

発表番号 53

肥満に合併する高血圧の食塩感受性における1型アンジオテンシン受容体の
病態生理的意義に関する研究

助成研究者名 小川佳宏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野)

共同研究者名 菅波孝祥 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野)

神山隆治 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野)

堀内正嗣 (愛媛大学大学院医学研究科医化学心血管生物学分野)

①研究目的：肥満に合併する高血圧の食塩感受性における1型アンジオテンシン受容体(AT1)の病態生理的意義の解明に向けて、高脂肪食負荷における1a型アンジオテンシン受容体欠損マウス(KO)の表現型を検討した。更に、培養脂肪細胞を用いてAIIの脂肪細胞分化とアディポサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

②研究方法：6週齢雄性KOと野生型マウス(WT)に通常食あるいは高脂肪食負荷により肥満を誘導した。摂食量と体重の経時変化を検討し、交感神経活動とエネルギー代謝の指標として直腸温、尿中カテコラミン排泄、酸素消費量、褐色脂肪組織におけるUCP-1遺伝子発現を検討した。更に、マウスの胎生線維芽細胞(MEF)と成熟脂肪細胞を用いて、AIIの脂肪細胞分化とアディポサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

③研究結果：通常食ではKOはWTと比較して摂食量の増加を認めたが、高脂肪食負荷時では有意差はなかった。通常食と高脂肪食のいずれにおいてもKOの直腸温、尿中カテコラミン排泄量はWTと比較して上昇しており、酸素消費量とUCP-1遺伝子発現は高脂肪食負荷時にKOにおいて有意に亢進していた。KOとWTより得られるMEFでは、AIIの有無にかかわらず脂肪細胞分化が認められた。WTの成熟脂肪細胞ではAIIはMCP-1やIL-6遺伝子発現を増加し、これはAT1受容体拮抗薬により完全に抑制された。KOの血圧はWTと比較して有意に低下していた。高脂肪食負荷によりWTでは血圧の上昇傾向が認められたが、KOでは変化せずWTと比較して有意に低下していた。以上のように高脂肪食負荷による肥満に伴う有意な血圧上昇は認められなかった。

④考察：本研究では、KOでは、WTと比較して高脂肪食負荷時による体重、脂肪組織重量の増加が著しく抑制されており、この少なくとも一部は交感神経活動の亢進によるエネルギー代謝亢進によることが示唆された。更に、AIIは脂肪細胞に直接作用することにより、一部のアディポサイトカイン産生調節に関与するものの、脂肪細胞の増殖・分化には関与しないと考えられた。

⑤今後の課題：今後、飼料に含有される食塩量を変化させることにより、肥満に伴う高血圧を誘導し、肥満に合併する高血圧の食塩感受性におけるAT1の病態生理的意義の検討が必要であると考えられた。

4

助成番号 0431

肥満に合併する高血圧の食塩感受性における1型アンジオテンシン受容体の 病態生理的意義に関する研究

助成研究者 小川佳宏（東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野）

共同研究者 菅波孝祥（東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野）

神山隆治（東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野）

堀内正嗣（愛媛大学大学院医学研究科医化学心血管生物学分野）

1. 研究目的

ライフスタイルの欧米化に伴って糖尿病、高血圧症、高脂血症、動脈硬化症等の生活習慣病の罹患率は増加の一途を辿り、これらの主要なリスクファクターとしての肥満、特に、その実体である脂肪細胞が注目されている。近年の飽食の時代において欧米を中心とした先進諸国では、肥満は深刻な社会問題として高い関心が持たれており、脂肪細胞に関する研究は国内外で爆発的な勢いで進められている。我が国においても、肥満あるいは肥満に合併する生活習慣病の克服のためにも新しい抗肥満創薬が期待されている。

