen で 48 時間処置した。その後、骨髄由来マクロファージへ分化させるために、10% FCS と 20% L929 培養上清を含む RPMI1640 細胞培養液 (分化培養液) で 7 日間培養した。その間、3-4 日目において培養液を交換した。分化誘導後、6-well plates に骨髄由来マクロファージを播種し、分化培養液で 24 時間培養した。炎症性活性の検討では、4 時間の無血清条件下で培養したのち、1 ng/mL LPS で 3 時間刺激し、遺伝子発現解析用に回収した。

第8項 マウス胎仔線維芽細胞の培養

マウス胎仔線維芽細胞は、*Pdgfrb*^{flx/flx} と *Cre-ER*TM/*Pdgfrb*^{flx/flx} マウスを交配させた胎生 13.5-14.5 日目の胎仔の体幹部から得た。マウス胎仔線維芽細胞を 100 mm ディッシュで 2-3 日間、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。マウス胎仔線維芽細胞の増殖活性の変化は、MTT 法とインスリン刺激による遺伝子発現変化により評価した。マウス胎仔線維芽細胞を 100 nM 4-hydroxytamoxifen で 48 時間処置した。MTT 法による細胞増殖能の検討は、既報に基づいて行った (Dusseault et al., 2016; Yamani et al., 2015)。5×10³ cells/well の細胞濃度で 24-well plates に播種したマウス胎仔線維芽細胞を用い、播種後 1 および 2 日目に MTT 法を行った。MTT 溶液は、PBS で調製した 5 mg/mL

MTT (Dojindo, Kumamoto, Japan) を 6 倍量の 10% FCS 含有 DMEM で希釈して調製した。MTT 溶液で細胞を 1.5 時間処置したのち洗浄し、細胞に取り込まれ析出した不溶性の結晶を DMSO で溶解させた。DMSO 溶解液の吸光度 (540 nm) を分光光度計 (FilterMax F5, Molecular Devices, CA, USA) により測定した。インスリンによる遺伝子発現変化の解析には、 2×10^5 cells/well の細胞濃度で 12-well plates に播種したマウス胎仔線維芽細胞を用いた。細胞を血清不含培養液で 13 時間培養後、10 または 100 ng/mL insulin で 24 時間刺激し、遺伝子発現解析を行った。マウス胎仔線維芽細胞の脂肪細胞への分化は 3T3-L1 脂肪細胞と同様に行った。マウス胎仔線維芽細胞を 1×10^5 cells/well で 12-well plates に播種し、100%コンフルエントになるまで培養した。細胞を分化誘導培養液で 60 時間培養し、100 nM 4-hydroxytamoxifen を添加したインスリン含有 DMEM で 48 時間培養した。2 日ごとに培養液を交換し、分化誘導 8 日目の細胞を使用した。Oil Red O 染色液は、100% 2-propanol で調製した 3 mg/mL Oil red O を蒸留水で 60% に希釈し、ろ液を使用した。細胞を 10% ホルムアルデヒドで室温、10 分間固定した。60% 2-propanol で細胞を 1 分間処置した後、Oil Red O 染色液で室温、10-20 分間染色した。60% 2-propanol および PBS で洗浄後、倒立顕微鏡 (BZ-8000, Keyence, Osaka, Japan) で観察した。また、細胞内 Oil red O を 100% 2-propanol で溶出し、溶出液の吸光度 (490 nm) を分光光度計 (FilterMax F5, Molecular Devices, CA, USA) により測定した。

第 9 項 脂肪組織片の培養

脂肪組織片の培養において、やせ型の 8-12 週齢のマウスから精巢上体脂肪組織を摘出し、約 3 mm 四方の組織片に分割したものを血清不含の DMEM で培養した。*Pdgfrb* を欠損した脂肪組織を得るために、*Pdgfrb*^{flx/flx} および Cre-ERTM/*Pdgfrb*^{flx/flx} マウスの脂肪組織片を 100 nM 4-hydroxytamoxifen で 48 時間処置した。これらの脂肪組織片をリコンビナントマウス PDGF-BB で 24 時間処置し、その後の Whole-mount 蛍光免疫染色法による解析に使用した。

第 10 項 脂肪細胞と間質血管細胞分画の分離

脂肪細胞と間質血管細胞分画の分離は既報に基づいて行った (Fujisaka e al., 2009 and 2013)。秤量後、細かく刻んだ精巢上体脂肪組織を、Krebs-Henseleit-HEPES (KRHAG) buffer (pH 7.4) に 20% BSA と 2 mM グルコースを添加した 2 mg/mL collagenase 溶液で 37 °C、45 分間振とうさせながら反応させた。その後、遠心分離 (1,000 rpm, 4 °C, 5 分) と洗浄を 3 回繰り返して得られた浮遊性分画を脂肪細胞、沈殿物として得られた分画を間質血管細胞分画として回収した。それぞれの分画は遺伝子発現解析または Flow cytometry による解析に用いた。

第 11 項 Flow cytometry を用いた細胞分析と細胞分取

Flow cytometry を用いた検討は既報に基づいて行った (Fujisaka e al., 2009 and 2013)。細胞の処理はすべて氷上で行った。間質血管細胞分画の細胞を Pharm Lysing buffer (BD Bioscience, NJ, USA) で 4 °C、15 分間溶血させ、1% BSA を添加した BD FACSFlo (BD Bioscience, NJ, USA) で再懸濁させた。細胞は抗 CD16/CD32 抗体で 10 分間ブロッキングしたのち、特異的抗体とアイソタイプコントロール (Table 4) で 30 分間反応させた。細胞を洗浄したのち、1% BSA を添加した BD FACSFlo で再懸濁させた。細胞を 7-amino-actinomycin D (BD Bioscience, NJ, USA) で反応させたのち、FACSCanto II (BD Bioscience, NJ, USA) を用いて細胞分析、FACS Aria SORP (BD Bioscience, NJ, USA) を用いて細胞を分取した。データ解析は FCS Express 4 (De Novo Software, CA, USA) を用いて解析した。

第 12 項 組織化学的解析および免疫組織化学的解析

組織化学的解析および免疫組織化学的解析は既報に基づいて行った (Yonezawa et al., 2012)。に用いた肝臓、精巣上体脂肪組織および鼠径部脂肪組織は 4%パラホルムアルデヒドに浸漬し、一晚 4 °C で固定した。その後、組織を 75%エタノールで脱水し、パラフィン包埋した。切片厚 6 μm の切片を hematoxylin-eosin (HE) で染色した。また、CD11c の免疫染色は、切片厚 6 μm のパラフィン切片を抗マウス CD11c 抗体 (BIO-RAD; dilution, 1:100, 10 μg/mL) で 3 時間反応させたのち、ヤギ抗ハムスター IgG 抗体 (1:100, 8 μg/mL) を 1 時間反応させた。発色反応には 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dako, Glostrup, Denmark) を用いた。また、核染色は hematoxylin 染色を行った。組織標本を正立顕微鏡 (BX61; Olympus, Tokyo, Japan) で撮影した。脂肪細胞面積は VH Analyzer (VH-H1A5; Keyence, Osaka, Japan) または Image J (National Institute of Health, MD, USA) を用いて、一検体あたり 300 細胞以上の細胞面積を計測し、解析した。

第 13 項 免疫蛍光染色法による組織学的解析

免疫蛍光染色法による組織学的解析は、一部改変を加えて、既報に基づき検討した (Xue et al., 2010)。精巣上体脂肪組織は、1%パラホルムアルデヒドに浸漬し、一晚 4 °C で固定した。その後、PBS で洗浄し、凍結切片または Whole-mount 免疫蛍光染色用に処理した。凍結切片には脂肪組織の中央部を optimal cutting temperature (OCT) コンパウンド (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) に包埋し、-80 °C で凝固させたサンプルを使用した。CM3050 cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて、試料台温度を-30 °C に設定し、切片厚 30-40 μm の凍結切片を作製した。凍結切片はアセトンで室温 10 分間処理した。切片を Protein block (Dako, Glostrup, Denmark) で室温 1 時間ブロッキングしたのち、抗原特異的一次抗体を一晚 4 °C で反応させた。洗浄後、室温 2 時間ブロッキングを行い、蛍光標識二次抗体を 45 分間、遮光下室温で反応させた。切片を洗浄後、Fluoromount (Diagnostic BioSystems, CA, USA) で封入した。Whole-mount 免疫蛍光染色には脂肪組織の先端を使用した (Cho et al., 2007)。10 mM Tris-HCl で調製した 20 μg/mL Proteinase K に脂肪組織を浸漬し、5 分間室温で振とうした。0.03% tween-20 を添加した PBS (PBST) で洗浄後、Protein block を用いて一晚 4 °C でブロッキングした。組織サンプルを PBST で洗浄後、抗原特異的一次抗体で一晚 4 °C で反応させた。組織サンプルを PBST で洗浄後、蛍光標識二次抗体で一晚 4 °C で反応させた。使用した抗体は Table 3 に示した。すべての抗体の希釈には Antibody diluent (Dako, Glostrup, Denmark) を使用した。脂肪組織の散乱光を減少させるため、透明化処理を行った (Ke et al., 2013)。組織サンプルを 20%、40%および 60% (wt/vol) フルクトース溶液に浸漬し、4 °C でそれぞれ 4-8 時間処理した。さらに、組織サンプルを 80%および 100% (wt/vol) フルクトース溶液に浸漬し、4 °C で 12 時間処理した。その後、80.2% (wt/wt) フルクトース溶液に浸漬し、4 °C で 24 時間処理した。すべてのフルクトース溶液には 0.5% (vol/vol) β-mercaptoethanol を添加した。組織標本の染色画像は共焦点レーザー顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) により撮影した。血管面積およびペリサイトの血管への接着率は Image J (National Institute of Health, MD, USA) を用いて解析した。

第 14 項 Real-time PCR

各組織および培養細胞からの Total RNA の抽出は TRIsure (Bioline Reagents Ltd., London, UK) を使用した。Total RNA からの cDNA の作製は Primer Script™ RT Reagent Kit (for Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社、Shiga, Japan) を用いた。Real-time PCR は SYBR® Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) を用い、Mx3000P/3005 QPCR system Agilent Technologies., CA, USA) により定量した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA (*Rn18s*) の遺伝子発現により補正した。定量に用いたプライマー配列を Table 4 に示す。

Table 4. プライマーの配列

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>Acaca</i>	GGGCACAGACCGTGGTAGTT	CAGGATCAGCTGGGATACTGAGT
<i>Adipoq</i>	ACAGGAGATGTTGGAATGACAG	CTGCCGTCATAATGATTCTGTT
<i>Ccl2</i>	CCACTCACCTGCTGCTACTCAT	TGGTGATCCTCTTGTAGCCTC
<i>Cidea</i>	TGCTCTTCTGTATCGCCCAGT	GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG
<i>Cpt1</i>	CAAAGATCAATCGGACCCTAGAC	CGCCACTCACGATGTTCTTC
<i>Emr1</i>	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
<i>Fasn</i>	ATCCTGGAACGAGAACACGATCT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
<i>G6pc</i>	GAAAAAGCCAACGTATGGATTCC	CAGCAAGGTAGATCCGGGA
<i>Hif1a</i>	ACAAGTCACCACAGGACAG	AGGGAGAAAATCAAGTCG
<i>Itgax</i>	ATGTTGGAGGAAGCAAATGG	CCTGGGAATCCTATTGCAGA
<i>Mki67</i>	AATCCAACCTCAAGTAAACGGGG	TTGGCTTGCTTCCATCCTCA
<i>Leptin</i>	CCAGGATGACACCAAAACCCTC	ATCCAGGCTCTCTGGCTTCTGC
<i>Lipe</i>	CACCCATAGTCAAGAACCCTTC	TCTACCACTTTCAGCGTCACCG
<i>Mlxipl</i>	GATGGTGCGAACAGCTCTTCT	CTGGGCTGTGTCAATGGTGAA
<i>Mrc1</i>	TGTGGTGAGCTGAAAGGTGA	CAGGTGTGGGCTCAGGTAGT
<i>Pck</i>	CAGGATCGAAAGCAAGACAGT	AAGTCCTCTTCCGACATCCAG
<i>Pdgfb</i>	CCCACAGTGGCTTTTCATT	GTGAACGTAGGGGAAGTGGA
<i>Pdgfrb</i>	AGGACAACCGTACCTTGGGTGACT	CAGTTCTGACACGTACCGGGTCTC
<i>Pdrn16</i>	CTTCTCCGAGATCCGAAACTTC	GATCTCAGGCCGTTTGTCCAT
<i>Pnpla2</i>	CAACGCCACTCACATCTACGG	TCACCAGGTTGAAGGAGGGAT
<i>Ppara</i>	CGGGAAAGACCAGCAACAAC	TGGCAGCAGTGGGAAGAATCG
<i>Pparg</i>	TCGCTGATGCACTGCCTATG	TGTCAAAGGAATGCGAGTGGTC
<i>Ppargc1a</i>	GCCCGGTACAGTGAGTGTTT	CTGGGCCGTTTAGTCTTCT
<i>Rn18s</i>	GTAACCCDTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>Srebf1</i>	GATGTGCGAACTGGACACAG	CATAGGGGGCGTCAAACAG
<i>Tnfa</i>	AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA	GGCACCCTAGTTGGTTGTCT TTG
<i>Ucp1</i>	TACCAAGCTGTGCGATGT	AAGCCCAATGATGTTCAAGT
<i>Vegfa</i>	GAAGGAGAGCAGAAGTCCCA	ACACAGGACGGCTTGAAGAT

