

氏 名 おのぎ やすひろ
小野木 康弘

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 240 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 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

学位論文題目 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
(Clarification of novel therapeutic potential of cilostazol and regulatory mechanism of adipose angiogenesis in obese diabetes)

論文審査委員
(主査) 教授 今中 常雄
(副査) 教授 櫻井 宏明
(副査) 教授 笹岡 利安 (指導教員)

論文内容の要旨

(本文)

序論 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 tumor necrosis factor α (TNF α) などの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。その際、炎症性サイトカインは、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を介してインスリン受容体の基質であるインスリン受容体基質 (IRS) のセリン残基のリン酸化と IRS のタンパク分解を誘導して、インスリン作用を減弱させる。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そ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、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、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、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 の関与について探究した。

2 型糖尿病モデルマウスに対するシロスタゾールの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¹⁾

肥満による脂肪組織の慢性炎症は全身のインスリン抵抗性を惹起することから、2 型糖尿病の治療標的として注目されている。そこで、遺伝的に肥満および高血糖を呈する 2 型糖尿病モデル db/db マウスを用いて、シロスタゾール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を検証した。8 週齢の db/db マウスを 3 群に分け、シロスタゾール (0, 100 または 300 mg/kg/day) 混合食を 4 週間給餌した後、生理学的、生化学的および組織学的解析を行った。db/db マウスに認められる耐糖能異常とインスリン感受性の低下は、シロスタゾール投与により濃度依存的に抑制された。脂肪組織の肥大化はマクロファージの浸潤と慢性炎症を惹起することから、シロスタゾール投与が脂肪組織の肥大化に与える影響を検討した。その結果、シロスタゾールの投与は db/db マウスの脂肪細胞面積を縮小させ、脂肪組織で増加した単球走化性因子 MCP1、TNF α および炎症性マクロファージマーカー CD11c の遺伝子発現を抑制した。

シロスタゾール投与によるインスリン抵抗性の抑制機構を明らかにするため、シロスタゾールによる成熟脂肪細胞のインスリン感受性の変化を検討した。成熟脂肪細胞へ分化させた 3T3-L1 培養脂肪細胞に TNF α を処置することで、*in vitro* におけるインスリン抵抗性病態を確立した。TNF α 処置により減弱したインスリン誘導性の糖取り込みは、シロスタゾールの前処置により改善した。その機序として、TNF α 処置による JNK と IRS1 Ser³⁰⁷ 残基のリン酸化の亢進がシロスタゾール前処置により抑制された。その結果、TNF α 処置による IRS1 タンパク量の低下とインスリン誘導性の IRS1 チロシンリン酸化の減弱が、シロスタゾールの前処置により抑制された。これらのシロスタゾールによる改善作用は cAMP-dependent protein kinase (PKA) 阻害剤の処置により消失したが、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 阻害剤による変化を認めなかった。本結果により、シロスタゾールによるインスリン抵抗性の抑制機構は、既知の PPAR γ アゴニスト様作用とは異なり、phosphodiesterase 3B の抑制による cAMP/PKA 経路の活性化が関与することを見出した。

炎症性サイトカインの暴露によって脂肪細胞から分泌された遊離脂肪酸はマクロファージの toll-like receptor 4 (TLR4) を介して炎症性サイトカイン産生を引き起こす。そこで次に、シロスタゾール投与による脂肪組織慢性炎症の抑制機構として、TLR4 アゴニストである lipopolysaccharide (LPS) 誘発性の炎症変化に対するシロスタゾールの直接作用について、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いて検討した。シロスタゾールは、LPS による TNF α と TLR4 の遺伝子発現の亢進を抑制した。また、db/db マウスの脂肪組織での TLR4 の遺伝子発現増加もシロスタゾール投与により抑制された。

以上より、シロスタゾールはマクロファージの炎症活性を抑制することに加え、脂肪細胞の炎症性サイトカインにより惹起されたインスリン抵抗性を PKA 依存的に抑制することで、脂肪組織の慢性炎症および全身のインスリン抵抗性の進展を防御することを明らかにした。

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²⁾

肥満の進展には血管新生を伴うことから、高脂肪食を負荷した食餌性肥満マウスの脂肪組織における血管新生因子の遺伝子発現を解析した。PDGF-B は脂肪組織に限局して組織の肥大化に伴って増加した。またこの変化に伴い、血管内皮細胞マーカー vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) も脂肪組織においてのみ増加したことから、血管新生と PDGF-B の増加に関連性が示唆された。そこで、食餌性肥満における PDGF-B/PDGFR β シグナルの意義を、Tamoxifen 誘導性 Cre/loxP システムによる全身 PDGFR β 欠損 (KO) マウスを用いて解析した。KO マウスは、食餌性肥満とインスリン抵抗性の進展から保護された。KO マウスでは脂肪細胞の肥大化が抑制され、慢性炎症の進展も軽度であった。さらに、KO マウスでの脂肪組織肥大化の抑制機構を明らかにするため、脂肪組織の血管を Whole-mount 蛍光免疫染色により観察した結果、KO マウスの血管面積は低下を認めた。この結果に一致し、KO マウスでは高脂肪食負荷による脂肪組織の VEGFR2 タンパク発現の増加が抑制されていた。したがって、PDGF-B/PDGFR β シグナルが脂肪組織の血管新生を促進することが示された。