古典的なレニン・アンジオテンシン（RA）系では、腎臓より分泌されたレニンが肝臓において産生された基質アンジオテンシノーゲン（AGT）をアンジオテンシン I（AI）に変換し、肺あるいは血漿中のアンジオテンシン変換酵素（ACE）によりアンジオテンシン II（AII）が産生され、全身性 RA 系として血圧・水電解質代謝調節に関与する。一方、脂肪組織は、従来、単なるエネルギー貯蔵臓器としてみなされていたが、近年の分子生物学的検討により脂肪組織はレプチンやアディポネクチン等の生理活性物質（アディポサイトカイン）を分泌する生体最大の内分泌臓器として注目されている。AGT もアディポサイトカインの一つとして脂肪細胞において産生されるが、肥満あるいは体脂肪の増加に伴って脂肪組織における AGT 産生が増加することが知られている。一方、AGT は脂肪細胞において大量に産生され、脂肪組織局所における AII の機能的意義が示唆されている。例えば、脂肪組織においてのみ AGT を発現するマウスでは、血中 AGT 濃度の上昇に伴って体脂肪量の増加と血圧の上昇が認められ、AGT-KO マウスでは高脂肪食誘導性肥満が抑制されることが知られている。

本研究では、肥満に合併する高血圧の食塩感受性における 1 型アンジオテンシン受容体の病態生理的意義の解明に向けて、1a 型アンジオテンシン受容体欠損マウス（AT1a-KO）を用いて、高脂肪食負荷における摂食量とエネルギー代謝の変化を検討した。更に、培養

脂肪細胞を用いて AII の脂肪細胞分化とアディポサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法

6週齢雄性 AT1a-KO マウスと野生型 C57BL/6 マウスに8週間の通常食(脂質 5.4%、3.62 kcal/g)あるいは高脂肪食負荷(脂質 60%、5.56 kcal/g)により肥満の誘導を試みた。

マウスの摂食量と体重の経時変化を検討し、高脂肪食負荷前と負荷8週間後に副睾丸周囲、腹壁皮下および腸間膜脂肪組織の重量を測定した。画像解析装置を用いて副睾丸周囲脂肪組織の脂肪細胞面積と細胞径を定量化した。

交感神経活動とエネルギー代謝の指標として、直腸温、尿中カテコラミン排泄量、酸素消費量、褐色脂肪組織における UCP-1 遺伝子発現を検討した。real-time PCR にて副睾丸周囲脂肪組織における遺伝子発現を検討した。マウスの血圧は、tail-cuff 法にて測定した。

AT1a-KO マウスと野生型マウスより得られたマウス胎生線維芽細胞(MEF)と野生型マウスより得られた成熟脂肪細胞を用いて、AII の脂肪細胞分化とアディポサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

3. 研究結果

3.1 マウスを用いた検討

3.1.1 高脂肪食負荷における体重変化と脂肪組織像 (Fig. 1 ~ Fig. 3)

標準食では、AT1a KO マウスの摂食量は、野生型マウスと比較して有意な増加が認められた。しかしながら、高脂肪食負荷時には両者の間に摂食量に明らかな差は認められなかった。又、標準食の場合には、AT1a-KO マウスでは野生型マウスと比較して、体重や脂肪組織重量に明らかな差を認めなかった。一方、高脂肪食負荷では標準食の場合と比較して、野生型マウスの体重と脂肪組織重量の著しい増加が認められたが、AT1a-KO マウスではそれぞれ約 80%と約 40%に抑制されていた。脂肪細胞面積と細胞径に関しては、標準食では AT1a-KO マウスと野生型マウスの間に明らかな差を認めなかった。一方、高脂肪食負荷時には、野生型マウスにおいて著しい脂肪細胞肥大が認められたが、AT1a-KO マウスでは明らかに抑制されていた。

3.1.2 摂食量とエネルギー消費の変化、血圧変化 (Fig. 4)

通常食において、AT1a-KO マウスは野生型マウスと比較して摂食量の増加を認めたが、高脂肪食負荷時は両者の間に明らかな差を認めなかった。通常食と高脂肪食のいずれにおいても AT1a-KO マウスの直腸温、尿中カテコラミン排泄量は、野生型マウスと比較して上昇していた。高脂肪食負荷時の AT1a-KO マウスの酸素消費量は、野生型マウスと比較して明期と暗期のいずれにおいても有意に上昇していた。褐色脂肪組織における UCP-1 遺伝子発現は高脂肪食負荷により AT1a-KO マウスでは野生型マウスと比較して有意に亢進して

いた。

AT1a-KO マウスの血圧は野生型マウスと比較して有意に低下していた (76 ± 2 mmHg vs. 95 ± 2 mmHg, $P < 0.05$)。高脂肪食負荷により、野生型マウスでは血圧の上昇傾向が認められたが (標準食: 100 ± 4 mmHg vs. 高脂肪食: 108 ± 3 mmHg) AT1a-KO マウスの血圧には変化が認められず (標準食: 76 ± 2 mmHg vs. 高脂肪食: 73 ± 4 mmHg) 野生型マウスと比較して有意に減少していた ($P < 0.05$)。