第 15 項 Western blotting 法

抽出した組織からのタンパク質の抽出はすべて氷上で行った。組織を Lysis buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 5 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (pH 8.0), 10 mM sodium diphosphate, 100 mM sodium fluoride, 1% Nonidet P-40, 2 mM sodium orthovanadate (V), 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride] に浸漬し、ホモジナイズ後 1 時間、細胞を溶解させた。13,200 rpm、4°C で 15 分間、遠心分離を行い、脂質と不溶性画分を除いた。細胞溶解液のタンパク濃度を Bradford 法により測定し、検体間のタンパク濃度を均一にした。100 mM dithiothreitol を添加した Laemmli buffer [0.01% bromophenol blue, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 50% glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)] を細胞溶解液と等量混合し、5 分間煮沸したものをサンプルとした。サンプルを 7.5% SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene difluoride membranes (PVDM) に転写した。メンブレンは 5% BSA または 5% non-fat milk を添加した Tris buffered saline-Tween 20 (TBS-T; 50 mM Tris, 150 mM NaCl および 0.1% Tween 20, pH 7.5) に浸漬し、1 時間室温でブロッキングした。メンブレンを一次抗体と 4 °C で一晩反応させた。メンブレンを TBS-T で洗浄後、horseradish peroxidase 標識二次抗体と反応させ、Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いた化学発光法によりルミノイメージアナライザー (LAS-4000; Fujifilm, Tokyo, Japan) にて検出した。使用した抗体は Table 3 に示した。特異的シグナルの強度の定量は Scion Image (Scion Co, MD, USA) を用いて計測した。

第 16 項 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。対応のない二群間の比較には Student's *t*-test の両側検定を用いて *P* 値を算出した。また、二種類の遺伝子型 (knockout vs. FL) と二種類の食餌 (通常食 vs. 高脂肪食) の要素を含む他群間の比較には、2-way ANOVA による分散分析を行ったのち、多重検定比較を Bonferroni's test (Stat view) により行い、*P* 値を得た。一方、一要因の群間比較には、One-way ANOVA による分散分析を行ったのち、多重検定比較を Bonferroni's test (YSTAT 2004) により行い、*P* 値を得た。*P* < 0.05 を有意とした。

第3節 結果

第1項 高脂肪食負荷による血管新生関連因子の発現変化

食餌性肥満により脂肪組織では、低酸素状態に応答して血管新生因子の発現が上昇する。そこでまず、やせ型と食餌性肥満の C57/BL6 マウスの各組織において、血管新生因子である PDGF-B とその受容体 PDGFR β の遺伝子発現変化を解析した。脂肪組織において *Pdgfb* の mRNA 発現は、高脂肪食負荷により顕著に増加した。一方、肝臓、骨格筋および視床下部では、*Pdgfb* の mRNA 発現の変化は認められなかった (Figure 9A)。*Pdgfrb* の mRNA 発現も *Pdgfb* の mRNA 発現と同様の発現変化を認めた (Figure 9B)。血管内皮マーカーである VEGFR2 (*Kdr*) の mRNA 発現は、高脂肪食負荷により脂肪組織に限局して増加を示したが、骨格筋や肝臓ではその発現に変化を認めないことから (Figure 9C)、脂肪組織特異的な *Pdgfb* と *Pdgfrb* の mRNA 発現増加は血管新生を反映していると考えられた。脂肪組織における *Pdgfb* の mRNA 発現は、高脂肪食負荷の 8 週目以降に顕著な増加が認められた (Figure 9D)。一方、*Vegfa* の mRNA 発現変化にも増加が認められたが、その変化は *Pdgfb* と比較して緩徐であった (Figure 9E)。高脂肪食負荷により、血清 PDGF-B 濃度はわずかに増加した一方、血清 VEGF-A 濃度は有意な上昇を示さなかった (Figure 9F)。これらの結果から、肥満の進展において脂肪組織では VEGF-A と比較して、PDGF-B が強く産生誘導され、オートクライン/パラクライン作用により脂肪組織のリモデリングに寄与することが示唆された。

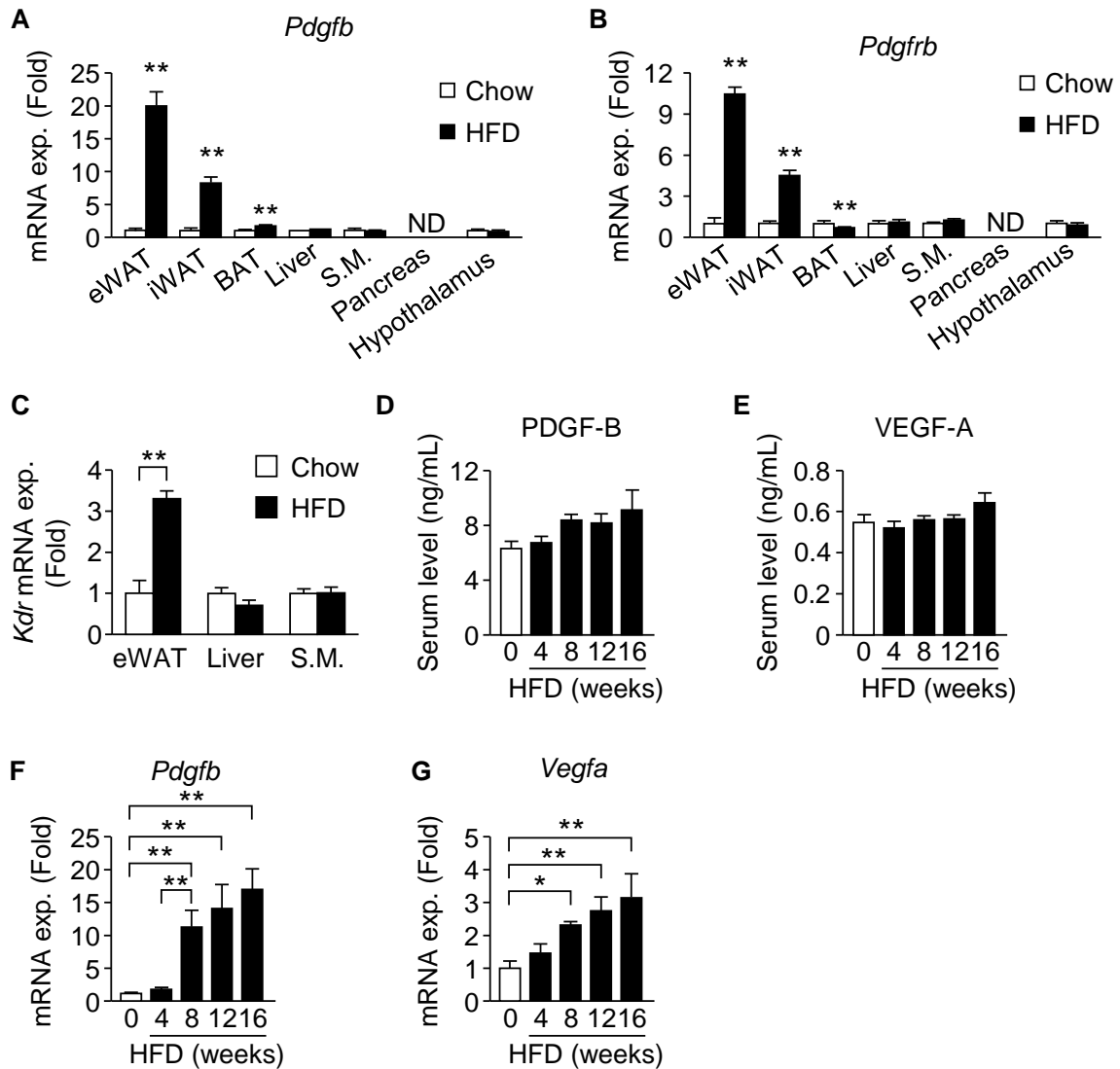


Figure 9. 高脂肪食負荷による血管新生関連因子の発現変化

マウスに通常食 (Chow, □) または高脂肪食 (HFD, ■) を8週齢から14-16週間給餌した。(A, B) 高脂肪食負荷による各組織の *Pdgfb* (A) および *Pdgfrb* (B) の mRNA 発現変化 (n = 4-6/群)。(C) 高脂肪食負荷による *Kdr* の mRNA 発現変化 (n = 4-6/群)。(D, E) 高脂肪食負荷期間における血清 PDGF-B (D) および VEGF-A (E) 濃度の経時的変化 (n = 5-6/群)。(F, G) 高脂肪食負荷期間における脂肪組織の *Pdgfb* (F) および *Vegfa* (G) の mRNA 発現変化 (n = 4-6/群)。値は平均値±標準偏差で示した。eWAT: 精巣上体白色脂肪組織、iWAT: 鼠径部白色脂肪組織、BAT: 褐色脂肪組織、S. M.: 骨格筋。ND: 検出不可。* $P < 0.05$ および** $P < 0.01$ 。

第2項 全身性 *Pdgfrb* 欠損マウスを用いた実験のプロトコールと欠損効率

肥満の進展過程において発現上昇が認められる PDGF-B と PDGFR β が、脂肪組織の肥大化と糖代謝に及ぼす影響を明らかにするため、tamoxifen 誘導性 cre/loxP システムを用いて (Shen et al., 2012; Xue et al., 2012) *Pdgfrb* の欠損の影響を解析した。実験プロトコールは Figure 10A に示した。*Pdgfrb*^{4SYS}-KO および対照群である FL マウスを2群に分け、通常食または高脂肪食を給餌した。先天的に全身において *Pdgfrb* を欠損するマウスは胎生致死であるが (Crosby et al., 1998; Hellström et al., 1999; Lindahl et al., 1997)、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスは生存可能であり、正常に発達する (data not shown)。脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓および骨格筋における *Pdgfrb* の mRNA 発現およびタンパク発現は、FL マウスと比較して *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスにおいて顕著に低下した (Figure 10B, C)。

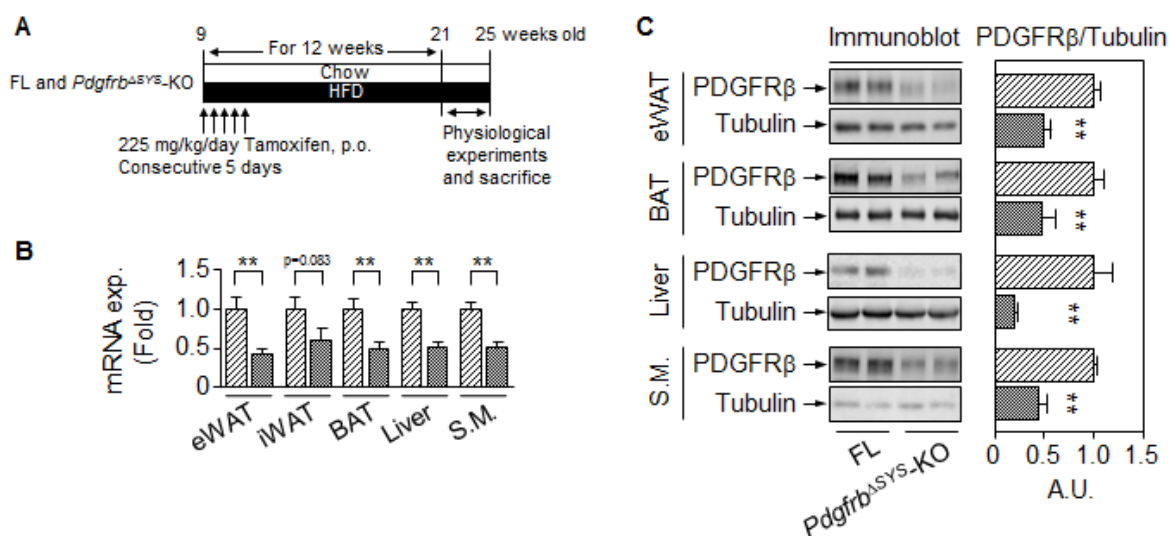


Figure 10. 全身性 *Pdgfrb* 欠損マウスを用いた実験のプロトコールと欠損効率

(A) Tamoxifen 投与のプロトコールと高脂肪食負荷のプロトコール。*Pdgfrb*^{4SYS}-KO と FL マウスを複製するため、9 週齢において、*Cre-ER*TM/*Pdgfrb*^{lox/lox} と *Pdgfrb*^{lox/lox} マウスにそれぞれ tamoxifen を投与した。それぞれのマウスを2群に分け、通常食または高脂肪食を給餌した。*In vivo* における代謝表現型の解析は21 から25 週齢において施行し、その後、組織摘出のために屠殺した。(B, C) 通常食を給餌した FL および *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの各組織における PDGFR β の mRNA 発現量 (B) とタンパク発現量 (C)。Tamoxifen を投与し、23-24 週齢で屠殺した。Tubulin はローディングコントロールとして使用した。n = 4-9/群。値は平均値±標準偏差で示した。**P*<0.05 および ***P*<0.01。(▨)通常食給餌 FL マウス、(▩) 通常食給餌 *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウス。A.U.: arbitrary unit, eWAT: 精巢上体脂肪組織、iWAT: 鼠径部脂肪組織、BAT: 褐色脂肪組織、S. M.: 骨格筋。

第2項 *Pdgfrb* 欠損による体重推移および体脂肪蓄積の変化

Tamoxifen の投与前までは *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスと FL マウスは同等の体重であった。一方、12週間の通常食飼育下において、*Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスの体重増加は FL マウスと比較して軽度であった (Figure 11A)。さらに、高脂肪食条件下において、*Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスの体重増加、皮下脂肪および内臓脂肪の蓄積は顕著に抑制された (Figure 11A-D)。しかし、除脂肪体積および後肢体積には genotype 間で差異を認めなかった (Figure 11C)。脂肪体積変化の結果と一致して、高脂肪食条件下における空腹時血清レプチン濃度は、FL マウス (47.1±2.3 ng/mL) と比較して、*Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウス (20.8±5.5 ng/mL) において顕著に低下した。これらの結果から、PDGFRβ シグナルは脂質蓄積において重要な役割を果たすことが示唆される。