次に、血管新生の誘導機構を検証するため、ペリサイトに着目した。血管内皮細胞由来の

PDGF-BはPDGFR β を介してペリサイトを管腔へ遊走させ、管腔への接着を促す。ペリサイトの被覆によって血管新生の指向性が制御されることから、血管内皮細胞へのペリサイトの接着率を検討した。興味深いことに、脂肪組織では高脂肪食負荷に伴いPDGF-Bが増加するにもかかわらず、高脂肪食を負荷した対照マウスの脂肪組織では、血管からペリサイトが離脱することを見出した。また、ペリサイトが脱落した血管内皮細胞では、増殖マーカーKi67染色の陽性所見を認めた。一方、KOマウスでは高脂肪食負荷によるペリサイトの脱落が抑制され、Flow cytometryによる解析では、血管内皮細胞のKi67発現は低下した。したがって、脂肪組織の肥大化に伴い血管からのペリサイトの脱落が誘導され、同部位での血管内皮細胞の増殖により血管新生が進展すると考えられた。そこで、血管からのペリサイトの脱落機序を検討するため、正常マウスから摘出した脂肪組織をPDGF-B存在下で培養した。PDGF-B濃度依存的に低下するペリサイトの血管への接着率は、PDGFR β 欠損マウス由来の脂肪組織では維持されていた。したがって、高脂肪食負荷による血管周囲でのPDGF-B濃度の上昇が、ペリサイト脱落を引き起こすことが示された。さらに、肥大化脂肪組織におけるPDGF-B産生細胞を探索した結果、脂肪組織間質血管細胞分画の、特にCD11c陽性CD206陰性の炎症性マクロファージ分画においてPDGF-B発現が著明に増加することを見出した。本知見と一致して、免疫組織学的検討においても、食餌性肥満マウスの脂肪組織に集積したマクロファージ近傍の血管では、他の部位と比べより顕著なペリサイトの脱落を認めた。

以上より、脂肪組織の肥大化に伴い浸潤するCD11c陽性CD206陰性マクロファージはPDGF-Bを過剰に産生し、成熟血管からのペリサイトの脱落を起点として血管新生を誘導し、脂肪組織の肥大化を助長することを明らかにした。

結論 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。したがって、シロスタゾールは慢性動脈閉塞症を治療することに加え、その基礎疾患である肥満2型糖尿病の進展予防効果を兼ね備えることから、治療上の問題を抱えた高齢者に対して、治療薬を選択する際の新たな根拠を提示した。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。さらに本病態変化には、慢性炎症の中心的役割を果たすと考えられてきたマクロファージが血管新生の誘導においても関与することが示唆された。本知見は血管内皮細胞とペリサイトとの二細胞間の相互作用に着目して研究されてきた、古典的または生理学的な血管新生の誘導・成熟機構とは異なり、外部環境の変化に応答する病態生理学的な血管リモデリング機構として解明された新知見である。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がマクロファージをハブ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。以上より、脂肪組織のマクロファージ機能の視点から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型糖尿病治療に対する次世代の薬物治療につながると期待される。

参考文献

- 1) Wada T, **Onogi Y**, Kimura Y, Nakano T, Fusanobori H, Ishii Y, Sasahara M, Tsuneki H, and Sasaoka T. Cilostazol ameliorates systemic insulin resistance in diabetic db/db mice by suppressing chronic inflammation in adipose tissue via modulation of both adipocyte and macrophage functions. *Eur J Pharmacol* 707: 120-9, 2013
- 2) **Onogi Y**, Wada T, Kamiya C, Inata K, Matsuzawa T, Inaba Y, Kimura K, Inoue H, Yamamoto S, Ishii Y, Koya D, Tsuneki H, Sasahara M, and Sasaoka T. PDGFR β regulates adipose tissue expansion and glucose metabolism via vascular remodeling in diet-induced obesity. *Diabetes* 66:1008-21, 2017

学位論文審査の要旨

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。肥満は2型糖尿病の病態基盤として重要であり、心血管疾患の発症リスクを著しく高める。そこで、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。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。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、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、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 の関与を解明した。本学位論文の内容と審査結果は以下の通りである。