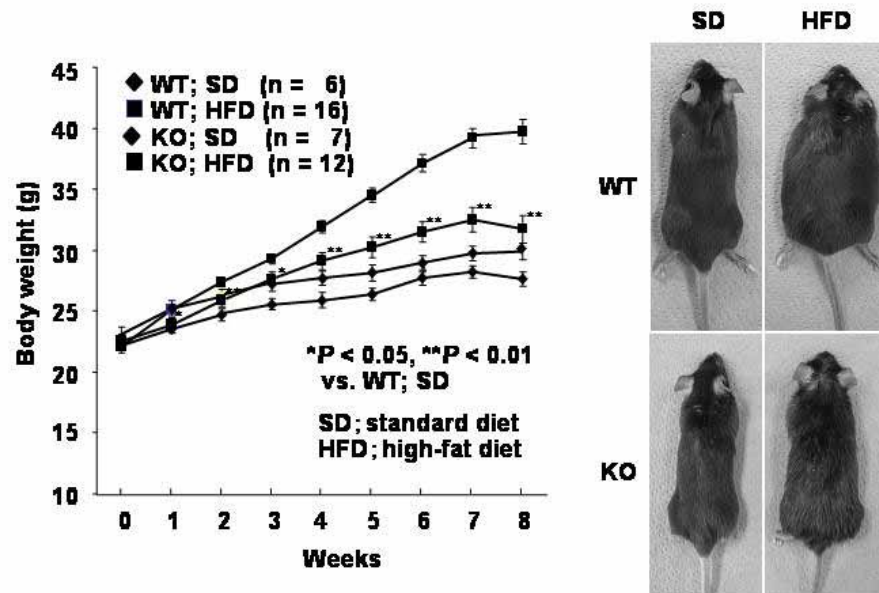


Fig. 1. Gross appearance and body weight change during a high-fat diet

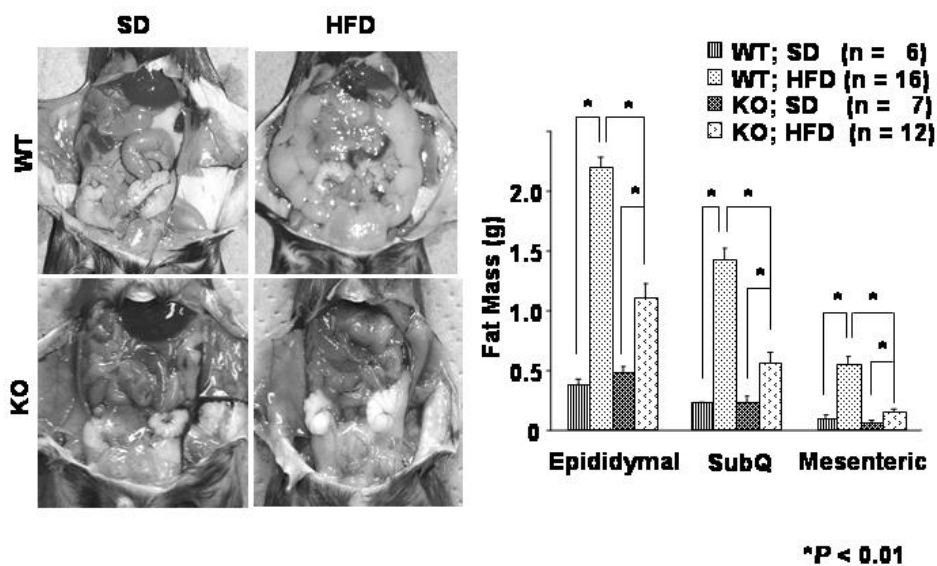


Fig. 2. Adipose tissue weight change during a high-fat diet

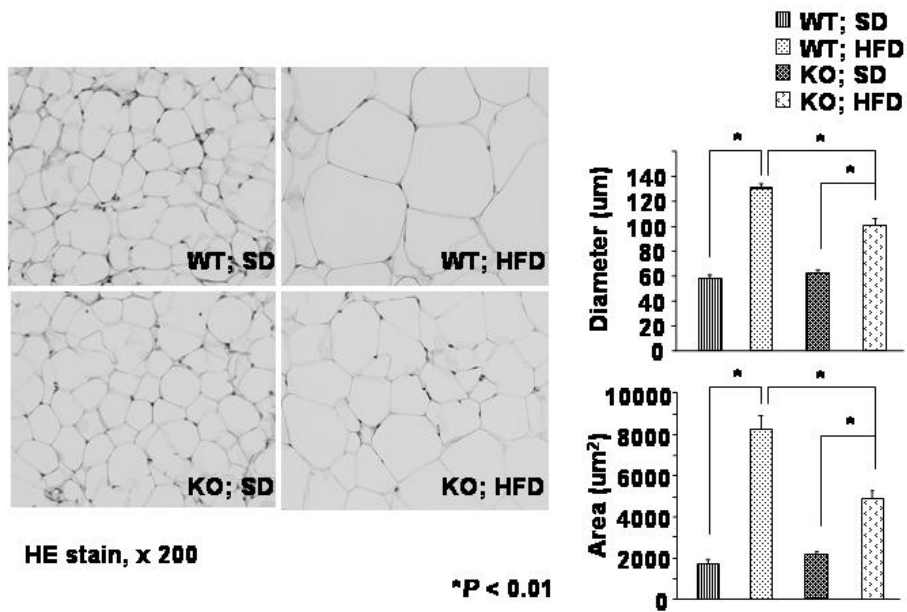


Fig. 3 . Histology of adipose tissue during a high-fat diet

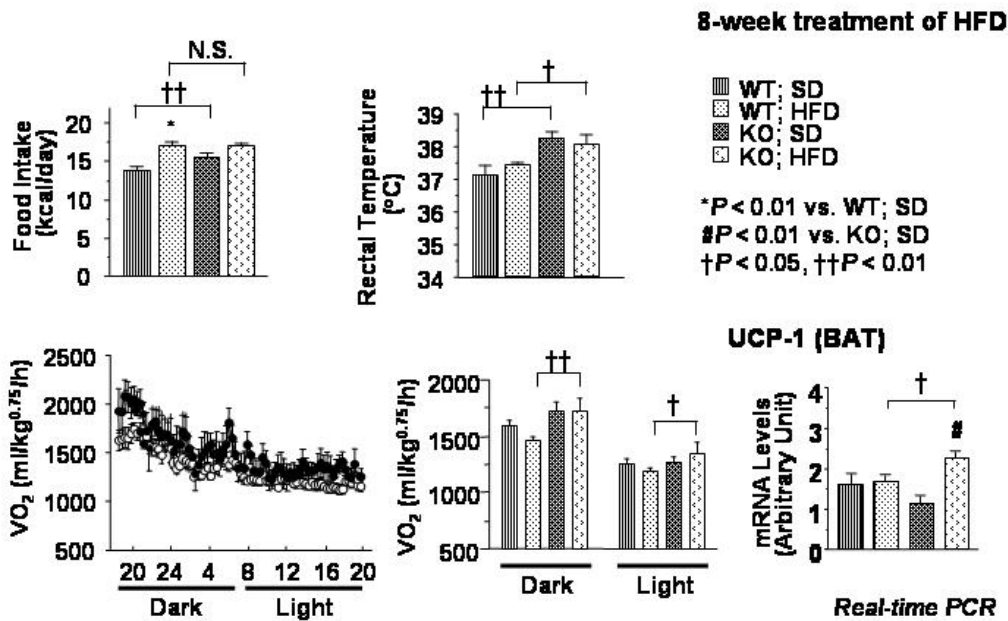


Fig. 4. Food intake and energy expenditure

3.1.3 脂肪組織におけるアディポサイトカイン遺伝子発現の変化 (Fig. 5)

副睪丸周囲脂肪組織におけるレプチン遺伝子発現は、AT1a-KO マウスと野生型マウスのいずれにおいても高脂肪食負荷により増加していた。野生型マウスにおけるアディポネクチン遺伝子発現は、高脂肪食負荷により減少したが、AT1a-KO マウスでは明らかな変化は認められなかった。野生型マウスにおける MCP-1 と IL-6 の遺伝子発現は、高脂肪食負荷

により増加したが、AT1a-KO マウスでは変化しなかった。

3.2 培養細胞を用いた検討

3.2.1 脂肪細胞分化に対する影響 (Fig. 6)