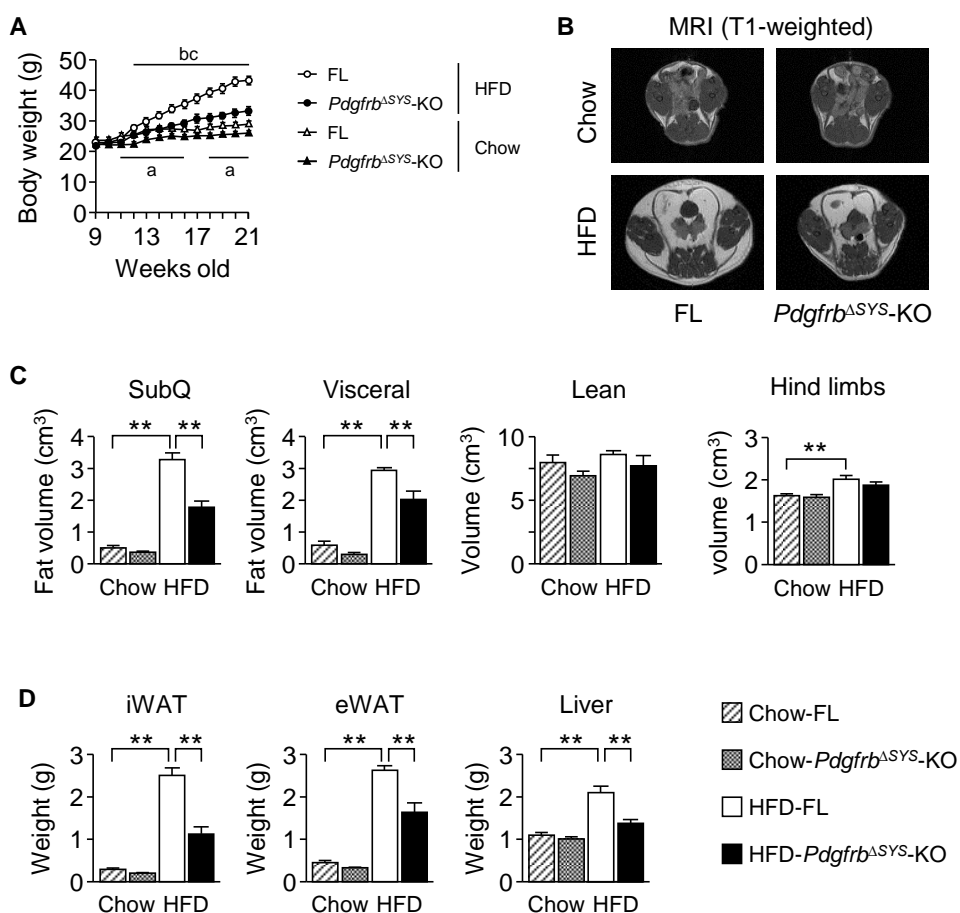


Figure 11. 全身性 *Pdgfrb* 欠損マウスの体重と組織重量変化

(A) 通常食 (chow) または高脂肪食 (HFD) 条件下の FL と *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスの体重変化。(B) MRI (T1 強調) により撮影した代表的な画像。(C) MRI 画像から定量した皮下脂肪 (SubQ)、内臓脂肪 (Visceral)、除脂肪 (Lean) および後肢 (Hind limbs) の体積。(D) 23-25 週齢における組織重量。値は平均値±標準偏差で示した。n = 6-10/群。**P* < 0.05 および ***P* < 0.01。^a*P* < 0.05 は通常食給餌における FL と *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスとの比較。^b*P* < 0.05 は FL における食餌間の比較。^c*P* < 0.05 は高脂肪食負荷における FL と *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスとの比較。(△、▨) 通常食給餌 FL マウス、(▲、▩) 通常食給餌 *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウス、(○、□) 高脂肪食負荷 FL マウスおよび (●、■) 高脂肪食負荷 *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウス。iWAT: 鼠径部脂肪組織、eWAT: 精巣上体脂肪組織。

第3項 *Pdgfrb* 欠損マウスの脂肪細胞の形態変化

Pdgfrb^{ΔSYS}-KO マウスにおいて、高脂肪食負荷による体脂肪蓄積が抑制されたことから、FL および *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスの精巣上体脂肪組織における脂肪細胞面積を解析した。高脂肪食負荷により精巣上体脂肪組織の脂肪細胞は、FL マウスでは顕著な肥大化が認められた。一方、*Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスにおいては、この肥大化は有意に抑制された (Figure 12A-C)。

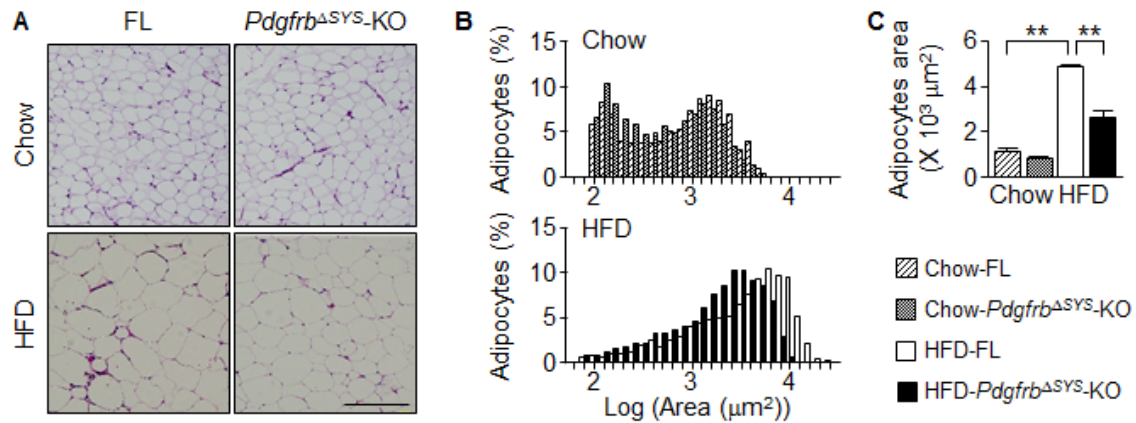


Figure 12. *Pdgfrb* 欠損マウスの脂肪細胞の形態変化

(A) FL および *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスの精巣上体脂肪組織における、代表的なヘマトキシリン・エオジン染色の画像。スケールバー: 200 μm。(B) 通常食 (Chow、上段) および高脂肪食 (HFD、下段) を負荷した FL および *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスの精巣上体脂肪組織における、脂肪細胞面積の頻度分布。(C) 脂肪細胞の平均面積。n = 4-8/群。値は平均値±標準偏差で示した。**P < 0.01。(▨) 通常食給餌 FL マウス、(▩) 通常食給餌 *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウス、(□) 高脂肪食負荷 FL マウスおよび (■) 高脂肪食負荷 *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウス。

第4項 *Pdgfrb* 欠損による脂肪細胞分化と細胞増殖の変化

脂肪細胞分化における *Pdgfrb* 欠損の直接的な影響を明らかにするため、FL および *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスから胎仔線維芽細胞を単離し (FL- および KO-MEF)、*in vitro* において、これらの細胞の脂肪細胞への分化を比較した (Figure 13A-C)。KO-MEF における脂質蓄積は、FL-MEF と比較してわずかに増加した (Figure 13A, B)。さらに、KO-MEF における脂肪細胞の分化マーカーの mRNA 発現について、*Adipoq* はわずかに高く、*Leptin* および *Pparg* は有意に増加した (Figure 13C)。一方、MTT 法とインスリン刺激による Ki67 発現の解析から、KO-MEF の増殖活性は FL-MEF と比較して抑制された (Figure 13D, E)。これらの結果から、PDGFRβ の欠損による体脂肪量の低下は、脂肪細胞の分化が抑制された結果ではないと考えられる。

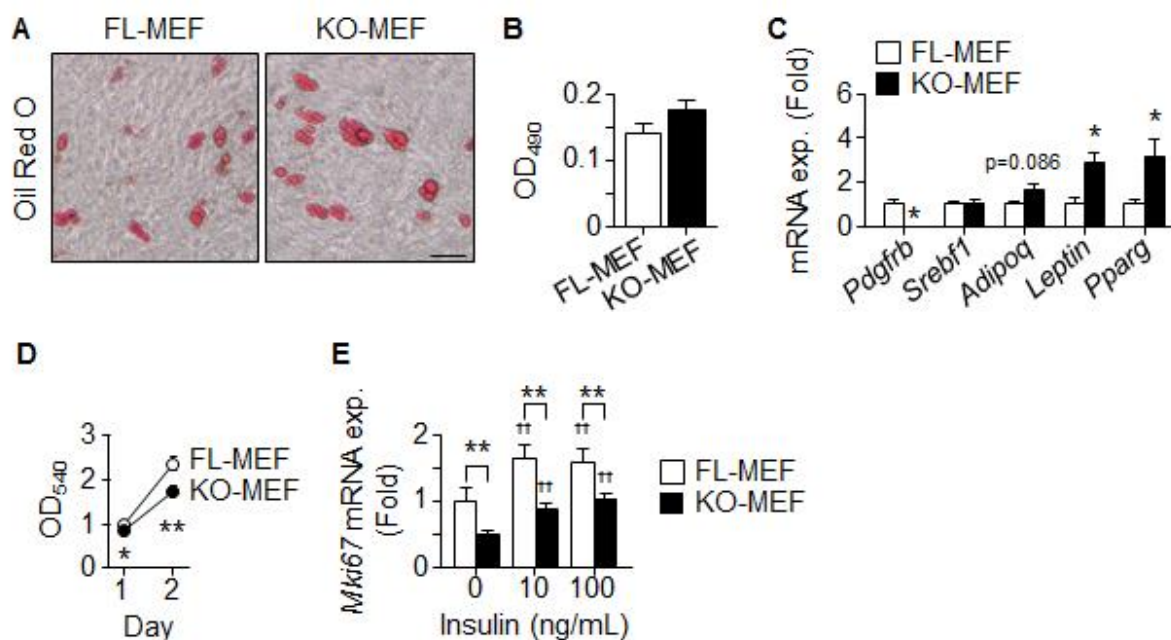


Figure 13. *Pdgfrb* 欠損による脂肪細胞分化と細胞増殖の変化

(A, B) FL および *Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスの胎仔線維芽細胞 (FL- および KO-MEF) を脂肪細胞へ分化誘導後、8 日目における Oil red O 染色の代表画像 (A) および脂質含量 (B)。n = 3/群。スケールバー: 50 μm。(C) マウス胎仔線維芽細胞を脂肪細胞へ分化誘導後、8 日目における脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現変化。データは 3 回の独立した実験結果の平均値を示した。(D) MTT 法により評価した *in vitro* 7 日目における細胞の増殖活性。n = 8-14/群。(E) インスリン誘導性の Ki67 遺伝子発現変化。値は平均値±標準偏差で示した。**P*<0.05 および ***P*<0.01。††*P*<0.01 は同じ遺伝子型をもつ細胞間での insulin 非刺激群との比較。(□) FL-MEF、(■) KO-MEF。

第5項 *Pdgfrb* 欠損による肥大化脂肪組織の慢性炎症の変化

Pdgfrb^{ASYS}-KO マウスは、高脂肪食負荷による脂肪組織の肥大化が抑制されたことから、次に精巣上体脂肪組織における慢性炎症を検討した。免疫染色による解析では、通常食を給餌したいずれの遺伝子型のマウスの精巣上体脂肪組織においても、CD11c 陽性マクロファージはほとんど観察されなかった (data not shown)。高脂肪食を負荷した FL マウスの精巣上体脂肪組織において、細胞死に至った脂肪細胞の周囲を CD11c 陽性マクロファージが取り囲む、王冠様構造が数多く認められた (Figure 14A, B)。しかし、高脂肪食を負荷した *Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスにおいて、王冠様構造は有意に減少した (Figure 14A, B)。次に、フローサイトメトリーを用いた解析により、高脂肪食を負荷した *Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスの精巣上体脂肪組織において、間質血管細胞分画に存在するマクロファージの量的および質的变化を解析した (Figure 14C, D)。組織学的な解析結果と一致して、総マクロファージ数は、FL マウスと比較して *Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスにおいて減少した (Figure 14C)。さらに、CD45 陽性 F4/80 陽性マクロファージに占める CD11c 陽性 CD206 陰性 M1-マクロファージの割合は、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスにおいて減少した (Figure 14D)。一方、CD45 陽性 F4/80 陽性マクロファージに占める CD11c 陰性 CD206 陽性 M2-マクロファージの割合は、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスにおいて有意に増加した (Figure 14D)。

通常食および高脂肪食を負荷した FL および *Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスの精巣上体脂肪組織における遺伝子発現解析を行った (Figure 14E)。血管新生因子 VEGF-A (*Vegfa*)、抗炎症性アディポカイン Adiponectin (*Adipoq*)、脂肪新生関連分子 PPAR γ (*Pparg*)、PGC1 α (*Ppargc1a*)、脂肪分解酵素 HSL (*Lipe*) および ATGL (*Pnpla2*) の mRNA 発現は、4 群間で有意な差を認めなかった (Figure 14E、左図)。低酸素と炎症性遺伝子の発現変化について、HIF1 α (*Hif1a*)、マクロファージマーカー F4/80 (*Emr1*)、M1-マクロファージマーカー CD11c (*Itgax*)、M2-マクロファージマーカー CD206 (*Mrc1*)、炎症性サイトカイン TNF α (*Tnfa*) および単球走化性因子 MCP1 (*Ccl2*) の mRNA 発現は、高脂肪食を負荷した FL マウスにおいて顕著に増加した (Figure 14E、右図)。一方、高脂肪食負荷によるこれらの遺伝子発現増加は、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスにおいて有意に抑制された (Figure 14E、右図)。高脂肪食条件下において、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスの *Pdgfrb* の遺伝子発現は、FL マウスと比較して有意に低下した (data not shown)。これらの結果から、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスにおいて、高脂肪食負荷による精巣上体脂肪組織の慢性炎症が抑制されたと考えられる。

次に、マクロファージの *Pdgfrb* 欠損による炎症性応答の変化を *in vitro* 実験系で解析した (Figure 14F)。マクロファージの成熟化マーカーである *Emr1*、*Itgax* および *Mrc1* の mRNA 発現は、FL および *Pdgfrb*^{ASYS}-KO の骨髄由来マクロファージ (FL- および KO-BMDM) において、同程度の発現を認めた (data not shown)。重要なことに、LPS 誘導性の *Tnfa* の遺伝子発現は、両者の BMDM との間に有意な差を認めなかった (Figure 14F)。したがって、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスにおいて高脂肪食負荷による精巣上体脂肪組織の慢性炎症が抑制されたことは、脂肪組織の肥大化が抑制されたことに起因し、マクロファージにおける *Pdgfrb* 欠損の直接的な影響ではないと考えられる。