1) 2型糖尿病モデルマウスに対するシロスタゾールの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

遺伝的に肥満および高血糖を呈する2型糖尿病モデル db/db マウスを用いて、シロスタゾール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を検証した。db/db マウスに認められる耐糖能異常とインスリン感受性の低下は、シロスタゾール投与により濃度依存的に抑制された。脂肪組織の肥大化はマクロファージの浸潤と慢性炎症を惹起することから、シロスタゾール投与が脂肪組織の肥大化に与える影響を検討した。その結果、シロスタゾールの投与は db/db マウスの脂肪細胞面積を縮小させ、脂肪組織で増加した単球走化性因子 (MCP) 1、Tumor necrosis factor (TNF) α および炎症性マクロファージマーカー CD11c の遺伝子発現を抑制した。シロスタゾールによるインスリン抵抗性の抑制機構として、3T3-L1 脂肪細胞において、TNF α 処置によるインスリン受容体基質 (IRS) 1 タンパク量の低下とチロシンリン酸化の減弱を cAMP-dependent protein kinase (PKA) 依存性に抑制した。また、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞において、toll-like receptor (TLR) 4 発現を抑制し、lipopolysaccharide (LPS) による TNF α の遺伝子発現増加を減弱させた。以上より、シロスタゾールはマクロファージの炎症活性を抑制することに加え、炎症性サイトカインにより惹起された脂肪細胞のインスリン抵抗性を PKA 依存的に抑制することで、脂肪組織の慢性炎症および全身のインスリン抵抗性の進展を防御することを明らかにした。

2) 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

PDGF-Bは脂肪組織に限局して組織の肥大化に伴って増加し、血管新生との関連性が示唆されたことから、食餌性肥満におけるPDGF-B/PDGFR β シグナルの意義を、Tamoxifen誘導性Cre/loxPシステムによる全身PDGFR β 欠損 (KO) マウスを用いて解析した。KOマウスは、食餌性肥満とインスリン抵抗性の進展から保護された。KOマウスでは脂肪細胞の肥大化が抑制され、慢性炎症の進展も軽度であった。次に、KOマウスでの脂肪組織肥大化の抑制機構を明らかにするため、脂肪組織の血管をWhole-mount蛍光免疫染色により観察し、KOマウスで

は血管面積の低下を認めた。したがって、PDGF-B/PDGFR β シグナルが脂肪組織の血管新生を促進することが示された。ペリサイトの被覆によって血管新生の指向性が制御されることから、血管内皮細胞へのペリサイトの接着率を検討した。その結果、脂肪組織では高脂肪食負荷に伴いPDGF-Bが増加するにもかかわらず、高脂肪食を負荷した対照マウスの脂肪組織では、血管からペリサイトが離脱することを見出した。高脂肪食負荷による血管周囲でのPDGF-B濃度の上昇が、ペリサイト脱落を引き起こすことが示された。さらに、肥大化脂肪組織におけるPDGF-B産生細胞を探索し、脂肪組織間質血管細胞分画のCD11c陽性CD206陰性の炎症性マクロファージ分画において、PDGF-B発現が著明に増加することを見出した。以上より、脂肪組織の肥大化に伴い浸潤するCD11c陽性CD206陰性マクロファージはPDGF-Bを過剰に産生し、成熟血管からのペリサイトの脱落を起点として血管新生を誘導し、脂肪組織の肥大化を助長することを明らかにした。

以上のように申請者は、シロスタゾールがマクロファージの炎症活性の抑制と成熟脂肪細胞のインスリン抵抗性の防御効果を有し、これらの相乗作用により肥満による脂肪組織の慢性炎症を抑制することを明らかにした。したがって、シロスタゾールは慢性動脈閉塞症を治療することに加え、その基礎疾患である肥満2型糖尿病の進展予防効果を兼ね備えることから、治療上の問題を抱えた高齢者に対して、治療薬を選択する際の新たな根拠を提示した。また、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。本知見は、慢性炎症の中心的役割を果たすと考えられてきたマクロファージが血管新生の誘導においても関与し、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がマクロファージをハブとして密接に関連することを提示した。本研究により得られた知見および成果より、脂肪組織のマクロファージ機能の視点から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に繋がると期待される。これらの成果は国際学術誌に掲載され、国内外で高く評価されている。主査および副査は、小野木康弘氏に口頭試問を行うとともに、論文内容について審査し、博士（薬科学）を授与するに値すると判定した。

- 1) Wada T, Onogi Y, Kimura Y, Nakano T, Fusanobori H, Ishii Y, Sasahara M, Tsuneki H, and Sasaoka T. Cilostazol ameliorates systemic insulin resistance in diabetic db/db mice by suppressing chronic inflammation in adipose tissue via modulation of both adipocyte and macrophage functions. *Eur J Pharmacol* 707: 120-129, 2013
- 2) Onogi Y, Wada T, Kamiya C, Inata K, Matsuzawa T, Inaba Y, Kimura K, Inoue H, Yamamoto S, Ishii Y, Koya D, Tsuneki H, Sasahara M, and Sasaoka T. PDGFR β regulates adipose tissue expansion and glucose metabolism via vascular remodeling in diet-induced obesity. *Diabetes* 66: 1008-1021, 2017