AT1a-KO マウスと野生型マウスより得られた MEF を用いた検討では、AII の添加あるいは非添加にかかわらず同程度に中性脂肪蓄積が観察された。AT1a-KO マウスと野生型マウスのいずれの MEF を用いても成熟脂肪細胞への分化が認められた。

3.2.2 アディポサイトカイン遺伝子発現の変化 (Fig. 7)

野生型マウスより得られた成熟脂肪細胞において AII はレプチンとアディポネクチン遺伝子発現には影響を与えなかったが、MCP-1 と IL-6 遺伝子発現を有意に亢進させた。AII による遺伝子発現の亢進は、AT1 受容体拮抗薬 (ARB) であるバルサルタンとカンデサルタンによりほぼ完全に抑制された。

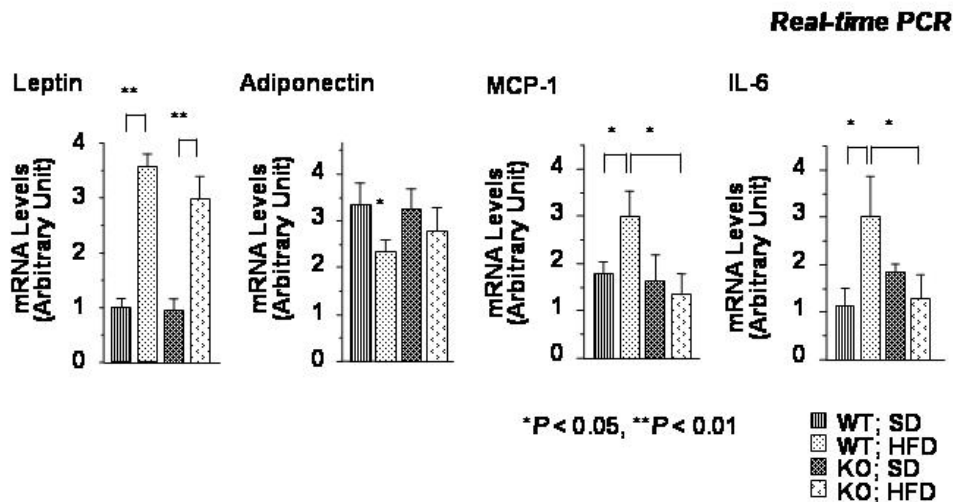


Fig. 5. Expression of adipocytokine mRNA in KO and WT mice

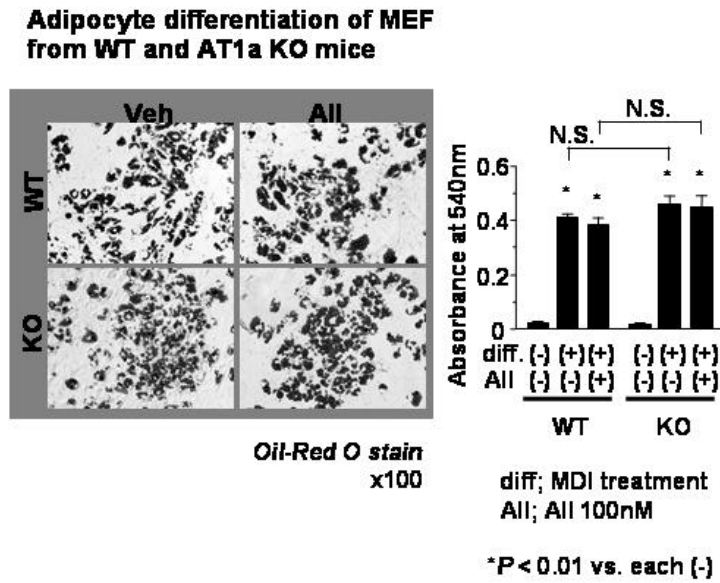


Fig. 6. Functional role of AT1 in adipocyte differentiation

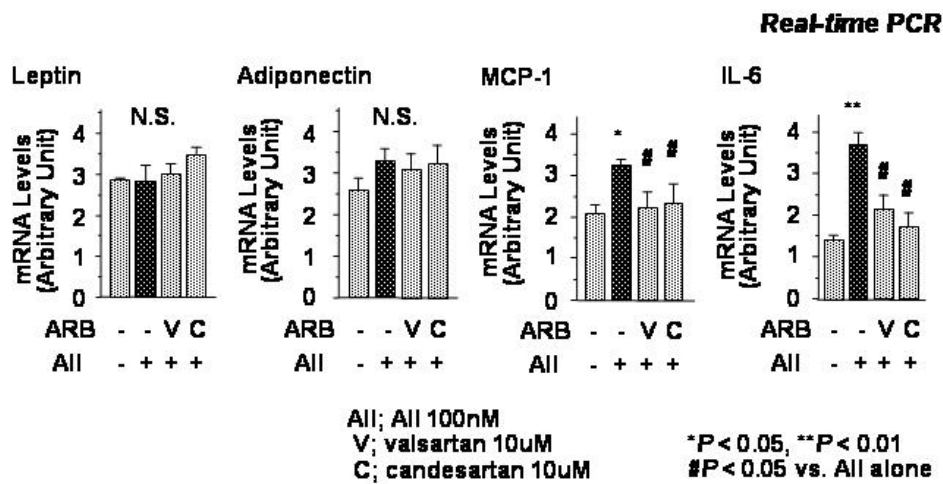


Fig. 7. Effect of angiotensin receptor antagonists on adipocytokine mRNA expression *in vitro*

4. 考 察

本研究により、AT1a-KO マウスでは高脂肪食負荷により誘導される肥満と脂肪組織重量の増加が著しく抑制されることが初めて明らかになり、RA 系によるエネルギー代謝調節の少なくとも一部に AT1a が関与することが示唆された。これ以外にも、AT1a-KO マウス

は、血圧の低下、高脂肪食負荷により誘導されるインスリン抵抗性が軽減されており（未発表データ）、メタボリックシンドロームにおける AT1 の機能的意義を検討する上で有用なモデルマウスであることが明らかになった。