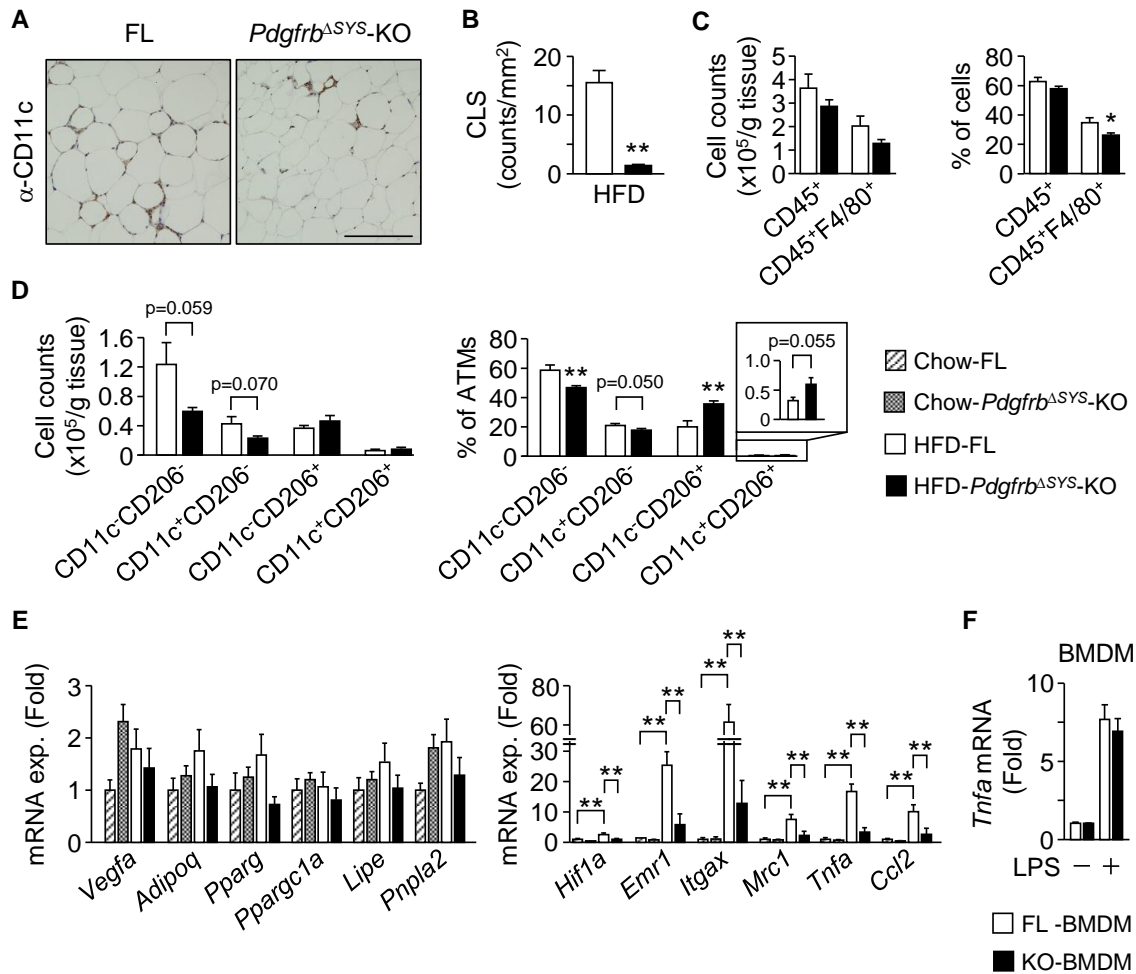


Figure 14. *Pdgfrb* 欠損による肥大化脂肪組織の慢性炎症の変化

(A) 高脂肪食を負荷した FL および *Pdgfrb*^{ASYS-KO} マウスの精巣上体脂肪組織における、抗 CD11c 抗体による免疫染色の代表画像。スケールバー: 200 μm。(B) 王冠様構造の数。n = 6-8/群。(C, D) 高脂肪食を負荷したマウスの精巣上体脂肪組織の間質血管細胞分画におけるフローサイトメトリー解析。(C) 精巣上体脂肪組織の間質血管細胞分画における、CD45 陽性細胞または CD45 陽性 F4/80 陽性細胞の数 (左図) および全細胞に占める割合 (右図)。(D) 精巣上体脂肪組織の間質血管細胞分画における CD45 陽性 F4/80 陽性細胞の亜集団 CD11c 陰性 CD206 陰性、CD11c 陽性 CD206 陰性、CD11c 陰性 CD206 陽性または CD11c 陽性 CD206 陽性細胞の数 (左図) およびその割合 (右図)。n = 6-7/群。挿入図は CD11c 陽性 CD206 陽性細胞データの拡大表示。(E) 通常食および高脂肪食を負荷した FL および *Pdgfrb*^{ASYS-KO} マウスの精巣上体脂肪組織における mRNA 発現変化。n = 4-10/群。(▨) 通常食給餌 FL マウス、(▩) 通常食給餌 *Pdgfrb*^{ASYS-KO} マウス、(□) 高脂肪食負荷 FL マウスおよび (■) 高脂肪食負荷 *Pdgfrb*^{ASYS-KO} マウス。(F) FL (□) と *Pdgfrb*^{ASYS-KO} (■) マウスから採取した骨髄由来マクロファージ (FL- および KO-BMDM) に対して、LPS (0 または 1 ng/mL) を 3 時間刺激した際の *Tnfa* の mRNA 発現変化。データは 3 回の独立した実験結果の平均値を示した。値は平均値±標準偏差で示した。**P*<0.05 および ***P*<0.01。

第6項 *Pdgfrb* 欠損による脂肪組織の血管密度と血管構造の変化

血管ネットワークの形成は脂肪組織の肥大化に必須であることから、FL および *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの精巣上体脂肪組織における血管構造を検討した。通常食および高脂肪食条件において、*Pdgfrb* の欠損により血管面積と血管の分岐数は顕著に低下した (Figure 15A-C)。FL マウスの精巣上体脂肪組織における血管内皮細胞マーカーVEGFR2 のタンパクレベルは、高脂肪食負荷により顕著に増加する一方、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスではこの変化は認められなかった (data not shown)。PDGFR β は精巣上体脂肪組織の成熟脂肪細胞分画ではなく、間質血管細胞分画に多く発現し、特に血管周皮細胞であるペリサイトに発現することを確認した (Figure 15D, E)。これらの細胞は、ペリサイトマーカーである CD13 と neural/glial antigen 2 (NG2) を共発現した (Figure 15D)。PDGF-B は血管の成熟化に際し、ペリサイトの PDGFR β 活性化を介してペリサイトを新生血管の血管内皮細胞へ動員する血管新生因子である (Andrae et al., 2008)。精巣上体脂肪組織における血管の成熟度を検討するため、CD13 陽性細胞をペリサイトと定義し、血管内皮細胞 (赤色) に対するペリサイト (緑色) の接着率を解析した (Figure 15 F, G) (Furuhashi et al., 2004; Schrimpf et al., 2014)。通常食を給餌した FL および *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの脂肪組織において、ペリサイトは血管に沿って密着する様子が観察された (Figure 15F, 黄色で示された部分)。重要なことに、FL マウスにおいて、高脂肪食負荷下の脂肪組織血管ではペリサイトの接着率が顕著に低下し (Figure 15F)、血管新生が起こりやすい状態にあることが明らかとなった (33)。高脂肪食負荷によるペリサイト局在の経時的変化を、C57BL/6 マウスを用いて検討したところ、ペリサイトの接着率は高脂肪食の負荷期間依存的に低下した (Figure 15H)。一方、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの精巣上体脂肪組織において、高脂肪食負荷によるペリサイト接着率の低下は認められず、通常食を給餌した FL マウスと同程度の接着率であった (Figure 15F, G)。興味深いことに、高脂肪食を負荷した FL マウスの精巣上体脂肪組織では、ペリサイトが脱落したいくつかの血管内皮細胞の核において、増殖マーカーKi67 染色の陽性所見を認めた (Figure 15I)。フローサイトメトリー解析により、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの血管内皮細胞におけるKi67 の平均蛍光強度は、FL マウスと比較して有意に低下した (Figure 15J)。これらの結果から以下のことが推測される。高脂肪食負荷により脂肪組織の血管ではペリサイトの脱落が誘導され、その結果血管内皮細胞は増殖、血管新生へと向かう。一方、肥満に伴うこれら一連の血管リモデリングは *Pdgfrb* 欠損下では抑制されたと考えられる。

第7項 脂肪血管ペリサイトの局在変化における PDGFR β シグナルの役割

成熟血管からのペリサイト脱落に対する PDGF-BB の関与を直接検討するために、やせ型マウスから摘出した精巣上体脂肪組織を培養し、PDGF-BB 処置の影響を検証した (Figure 16A, B)。対照の脂肪組織において、CD13 陽性ペリサイトは PECAMI 陽性の血管に沿って密着していた。一方、PDGF-BB 処置は濃度依存的に血管へのペリサイトの接着率を低下させた (Figure 16A-C)。血管から脱落したペリサイトは血管との密着が損なわれたために、紡錘形を示した (Figure 16B, 矢印)。さらにペリサイトに対する PDGF-BB の作用を遺伝子欠損マウス由来の脂肪組織で検討したところ、FL マウスに比べ PDGFR β の発現量が低い *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの培養脂肪組織では (Figure 16D, E)、PDGF-BB 処置による血管からのペリサイトの脱落は有意に抑制された (Figure 16F, G)。これらの結果から、脂肪組織において血管周囲での高濃度の PDGF-BB が、PDGFR β シグナルを介して成熟血管からのペリサイトの脱落を促進させることで、血管新生の開始に深く関わると考えられる。

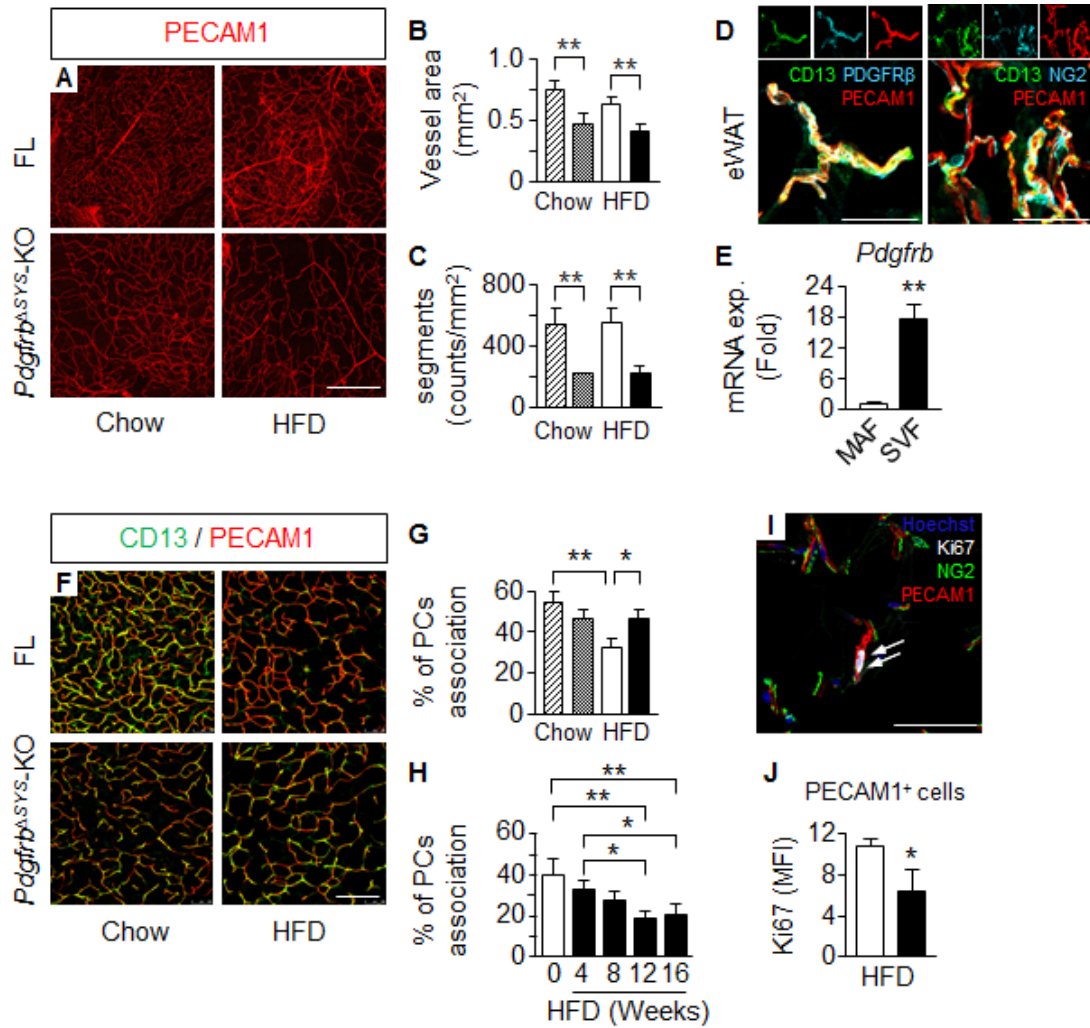


Figure 15. *Pdgfrb* 欠損による脂肪組織の血管密度と血管構造の変化

(A-C) 通常食 (Chow) または高脂肪食 (HFD) を負荷した FL と *Pdgfrb*^{ΔSYS-KO} マウスの精巣上体脂肪組織における血管構造の変化。(A) 精巣上体脂肪組織の whole-mount 蛍光免疫染色により観察した血管構造の代表画像。血管は抗 PECAM1 抗体による染色で可視化した。スケールバー: 500 μm。(B, C) 低倍率画像 (対物 10 倍) における血管面積 (B) と血管の分岐数 (C)。n = 4/群。(D) 通常食を給餌した FL マウスの精巣上体脂肪組織の凍結切片に対して、抗 CD13 (緑色) と抗 PDGFRβ (水色、左図) または抗 NG2 (水色、右図) 抗体を用いて蛍光免疫染色し、血管周皮細胞 (ペリサイト) を染色した。血管は抗 PECAM1 抗体による染色で可視化した。スケールバー: 50 μm。(E) C57BL/6J マウスの精巣上体脂肪組織から分離した成熟脂肪細胞分画と間質血管細胞分画における *Pdgfrb* の mRNA 発現量。(F) 通常食または高脂肪食を負荷した FL と *Pdgfrb*^{ΔSYS-KO} マウスの精巣上体脂肪組織に対して、抗 PECAM1 (赤色、血管内皮細胞) と抗 CD13 [緑色、ペリサイト (PCs)] 抗体を用いて行った whole-mount 蛍光免疫染色の代表画像。スケールバー: 200 μm。(G) 図 F における血管へのペリサイトの接着率。(H) 高脂肪食を負荷した C57BL/6 マウスの精巣上体脂肪組織における血管へのペリサイトの接着率。n = 4-5/群。(I) 高脂肪食を負荷した FL マウスの精巣上体脂肪組織の凍結切片に対して、Hoechst (青色、核)、抗 Ki67 (白色)、NG2 (緑色) および PECAM1 (赤色) 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った代表画像。矢印は Ki67 の陽性所見を示す。スケールバー: 100 μm。(続きの説明文は次項)