AGT 欠損マウス (AGT-KO マウス) では、標準食と高脂肪食負荷のいずれにおいても野生型マウスと比較して体重と脂肪組織重量の低下が報告されている。本研究により、AT1a-KO マウスにおいても野生型マウスと比較して高脂肪食負荷による体重、脂肪組織重量の増加が著しく抑制されることが明らかになったが、この少なくとも一部は交感神経活動の亢進によるエネルギー代謝亢進によることが示唆された。AT1a-KO マウスにおいて認められた代謝変化は、AGT 欠損マウスと類似しており、AGT (AII) を欠損することにより認められた代謝変化の多くは、AT1a を介するものであると考えられる。AT1b や AT2 の関与については今後の検討が必要である。

AT1 を介する AII による交感神経活動亢進の分子機構は現在のところ明らかではない。従来、脂肪組織においてのみ AGT を発現するトランスジェニックマウスと AGT-KO マウスを交配することにより得られる脂肪組織において AGT を発現するマウスを用いて、脂肪組織に由来する AGT のみにより AGT-KO マウスの体重と脂肪組織重量の回復が確認されている。通常では、AII は血液脳関門を通過しないと考えられるので、以上の成績より、AII による体脂肪量調節は、主に末梢臓器を介する交感神経活動亢進によると推定された。

本研究では、AII は脂肪細胞に直接作用することにより、脂肪細胞の増殖・分化には関与しないが、一部のアディポサイトカイン産生調節に関与すると考えられた。本研究の培養細胞を用いた検討では、AII によるアディポネクチン遺伝子発現調節は認められなかったが、臨床的には、一部の ACE 阻害剤や ARB 投与により血中アディポネクチン濃度の上昇が報告されている。一方、体脂肪量の増加に比例して脂肪組織におけるマクロファージの浸潤が増大し、脂肪細胞の増殖・分化、アディポサイトカイン産生の変化に関与する可能性があると考えられている。脂肪組織中の成熟脂肪細胞とそれ以外のマクロファージ等を含む細胞分画では、AT1 が発現しており、特に、個体レベルでは、脂肪組織局所において脂肪細胞とマクロファージの相互作用を AII が調節することにより、脂肪細胞機能（脂肪細胞の増殖・分化やアディポサイトカイン産生）に影響を及ぼす可能性がある。