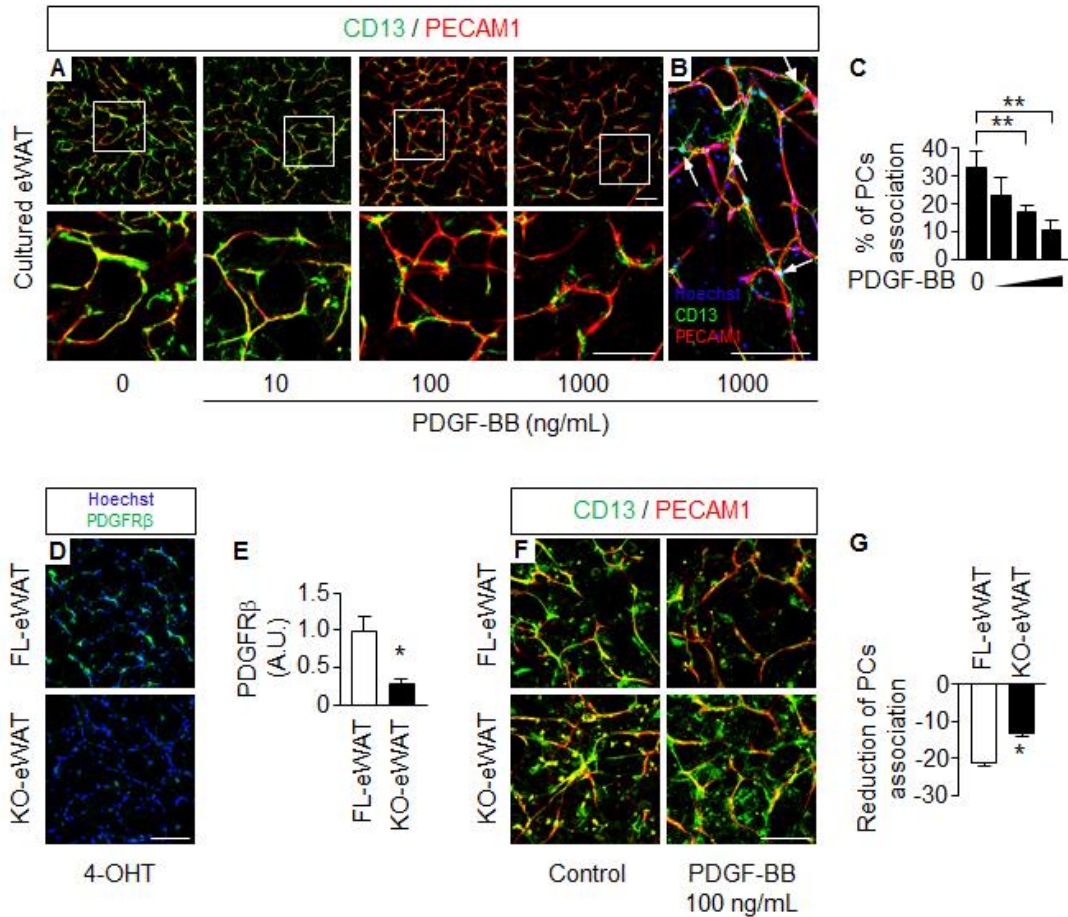


Figure 16. 脂肪血管ペリサイトの局在変化における PDGFR β シグナルの役割

正常マウスから摘出した精巢上体脂肪組織 (eWAT) を PDGF-BB 存在下で 24 時間培養し、whole-mount 蛍光免疫染色法により血管構造を観察した。(A, B) 各濃度の PDGF-B で処置した培養精巢上体脂肪組織に対して、Hoechst (青色、核)、抗 CD13 (緑色) および抗 PECAM1 (赤色) 抗体を用いて行った whole-mount 蛍光免疫染色の代表画像。スケールバー: 50 μ m。下段画像は上段画像の白枠内の拡大画像。(B) 1 μ g/mL PDGF-BB で 24 時間培養した精巢上体脂肪組織の代表的な高倍率画像。(C) 図 A の低倍率画像における血管へのペリサイト (PCs) 接着率。n = 6/群。(D-G) PDGF-BB 誘発性ペリサイト局在変化における PDGFR β 欠損の影響。(D, E) 100 nM 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) で 48 時間処置した、FL および *Cre-ERTM/Pdgfrb^{flx/flx}* マウス由来の精巢上体脂肪組織 (FL-および KO-eWAT) における PDGFR β (緑色) 陽性細胞の代表例 (D) および PDGFR β 陽性シグナルの平均蛍光強度 (E)。n = 3/群。(F) 100 ng/mL PDGF-B で 24 時間処置した FL-および KO-eWAT に対して、抗 CD13 (緑色) および抗 PECAM1 (赤色) 抗体を用いて行った whole-mount 蛍光免疫染色の代表画像。スケールバー: 100 μ m。(G) 図 F における血管へのペリサイト接着率。n = 9-11/群。データは独立した実験結果の平均値を示した。値は平均値 \pm 標準偏差で示した。* $P < 0.05$ および ** $P < 0.01$ 。

(J) 高脂肪食を負荷した FL と *Pdgfrb^{ASYS}*-KO マウスの精巢上体脂肪組織の間質血管細胞分画における血管内皮細胞の Ki67 の平均蛍光強度 (MFI)。n = 6-11/群。値は平均値 \pm 標準偏差で示した。* $P < 0.05$ および ** $P < 0.01$ 。(☒) 通常食給餌 FL マウス、(☒) 通常食給餌 *Pdgfrb^{ASYS}*-KO マウス、(□) 高脂肪食負荷 FL マウスおよび (■) 高脂肪食負荷 *Pdgfrb^{ASYS}*-KO マウス。

第 8 項 高脂肪食負荷により脂肪組織で増加する PDGF-B の産生細胞の探索

肥大化脂肪組織において認められる PDGF-B の顕著な増加に寄与する細胞種を特定するため、食餌性肥満マウスの精巣上体脂肪組織を成熟脂肪細胞分画と間質血管細胞分画に分離し、遺伝子発現解析を行った。*Pdgfb* の mRNA 発現は、成熟脂肪細胞分画と比較して間質血管細胞分画において高い発現を認めた (Figure 17A)。さらに間質血管細胞分画を、CD45 陽性 F4/80 陽性マクロファージと CD45 陰性 F4/80 陰性である血管内皮細胞および前駆脂肪細胞を含む非免疫細胞に分離した。やせ型では *Pdgfb* の mRNA 発現は両細胞集団で同程度であった。一方、肥満状態では、*Pdgfb* の mRNA 発現はマクロファージ集団において顕著に増加した (Figure 17B)。血管内皮細胞は、PDGF-B を産生することで血管の成熟化に重要な役割を果たすことから (Armulik et al., 2005)、食餌性肥満マウスの精巣上体脂肪組織から CD45 陰性 CD31 陽性血管内皮細胞を分取し、*Pdgfb* の mRNA 発現を検討した。CD45 陰性 CD31 陽性血管内皮細胞の *Pdgfb* の mRNA 発現は、CD45 陽性 F4/80 陽性マクロファージと同程度の高い発現を示した (Figure 17C)。しかし、食餌性肥満マウスの精巣上体脂肪組織の間質血管細胞分画に存在する大多数の細胞は、CD45 陽性 F4/80 陰性または CD45 陽性 F4/80 陽性集団に属し、CD45 陰性 CD31 陽性血管内皮細胞の割合は $1.1 \pm 0.1\%$ とわずかであった (Figure 17D)。

次に、食餌性肥満マウスの精巣上体脂肪組織でのマクロファージ亜集団における *Pdgfb* の遺伝子発現を解析した (Figure 17E, F)。*Pdgfb* の mRNA 発現は、F4/80 陽性 CD11c 陽性 CD206 陽性マクロファージにおいて一見高い発現が認められたが、全マクロファージに占めるこれらの細胞集団の割合はわずかであり ($0.3 \pm 0.1\%$)、F4/80 陽性 CD11c 陽性 CD206 陰性 M1-マクロファージが *Pdgfb* を発現する主要な細胞であった (Figure 17E)。さらに、F4/80 陽性 CD11c 陰性 CD206 陽性 M2-マクロファージではなく、F4/80 陽性 CD11c 陽性 CD206 陰性 M1-マクロファージ選択的に、高脂肪食の負荷期間依存的な *Pdgfb* の mRNA 発現の増加が認められた (Figure 17F)。また、この発現変化は精巣上体脂肪組織におけるペリサイトの接着率の低下と相関していた (Figure 15H)。これらの結果と一致し、肥大化脂肪組織における血管に対するペリサイトの接着率を組織学的に観察したところ、マクロファージが集積した王冠様構造に近い領域における接着率は、王冠様構造から遠い領域と比較して有意な低下を認めた (Figure 17G, H)。これらの結果から、脂肪組織の肥大化において、肥満に伴い浸潤する M1-マクロファージが、血管リモデリングを加速する高濃度 PDGF-B の供給に強く寄与することが示唆される。

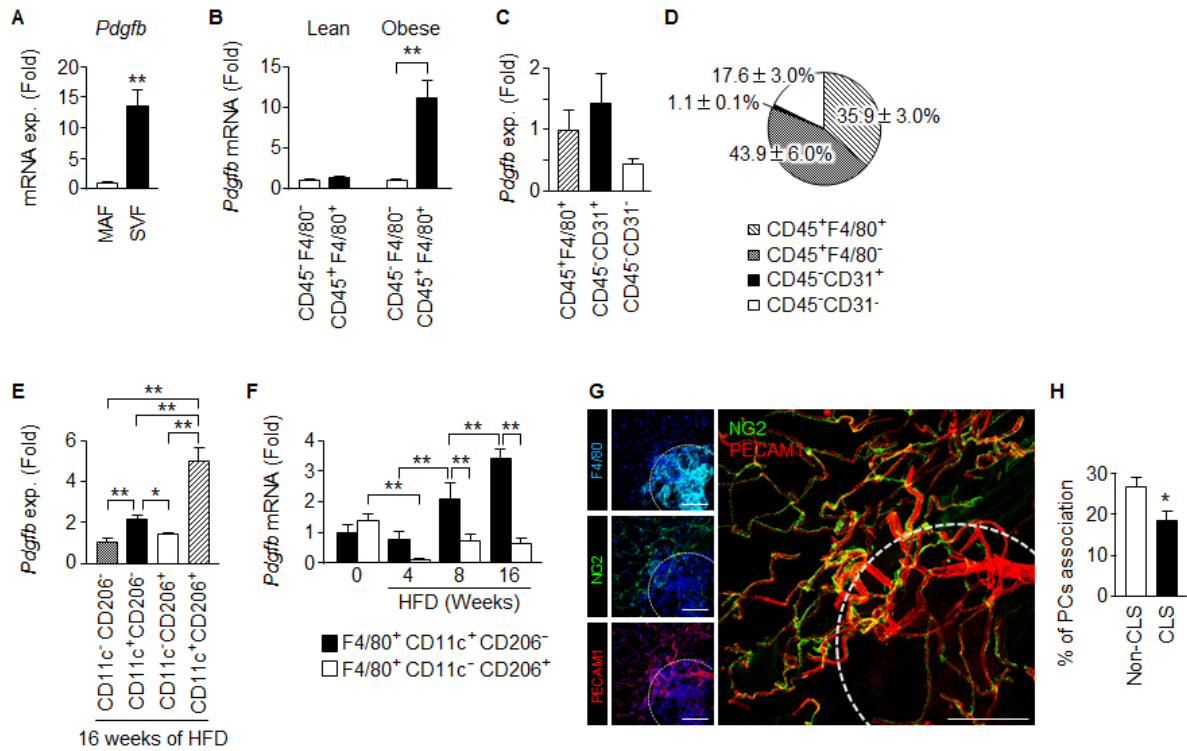


Figure 17. 高脂肪食負荷により脂肪組織で増加する PDGF-B の産生細胞の探索

(A) C57BL/6J マウスに 8 週齢から高脂肪食 (HFD) を負荷し、22 週齢において摘出した精巣上体脂肪組織の成熟脂肪細胞分画と間質血管細胞分画における *Pdgfb* の mRNA 発現量。n = 5-6/群。(B) 12 週間の高脂肪食負荷の前 (Lean) と後 (Obese) において、FL マウスの精巣上体脂肪組織の間質血管細胞分画から分離した、CD45 陰性 F4/80 陰性の非免疫細胞と CD45 陽性 F4/80 陽性マクロファージにおける *Pdgfb* の mRNA 発現量。n = 6/群。(C, D) 間質血管細胞分画における細胞集団の比率と各集団における *Pdgfb* の mRNA 発現量。高脂肪食を負荷した肥満マウスの精巣上体脂肪組織の間質血管細胞分画を、CD45 陰性 CD31 陽性血管内皮細胞集団 (■)、CD45 陰性 CD31 陰性非白血球集団 (□)、CD45 陽性 F4/80 陽性マクロファージ集団 (▨) および CD45 陽性 F4/80 陰性白血球集団 (▩) に分離した。各集団における *Pdgfb* の mRNA 発現量 (C) と各細胞集団の存在比率 (D)。n = 4/群。(E) 高脂肪食を負荷したマウスの精巣上体脂肪組織の間質血管細胞分画に存在するマクロファージを、CD11c 陰性 CD206 陰性、CD11c 陽性 CD206 陰性、CD11c 陰性 CD206 陽性および CD11c 陽性 CD206 陽性に分離した。各細胞集団における *Pdgfb* の mRNA 発現量を解析した。(F) 高脂肪食を負荷した C57BL/6J マウスの精巣上体脂肪組織から分離した間質血管細胞分画に存在する、F4/80 陽性 CD11c 陽性 CD206 陰性 (■) および F4/80 陽性 CD11c 陰性 CD206 陽性 (□) 細胞における、経時的な *Pdgfb* の mRNA 発現変化。n = 5-6/群。(G, H) 12 週間の高脂肪食負荷を行ったマウスの精巣上体脂肪組織における、王冠様構造近傍の領域とこれ以外の領域での血管へのペリサイト接着率。n = 6。肥満マウスの精巣上体脂肪組織の凍結切片に対して、抗 F4/80 (水色: マクロファージ)、抗 NG2 [緑色: ペリサイト (PCs)] および抗 PECAM1 (赤色: 血管内皮細胞) 抗体を用いて行った蛍光免疫染色の代表画像 (G)。スケールバー: 100 μ m。王冠様構造 (18 か所) とこれ以外の領域 (同じ標本の王冠様構造を除いた 7 か所) での血管へのペリサイト接着率 (H)。値は平均値 \pm 標準偏差で示した。* $P < 0.05$ および ** $P < 0.01$ 。

第9項 *Pdgfrb* 欠損による異所性脂質蓄積の変化

脂肪組織に蓄積されず余剰となった脂質は、脂肪組織以外の臓器に蓄積し、インスリン抵抗性を引き起こす。*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスでは脂肪組織の肥大化が抑制されたことから、それぞれのマウスにおいて脂質代謝を解析した。絶食下における血清中非エステル化脂肪酸 (NEFA)、中性脂肪 (triglyceride: TG) およびコレステロール量は、通常食を給餌した *Pdgfrb*^{4SYS}-KO と FL マウスとの間に差異を認めなかった。一方、高脂肪食を負荷した *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの血清中性脂肪とコレステロール量は、FL マウスと比較して有意に低下した (Table 5)。高脂肪食によって引き起こされる大腿四頭筋と肝臓への中性脂肪の蓄積は、FL マウスと比較して有意に減少した (Figure 18A, B)。肝臓の組織学的な解析により、高脂肪食を負荷した FL マウスにおいて、肝脂質蓄積が増加した結果と一致して、顕著な空泡変性が認められた (Figure 18C)。一方、これらの脂肪肝の特徴は *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスでは軽減した (Figure 18C)。肝臓における脂質合成系、 β 酸化系および糖新生律速酵素の遺伝子発現は、高脂肪食を負荷した FL マウスにおいて顕著に増加した (Figure 18D)。一方、高脂肪食負荷によるこれらの遺伝子発現増加の大半は、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスにおいて抑制された (Figure 18D)。

第10項 *Pdgfrb* 欠損によるエネルギー消費の変化

Pdgfrb^{4SYS}-KO マウスは、脂肪組織の肥大化が抑制されたにもかかわらず、高脂肪食負荷による異所性の脂質蓄積が認められなかったことから、マウスにおけるエネルギー代謝を解析した。通常食と高脂肪食の両条件下において、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの酸素消費量 (VO₂) と二酸化炭素排出量 (VCO₂) は、FL マウスと比較して明期・暗期とも高値を示した (Figure 18E, F)。また、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの自発運動量も増加した (Figure 18G)。*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスに認められる摂食量の増加は (Figure 18H)、エネルギー消費亢進の代償作用であると考えられる。

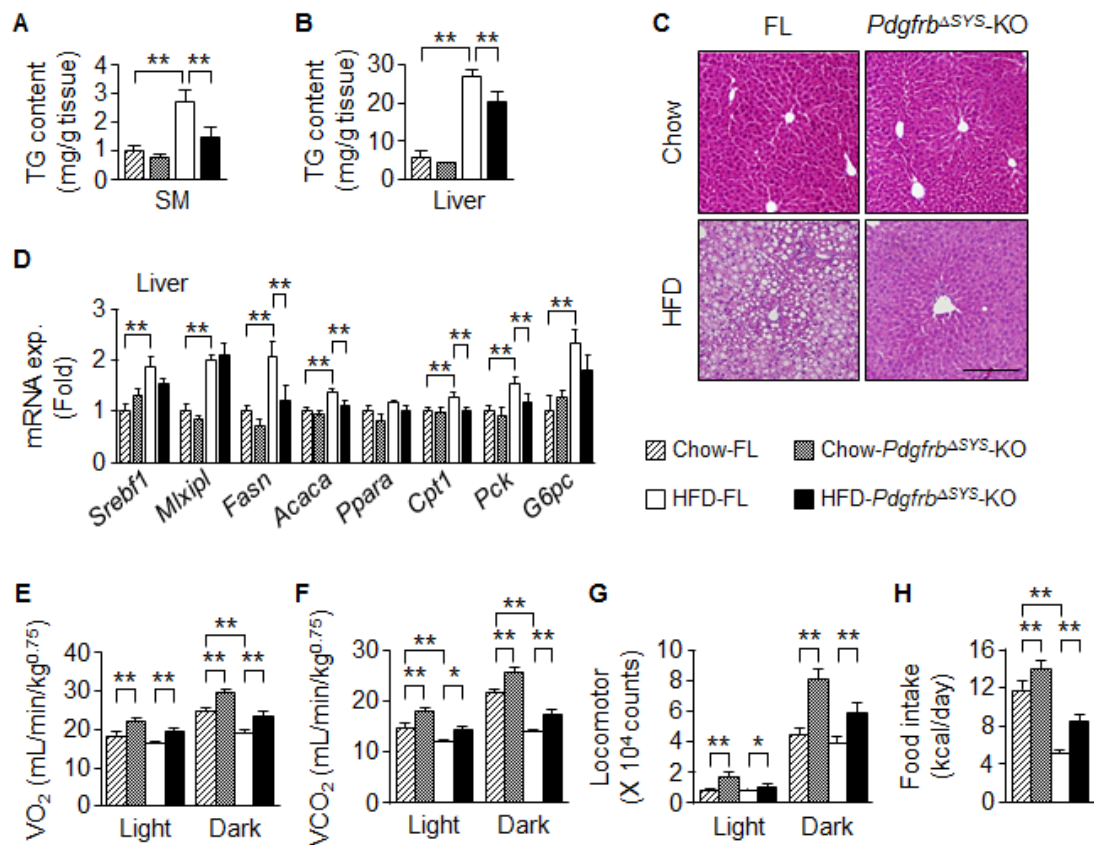
第11項 *Pdgfrb* 欠損による糖代謝の変化

Pdgfrb^{4SYS}-KO マウスは、高脂肪食負荷による肥満と慢性炎症が抑制されたことから、糖代謝の変化を検討した (Figure 19A-D)。通常食条件下において、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO の糖負荷試験中の血糖値は、FL マウスと比較して有意に低下したが、その時のインスリン濃度とインスリン負荷試験中の血糖値には両群間に差異を認めなかった。高脂肪食負荷による耐糖能異常、高インスリン血症およびインスリン抵抗性は、FL マウスと比較して *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスにおいて有意に抑制された。高脂肪食を負荷したマウスのインスリン感受性をより詳細に検討するため、正常血糖高インスリンクランプ試験を行った。*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスは、全身の糖利用の増加とインスリンによる肝糖産生の抑制と関連して、グルコース注入速度の顕著な亢進を示した (Figure 19E-G)。そこで次に、*Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの精巣上体脂肪組織、肝臓および骨格筋におけるインスリン誘導性の Akt リン酸化を検討した (Figure 19H)。高脂肪食負荷により、FL マウスのすべての組織において、リン酸化レベルが低下した。重要なことに、高脂肪食を負荷した *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの各組織において、リン酸化レベルの低下が有意に抑制された。これらの結果から、PDGFR β の欠損は、高脂肪食負荷による精巣上体脂肪組織、肝臓および骨格筋におけるインスリン抵抗性を抑制すると考えられる。

Table 5. 絶食下における血液生化学解析

Parameters	Chow		HFD	
	FL	<i>Pdgfrb</i> ^{ΔSYS-KO}	FL	<i>Pdgfrb</i> ^{ΔSYS-KO}
Blood glucose (mg/dL)	110±6	100±5	138±8**	124±7
Serum insulin (ng/mL)	0.84±0.10	1.21±0.25	2.54±0.36**	1.37±0.29† †
Serum total cholesterol (mg/dL)	80.7±1.66	74.9±2.56	180.5±3.50**	152.0±7.72**, ††
Serum triglyceride (mg/dL)	56.5±3.83	51.0±2.87	58.7±2.74	45.0±2.40* †
Serum NEFA (mEq/L)	1.00±0.16	0.87±0.08	0.54±0.03**	0.45±0.03**

通常食 (chow) および高脂肪食 (HFD) を 14-16 週間給餌したマウスの 6 時間絶食下における血液生化学的解析。値は平均値±標準偏差で示した。n = 6-10/群。**P*<0.05 および ***P*<0.01 は通常食給餌 FL マウスとの比較。†*P*<0.05 および ††*P*<0.01 は高脂肪食負荷 FL マウスとの比較。NEFA: 非エステル化脂肪酸。



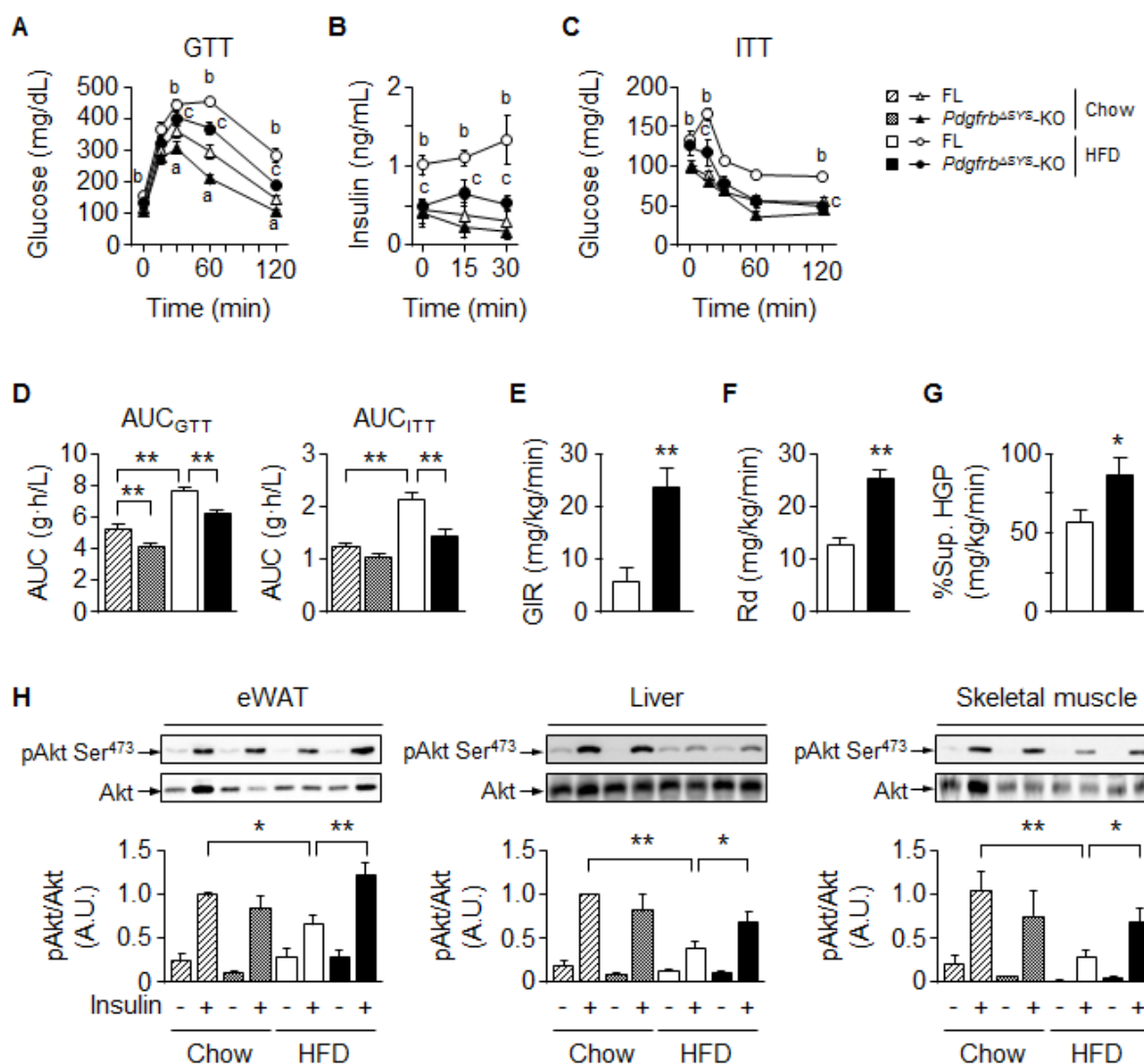


Figure 19. *Pdgfrb* 欠損による糖代謝の変化

通常食 (Chow) を給餌した FL (\triangle , \square) と *Pdgfrb*^{4SYS}-KO (\blacktriangle , \blacksquare) マウスおよび高脂肪食 (HFD) を負荷した FL (\circ , \square) と *Pdgfrb*^{4SYS}-KO (\bullet , \blacksquare) マウスを解析した。(A, B) 糖負荷試験 (GTT) における血糖値 (A) と血漿インスリン値 (B)。n = 8-10/群。(C) インスリン負荷試験 (ITT) における血糖値。n = 6-9/群。^a*P* < 0.05 は通常食給餌における FL と *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスとの比較。^b*P* < 0.05 は FL における食餌間の比較。^c*P* < 0.05 は高脂肪食負荷における FL と *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスとの比較。(D) 糖負荷試験 (A) とインスリン負荷試験 (B) における血糖変化の曲線下面積 (AUC)。(E-G) 高脂肪食負荷マウスの 22 週齢における正常血糖高インスリンクランプ試験。6 時間絶食下における、FL および *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスのグルコース注入速度 (GIR, E)、糖利用率 (Rd, F) および肝糖産生 (HGP) 抑制率 (G)。n = 6/群。(H) 24 週齢の FL および *Pdgfrb*^{4SYS}-KO マウスの精巢上体脂肪組織、肝臓および骨格筋における、インスリン誘導性 Akt リン酸化の代表的な western blotting 画像と定量結果。n = 4-6/群。6 時間絶食下で insulin (1.0 U/kg 体重) を尾静脈内投与し、5 分後に組織サンプルを摘出した。値は平均値 ± 標準偏差で示した。****P* < 0.05 および *****P* < 0.01。