5. 今後の課題

本研究により、RA 系によるエネルギー代謝調節の少なくとも一部に AT1a が関与することが明らかになり、肥満症における AT1a の病態生理的意義と抗肥満創薬ターゲットとしての AT1R の可能性が示唆された。本研究では、高脂肪食負荷による肥満に伴う血圧上昇が認められなかったが、今後、飼料に含有される食塩量を変化させることにより、肥満に伴う高血圧を誘導し、肥満に合併する高血圧の食塩感受性における AT1 の病態生理的意義の検討が必要であると考えられた。

文献等

1. Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A, Uchida H, Sugiura M, Fukuta K, Fukamizu A, Murakami K: Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J. Biol. Chem.* 270: 18719-18722, 1995.
2. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N: Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 138: 1512-1519, 1997.
3. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T: Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines, adipocyte-derived bioactive substances. *Ann. NY. Acad. Sci.* 892: 146-154, 1999.
4. Massiera F, Bloch-Faura M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulangé A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M: Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J.* 15: 2727-2729, 2001.
5. Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turghan S, Saint-Marc P, Fukamizu A, Negrel R, Ailhaud G, Teboul M: Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alterations in adipose tissue development and locomotor activity. *Endocrinology* 142: 5220-5225, 2001.
6. Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Luft F: Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* 40: 609-611, 2002.
7. Furuhashi M, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida D, Shimamoto K: Blockade of the rennin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension* 43: 76-81, 2003.
8. Cassis LA, English VL, Bharadwaj K, Boustany CM: Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology* 145: 169-174, 2004.
9. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112: 1821-1830, 2003.
10. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112: 1796-1808, 2003.
11. Kouyama R, Suganami T, Nishida J, Tanaka M, Toyoda T, Kiso M, Chiwata T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y, Ogawa Y: Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* in press, 2005.

Pathophysiologic role of angiotensin II (AII) type 1 receptor in salt-sensitivity
in obesity-related hypertension

Yoshihiro Ogawa¹, Takayoshi Suganami¹, Ryuji Kouyama¹, Masatsugu Horiuchi²

¹Department of Molecular Medicine and Metabolism, Medical Research Institute, Tokyo
Medical and Dental University, Tokyo, Japan, ²Department of Medical Biochemistry,
Ehime University School of Medicine, Ehime, Japan.

Summary

Given that AII type 1 receptor (Agtr1) is expressed in the adipose tissue, AII may act directly on the adipose tissue. However, whether or not AII modulates directly adipose tissue growth and metabolism *in vivo* and, if so, whether it is mediated via Agtr1 is still a matter of debate. Towards understanding the pathophysiologic role of Agtr1 in salt-sensitivity in obesity-related hypertension, we examined the metabolic phenotypes of mice lacking Agtr1a (*Agtr1a*^{-/-} mice) during a high-fat diet. Using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and primary cultures of mature adipocytes, we also examined the role of Agtr1 in adipocyte differentiation and adipose gene expression *in vitro*. The *Agtr1a*^{-/-} mice exhibited the attenuation of diet-induced body weight gain and adiposity, and insulin resistance relative to wildtype littermates (*Agtr1a*^{+/+} mice). They also showed increased energy expenditure accompanied by sympathetic activation, as revealed by increased rectal temperature and oxygen consumption, increased expression of UCP-1 mRNA in the brown adipose tissue, and increased urinary catecholamine excretion. The tail-cuff systolic blood pressure (BP) of *Agtr1a*^{-/-} mice was significantly lower than that of *Agtr1a*^{+/+} mice ($P < 0.05$). Systolic BP tended to be increased in *Agtr1a*^{+/+} mice fed high-fat diet relative to those fed standard diet. BP was significantly lower in *Agtr1a*^{-/-} mice than in *Agtr1a*^{+/+} mice on a standard diet as reported previously ($P < 0.05$). No significant difference in BP was noted between *Agtr1a*^{-/-} mice fed high-fat diet and those fed standard diet. Using MEFs derived from *Agtr1a*^{+/+} and *Agtr1a*^{-/-} mice, we found no significant difference between genotypes in the capability of differentiating into lipid-laden mature adipocytes. In cultured mature adipocytes, AII increased expression of mRNAs for some adipocytokines, which was abolished by pharmacologic blockade of Agtr1.

This study demonstrates for the first time that *Agtr1a*^{-/-} mice exhibit the attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure. The data of this study also suggest that AII does not affect directly adipocyte differentiation but can modulate adipocytokine production via Agtr1.