第4節 考察

脂肪組織はエネルギー状態に応じて可塑的に体積を変化させる。脂肪組織が肥大化する際に、血管新生は拡大した領域へ酸素や栄養素を供給するために必須である。本研究では、食餌性肥満の脂肪組織での血管新生の誘導機構における、PDGF-B-PDGFR β シグナルの重要な役割を見出した。肥満に伴い増加する PDGF-B は、成熟血管からのペリサイトの脱落を促進させ、この現象は肥大化脂肪組織の血管内皮細胞の増殖と関連していた。一方、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスの脂肪組織ではペリサイトの脱落が抑制され、血管面積が低下した。さらに、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスのエネルギー代謝は亢進した。*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスに認められるこれらの変化が、高脂肪食負荷による脂肪細胞の肥大化と慢性炎症の抑制に寄与すると考えられる。

PDGFR β は主に血管周皮細胞・ペリサイトに限局して発現し、このシグナルは新生血管の成熟に密接に関与することが知られている (Heldin et al., 1999)。成熟血管はペリサイトに覆われているが、このペリサイトは血管内皮細胞から分泌された PDGF-B により動員される (Carmeliet 2003)。血管に接着したペリサイトは血管内皮細胞の増殖を抑制することから (Carmeliet et al., 2003; Jain et al., 22-3; Potente et al., 2011; Schimpf et al., 2014)、血管からのペリサイトの脱落により血管新生が開始すると考えられる。本研究では FL マウスの脂肪組織において、高脂肪食負荷により血管に接着するペリサイトが顕著に低下することを見出した (Figure 15)。この結果と強く関連する報告として、肥満患者の脂肪組織ではやせ型の被験者と比較して、血管内皮細胞に対するペリサイトの比率が小さいことが示されている (Pellegrinelli et al., 2014)。また培養脂肪組織の実験において、外因的な PDGF-B の処置は、PDGFR β を介して成熟血管からのペリサイトの脱落を促進させた (Figure 16)。さらに、肥大化脂肪組織では、ペリサイトが脱落した血管内皮細胞において、増殖細胞を認めた (Figure 15)。したがって、肥大化脂肪組織の血管では血管新生が増加していると推察される。一方、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスの脂肪組織では、高脂肪食負荷によるペリサイトの脱落が限定的であったため、高脂肪食負荷による血管新生と脂肪組織の肥大化が軽減されたと考えられる。これらの結果から、肥満に伴う脂肪組織の血管新生は、ペリサイトにおける PDGF-B-PDGFR β シグナルに制御されていると考えられる。

血管内皮細胞から産生された PDGF-B は、ペリサイトの増殖と血管への動員を促進させることが報告されている (Abramsson et al., 2003; Heldin et al., 1999)。一方、がん移植片に由来する過剰な PDGF-B は、血管からがん細胞へペリサイトを誘引することが示されている (Heldin et al., 1999; Hsaka et al., 2013)。したがって、ペリサイトは PDGF-B の濃度勾配にしたがって、その遊走の方向を決定すると考えられる。脂肪組織における PDGF-B 産生細胞を検討したところ、やせ型マウスの脂肪組織では、CD45 陰性 F4/80 陰性集団と CD45 陽性 F4/80 陽性マクロファージにおける *Pdgfb* の mRNA 発現は同程度であった。一方、肥満マウスの脂肪組織では、F4/80 陽性 CD11c 陽性 CD206 陰性 M1-マクロファージに選択的に *Pdgfb* の mRNA 発現が増加した (Figure 17)。血管内皮細胞においても *Pdgfb* の mRNA 発現を認めたが、肥大化脂肪組織において血管内皮細胞の存在比率はわずかであった (Figure 17)。これらの結果をふまえ、肥満における PDGF-B-PDGFR β シグナルを介した脂肪組織の肥大化機構が以下のように推察される。つまり、正常な状態では、成熟血管の機能を維持するために、血管内皮細胞が PDGF-B を産生し、ペリサイトを血管へ動員する。一方、高脂

肪食条件下では、肥大化した脂肪組織に浸潤する M1-マクロファージが過剰に PDGF-B を産生する。過剰な PDGF-B は、ペリサイトに発現する PDGFR β シグナルを介して血管からのペリサイトの脱落を引き起こし、これが血管新生の開始点となると考えられる。このような脂肪組織の血管新生を伴うリモデリングは、組織へのさらなるエネルギー貯蔵を可能とし、脂肪組織の肥大化を助長する。したがって *Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスの脂肪組織において認められたように、PDGFR β シグナルの抑制は、高脂肪食を負荷した血管からのペリサイトの脱落と脂肪組織の肥大化を抑制することにつながる。

M2-マクロファージは血管の分岐点の近傍に局在し、VEGF などの血管新生因子を分泌することで血管新生に重要な役割を果たすと考えられてきた (Schmidt et al., 2010)。一方本研究において、肥満マウスの脂肪組織では、M1-マクロファージが PDGF-B の主要な供給源であった (Figure 17)。肥大化脂肪組織の CD11c 陽性 CD206 陽性マクロファージにおいて、*Pdgfb* の高い mRNA 発現を認めたが、この亜集団は脂肪組織には極めてわずかしかな存在しなかった (Figure 17)。したがって、このマクロファージ集団の機能的意義は未解明である。肥満によって肝臓と骨格筋においても M1-マクロファージの浸潤が認められ、慢性炎症の進展に寄与する (Fink et al., 2014; Itoh et al., 2013)。しかし、高脂肪食を負荷したマウスの肝臓と骨格筋において、*Pdgfb* の mRNA 発現増加を認めなかった (Figure 10)。これらの結果から、食餌性肥満マウスの脂肪組織において、異常なアディポカインの産生または低酸素のような脂肪組織に特有の環境が、M1-マクロファージの PDGF-B 産生の促進に関わると考えられる。本研究と既報を合わせて考察すると、肥満状態では、M1-マクロファージは PDGF 分泌を介して脂肪組織における血管リモデリングに寄与する一方、M2-マクロファージは生理的条件における血管系の発達と機能維持に関与していることが推察される。

Tamoxifen は Cre 発現依存的な遺伝子改変マウスを作製するために広く使用されている。しかし、近年のいくつかの報告では、脂肪細胞機能への影響が懸念されている。特に、tamoxifen 投与期間中、急性的な脂肪細胞死により体重低下が認められ、投与中止後に、新規の脂肪細胞分化により体重の回復を認めることが報告された (Ye et al., 2015)。本研究では同一条件で実験を行うため、FL マウスを含めたすべての実験群において tamoxifen を投与した。5 日間の tamoxifen 投与では急性的な体重減少は認められなかった。したがって、本実験条件において、マウスの糖エネルギー代謝に対する tamoxifen の影響は小さいと考えられる。

肥大化脂肪組織において、主に成熟脂肪細胞から産生される VEGF-A は、血管新生を促進させ低酸素領域へ酸素と栄養素を供給する (Sung et al., 2013)。実際、脂肪細胞特異的 VEGF-A 欠損マウスは、血管密度の低下により、脂肪組織の機能異常をきたす (Sung et al., 2013)。したがって、肥満に伴い脂肪組織で産生される VEGF-A は、脂肪組織の恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられる。一方、本研究結果から、肥満に伴い脂肪組織に浸潤した炎症性 M1-マクロファージから産生される過剰な PDGF-B は、不要な血管新生の誘導と免疫細胞のさらなる浸潤を助長することで、脂肪組織の恒常性を攪乱すると考えられる。

肥満における脂肪組織の血管新生とエネルギー消費の機能的な関連は複雑である。*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスは脂肪組織の血管新生が抑制され、エネルギー代謝の亢進を示した。しかし、マウスの体脂肪蓄積を減少させた根本的なメカニズムは不明なままである。さらに、*Pdgfrb*^{ASYS}-KO マウスの脂肪組織血管において認められた変化が、*Pdgfrb* 欠損による直接的な変化ではなく、体重増加抑制

による間接的な影響である可能性は現時点では否定できない。しかし、血管新生の阻害剤や抗血管新生ペプチドの処置は脂肪組織の肥大化を抑制するだけでなく、エネルギー代謝を亢進することが示され、エネルギー恒常性を維持する代償機転の存在が示唆される (Bråkenhielm et al., 2004; Kolonin et al., 2004; Rupnick et al., 2002)。したがって、*Pdgfrb*^{ΔSYS}-KO マウスにおいて血管新生活性の抑制により、エネルギー貯蔵の主要臓器である脂肪組織の肥大化が不十分であるために、同様の代償機転を介してエネルギー代謝の亢進を認めた可能性が考えられる。この詳細な根本的メカニズムの解明には、さらなる検討が必要である。

第 5 節 小括

全身の *Pdgfrb* の欠損により、内臓脂肪組織における血管新生と慢性炎症の抑制および体脂肪蓄積の減少が認められた。本マウスは高脂肪食負荷に関わらず、骨格筋と肝臓への異所性の脂質蓄積が抑制され、糖代謝の悪化からも保護されていた。本研究により、食餌性肥満による脂肪組織の血管新生進展における PDGF-B-PDGFRβ シグナルの重要な役割が明らかになった。これらの知見から、PDGF-B-PDGFRβ 機能の抑制は、肥満と 2 型糖尿病の発症と進展予防に効果的なアプローチである可能性が高く、今後の展開が期待される。

総括

過剰なエネルギー摂取により、脂肪組織は血管新生を伴って肥大化する。さらに、肥大化した脂肪組織では、ケモカインによって浸潤した炎症性マクロファージが炎症性サイトカインを産生することで、慢性的な炎症状態を引き起こす。しかし、脂肪組織の血管新生における詳細な誘導メカニズムと慢性炎症進展との関連は十分解明されていない。本研究では、肥満によるインスリン抵抗性の進展機構の解明とその制御について、血管新生と慢性炎症の観点から探究した。

抗血小板薬シロスタゾールの新規効果として、肥満 2 型糖尿病病態での脂肪組織の慢性炎症とインスリン抵抗性に対する治療薬としての可能性を検証した。シロスタゾールはマクロファージの炎症活性の抑制効果と成熟脂肪細胞のインスリン抵抗性の防御効果を有し、これらの相乗効果により肥満に伴う脂肪組織の慢性炎症を抑制することを明らかにした。肥満 2 型糖尿病は、シロスタゾールが用いられる動脈硬化性疾患の基礎疾患であるため、シロスタゾールのインスリン抵抗性改善機構を示した本成績は、抗血小板薬による治療効果を考える上で新たな重要な示唆を提供する。

また、本研究では肥満の進展機構を理解するため、血管新生の誘導機構と PDGFR β の関与を検証し、脂肪組織肥大化における血管新生の誘導機構の起点に PDGF-B 依存的なペリサイトの離脱が関与することを見出した。さらに、肥満の病態形成において、血管の発達には脂肪組織の肥大化に寄与することに加え、脂肪組織への免疫細胞の供給を高め、慢性炎症を進展させる可能性が示唆された。さらに、慢性炎症の中心的役割を果たすマクロファージが、血管新生の誘導においても重要な関与を示すことが示された。従来、脂肪組織の肥大化において独立して議論されてきた血管新生と慢性炎症の形成過程において、マクロファージが共通の病態促進因子として密接に関連することを提示した本知見は、脂肪組織における慢性炎症の進展機構を一元的に理解する上で重要である。シロスタゾールはマクロファージと脂肪細胞の悪循環を解消することで、インスリン抵抗性を改善させたことを踏まえると、炎症性マクロファージの活性制御は、脂肪組織肥大化における血管新生制御に結びつくと考えられる。

以上の知見より、血管新生と慢性炎症の視点から、それぞれの病因の制御を標的とする薬物治療ではなく、脂肪組織のマクロファージ機能に着目して、脂肪組織の肥大化と慢性炎症の進展を抑制し、インスリン抵抗性を効果的に改善する薬剤の開発は、肥満 2 型糖尿病に対する次世代の薬物治療につながると期待される。

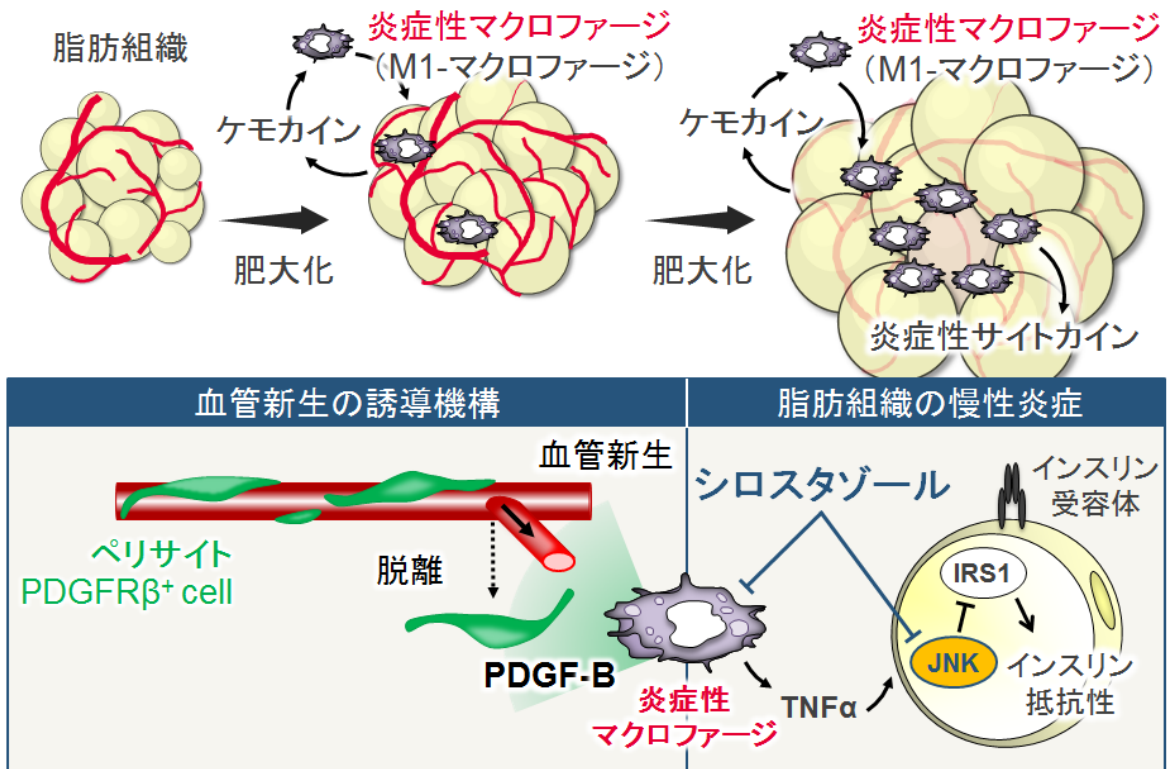


Figure 20. 炎症性マクロファージが脂肪組織の血管新生と慢性炎症の中核となる

肥大化した脂肪組織において、浸潤した炎症性マクロファージが産生する過剰な PDGF-B は、血管からペリサイトを脱落させることで、血管新生開始の司令塔として機能する。さらに、肥大化した脂肪組織では、炎症性マクロファージと脂肪細胞との間に炎症変化の悪循環が形成されることで、インスリン抵抗性が惹起される。炎症性マクロファージがこれら血管新生の開始点と慢性炎症形成の発端の中核を担う。

参考文献

厚生労働省、平成 24 年「国民健康・栄養調査」

厚生労働省、平成 27 年「国民健康・栄養調査」

清野裕、南條輝志男、田嶋尚子、門脇孝、柏木厚典、荒木栄一ほか. 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. 糖尿病. 2012; 55: 485-504.

Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1142-51.

Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008; 22: 1276-312.

Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1654-9.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005; 97: 512-23.

Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 488-520.

Bråkenhielm E, Cao R, Gao B, Angelin B, Cannon B, Parini P, et al. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res.* 2004; 94: 1579-88.

Cao Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9: 107-15.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9: 653-60.

Carmen GY, Víctor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal.* 2006; 18: 401-8.

Chang SA, Cha BY, Yoo SJ, Ahn YB, Song KH, Han JH, et al. The effect of cilostazol on glucose tolerance and insulin resistance in a rat model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Korean J Intern Med.* 2001; 16: 87-92.

Cho CH, Koh YJ, Han J, Sung HK, Jong Lee H, Morisada T, et al. Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res.* 2007; 100: e47-57.

Choi YH, Park S, Hockman S, Zmuda-Trzebiatowska E, Svannelid F, Haluzik M, et al. Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice. *J Clin Invest.* 2006; 116: 3240-51.

Crosby JR, Seifert RA, Soriano P, Bowen-Pope DF. Chimaeric analysis reveals role of Pdgfr receptors in all muscle lineages. *Nat Genet.* 1998; 18: 385-8.

Dusseault J, Li B, Haider N, Goyette MA, Côté JF, Larose L. Nck2 deficiency in mice results in increased adiposity associated with adipocyte hypertrophy and enhanced adipogenesis. *Diabetes*. 2016; 65: 2652-66.

Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilà L, Tafuro S, Muñoz S, et al. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2012; 61: 1801-13.

Ferreiro JL, Cequier AR, Angiolillo DJ. Oral antiplatelet therapy in patients with diabetes mellitus and acute coronary syndromes. *Trends Cardiovasc Med*. 2010; 20: 211-7.

Fink LN, Costford SR, Lee YS, Jensen TE, Bilan PJ, Oberbach A, et al. Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. *Obesity*. 2014; 22: 747-57.

Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Iktani M, Oya T, Kanatani Y, et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2009; 58: 2574-82.

Fujisaka S, Usui I, Iktani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, et al. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. *Diabetologia*. 2013; 56: 1403-12.

Furuhashi M, Sjöblom T, Abramsson A, Ellingsen J, Micke P, Li H, et al. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer Res*. 2004; 64: 2725-33.

Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003; 161: 1163-77.

Gresele P, Momi S, Falcinelli E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol*. 2011; 72: 634-46.

Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005; 87: 99-109.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999; 79: 1283-316.

Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999; 126: 3047-55.

Hosaka K, Yang Y, Seki T, Nakamura M, Andersson P, Rouhi P, et al. Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF drugs on vascular remodelling and metastasis. *Nat Commun*. 2013; 4: 2129.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259: 87-91.

Ikubo M, Wada T, Fukui K, Ishiki M, Ishihara H, Asano T, et al. Impact of lipid phosphatases SHIP2 and PTEN on the time- and Akt-isoform-specific amelioration of TNF- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296: E157-64.

Itoh M, Kato H, Suganami T, Konuma K, Marumoto Y, Terai S, et al. Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One.* 2013; 8: e82163.

Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003; 9: 685-93.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1494-505.

Ke M-T, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci.* 2013; 16: 1154-61.

Kim KY, Shin HK, Lee JH, Kim CD, Lee WS, Rhim BY, et al. Cilostazol enhances casein kinase 2 phosphorylation and suppresses tumor necrosis factor- α -induced increased phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation and apoptotic cell death in SK-N-SH cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308: 97-104.

Kimura K, Yamada T, Matsumoto M, Kido Y, Hosooka T, Asahara S, et al. Endoplasmic reticulum stress inhibits STAT3-dependent suppression of hepatic gluconeogenesis via dephosphorylation and deacetylation. *Diabetes.* 2012; 61: 61-73.

Kolonin MG, Saha PK, Chan L, Pasqualini R, Arap W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med.* 2004; 10: 625-32.

Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, Kumagai H, Itoh S, Satoh H, et al. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 2006; 281: 8748-55.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, et al. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell.* 1999; 4: 597-609.

Lee JH, Oh GT, Park SY, Choi JH, Park JG, Kim CD, et al. Cilostazol reduces atherosclerosis by inhibition of superoxide and tumor necrosis factor- α formation in low-density lipoprotein receptor-null mice fed high cholesterol. *J Pharmacol Exp Ther.* 200; 313: 502-9.

Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997; 277: 242-5.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007; 117: 175-84.

Mukai N, Doi Y, Ninomiya T, Hata J, Yonemoto K, Iwase M, et al. Impact of metabolic syndrome compared with impaired fasting glucose on the development of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama study. *Diabetes Care.* 2009; 32: 2288-93.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25: 677-86.

Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res.* 2008; 49: 1562-8.

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes.* 2007; 56: 1517-26.

Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2000; 164: 3476-9.

Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1354-61.

Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* 2012; 18: 363-74.

Park SY, Lee JH, Kim KY, Kim EK, Yun SJ, Kim CD, et al. Cilostazol increases 3T3-L1 preadipocyte differentiation with improved glucose uptake associated with activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ transcription. *Atherosclerosis.* 2008; 201: 258-65.

Park SY, Lee SW, Baek SH, Lee SJ, Lee WS, Rhim BY, et al. Induction of heme oxygenase-1 expression by cilostazol contributes to its anti-inflammatory effects in J774 murine macrophages. *Immunol Lett.* 2011; 136: 138-45.

Park SY, Shin HK, Lee JH, Kim CD, Lee WS, Rhim BY, et al. Cilostazol ameliorates metabolic abnormalities with suppression of proinflammatory markers in a db/db mouse model of type 2 diabetes via activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ transcription. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329: 571-9.

Pellegrinelli V, Rouault C, Veyrie N, Clément K, Lacasa D. Endothelial cells from visceral adipose tissue disrupt adipocyte functions in a three-dimensional setting: partial rescue by angiopoietin-1. *Diabetes.* 2014; 63: 535-49.

Robciuc MR, Kivelä R, Williams IM, de Boer JF, van Dijk TH, Elamaa H, et al. VEGFB/VEGFR1-induced expansion of adipose vasculature counteracts obesity and related metabolic complications. *Cell Metab.* 2016; 23: 712-24.

Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011; 146: 873-87.

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006; 441: 437-43.

Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 10730-5.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 13; 414:799-806.

Sasai H, Sairenchi T, Iso H, Irie F, Otaka E, Tanaka K, et al. Relationship between obesity and incident diabetes in middle-aged and older Japanese adults: the Ibaraki Prefectural Health Study. *Mayo Clin Proc*. 2010; 85: 36-40.

Schmidt T, Carmeliet P. Blood-vessel formation: Bridges that guide and unite. *Nature*. 2010; 465: 697-9.

Schrimpf C, Teebken OE, Wilhelmi M, Duffield JS. The role of pericyte detachment in vascular rarefaction. *J Vasc Res*. 2014; 51: 247-58.

Shen J, Ishii Y, Xu G, Dang TC, Hamashima T, Matsushima T, et al. PDGFR- β as a positive regulator of tissue repair in a mouse model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32: 353-67.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; 116: 3015-25.

Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest*. 2014; 124: 2099-112.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1793-801.

Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 2062-8.

Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 84-91.

Sung HK, Doh KO, Son JE, Park JG, Bae Y, Choi S, et al. Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab*. 2013; 17: 61-72.

Sun K, Wernstedt Asterholm I, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 5874-9.

Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011; 121: 2094-101.

Tsai CS, Lin FY, Chen YH, Yang TL, Wang HJ, Huang GS, et al. Cilostazol attenuates MCP-1 and MMP-9 expression in vivo in LPS-administrated balloon-injured rabbit aorta and in vitro in LPS-treated monocytic THP-1 cells. *J Cell Biochem*. 2008; 103: 54-66.

- Uhl E, Rösken F, Sirsjö A, Messmer K. Influence of platelet-derived growth factor on microcirculation during normal and impaired wound healing. *Wound Repair Regen.* 2003; 11: 361-7.
- Wada T, Hoshino M, Kimura Y, Ojima M, Nakano T, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Both type I and II IFN induce insulin resistance by inducing different isoforms of SOCS expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 300: E1112-23.
- Wada T, Miyashita Y, Sasaki M, Aruga Y, Nakamura Y, Ishii Y, et al. Eplerenone ameliorates the phenotypes of metabolic syndrome with NASH in liver-specific SREBP-1c Tg mice fed high-fat and high-fructose diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305: E1415-25.
- Wang XM, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM. The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. *J Immunol.* 2009; 182: 3809-18.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006; 116: 115-24.
- Xue Y, Lim S, Bråkenhielm E, Cao Y. Adipose angiogenesis: quantitative methods to study microvessel growth, regression and remodeling in vivo. *Nat Protoc.* 2010; 5: 912-20.
- Xue Y, Lim S, Yang Y, Wang Z, Jensen LDE, Hedlund EM, et al. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat Med.* 2011; 18: 100-10
- Yamani L, Li B, Larose L. Nck1 deficiency improves pancreatic β cell survival to diabetes-relevant stresses by modulating PERK activation and signaling. *Cell Signal.* 2015; 27: 2555-67.
- Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293: E1118-28.
- Ye R, Wang QA, Tao C, Vishvanath L, Shao M, McDonald JG, et al. Impact of tamoxifen on adipocyte lineage tracing: inducer of adipogenesis and prolonged nuclear translocation of Cre recombinase. *Mol Metab.* 2015; 4: 771-8.
- Yonezawa R, Wada T, Matsumoto N, Morita M, Sawakawa K, Ishii Y, et al. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 303: E445-56.

謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました富山大学大学院 医学薬学研究部 病態制御薬理学研究室教授 笹岡利安 医学博士、同研究室准教授 恒枝宏史 薬学博士および同研究室講師 和田努 医学博士に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、遺伝子改変マウスの供給ならびに適切なお指導、ご助言を頂戴しました富山大学大学院 医学薬学研究部 病態病理学講座教授 笹原正清 医学博士および同講座准教授 石井陽子 医学博士に心から感謝の意を表します。

本研究において、Whole-mount 蛍光免疫染色法の実験手法の確立に向けた適切なお指導、ご助言を頂戴しました富山大学大学院 医学薬学研究部 病態病理学講座助教 山本誠士 医学博士に深い感謝の意を表します。

本研究において、正常血糖高インスリンランプ試験の解析に多大なるご尽力を賜りました金沢大学 新学術創成研究機構 革新的統合バイオ研究コア 栄養・代謝研究ユニット教授 井上啓 医学博士、同ユニット助教 稲葉有香 博士および同ユニット特任助教 木村久美 博士に心から感謝の意を表します。

本研究において、組織学的解析の標本作製にご尽力を賜りました富山大学大学院 医学薬学研究部病態病理学講座技官 松島貴子様へ深い感謝の意を表します。

本研究に際し、適切なお指導、ご助言を頂戴しました金沢医科大学 糖尿病・内分泌内科学教授 古家大祐 医学博士に心から感謝の意を表します。

本研究において、フローサイトメトリーによる解析に関する適切なお指導、ご助言を頂戴しました富山大学大学院 医学薬学研究部 第一内科学講座教授 戸邊一之 医学博士、同講座診療講師 藤坂志保 医学博士、同大学院 免疫バイオ・創薬探索研究講座准教授 長井良憲 医学博士および同講座助教（現 国立国際医療研究センター研究所 免疫制御研究部 研究員）生谷尚士 博士に深い感謝の意を表します。

本研究において、組織中の総脂質の解析に関する適切なお指導、ご助言を頂戴しました富山大学 和漢医薬学総合研究所 病態制御部門 栄養代謝学分野准教授 渡辺志朗 薬学博士および同分野助教 藤田恭輔 薬学博士に深い感謝の意を表します。

本研究において、骨格筋の機能解析に関する適切なお指導、ご助言を頂戴しましたアスタファーマ株式会社 R&D 本部副主任 西田康宏 農学博士に深く感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、多大なるご尽力を賜りました当時、富山大学大学院 医学薬学教育部 病態制御薬理学研究室（現 アステラス製薬株式会社）木村ゆかり 薬学修士、同研究室（現 株式会社ビッグライム）中野哲朗 薬学修士、同研究室（現 参天製薬株式会社）稲田健人 薬学修士、同研究室（現 マルホ株式会社）房登広樹 薬学士、同研究室（現 聖隷浜松病院）神谷知江 薬学士および同研究室 松澤崇俊 様に心から厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、終始熱心なご指導を賜りました当時、富山大学大学院 医学薬学教育部 病態制御薬理学研究室（現 国立障害者リハビリテーションセンター）市原克則 薬学博士、同研究室（現 広貫堂）東海絵美 薬学博士に心から感謝の意を表します。

最後に、多方面にわたりご協力、ご助言賜りました病態制御薬理学研究室の皆様心から感謝申し上げます。

2017年3月