

肥満糖尿病病態での副腎における代謝変化とステロイドホルモン合成亢進が食塩感受性に影響する機序の解明

亀田 啓, 中村 昭伸, 柴山 惟, 関崎 知紀, 上垣 里紗

北海道大学病院糖尿病・内分泌内科

概要

研究の目的: 肥満糖尿病患者は食塩感受性高血圧を呈することが知られており、同様に肥満糖尿病モデルである db/db マウスは食塩負荷による尿中塩分排泄増加が乏しく、食塩感受性の高血圧を呈しやすいことが知られている。db/db マウスは血中のアルドステロンが高値を示すことが報告されており、食塩感受性の関連が示唆されているが肥満糖尿病病態における副腎ステロイドホルモン合成亢進機序については明らかでない。また、脂肪滴周囲蛋白ペリリピン 1 は脂肪滴の維持と分解の双方に関与し、副腎でもステロイドホルモンの基質であるコレステロールの調整を担っていると考えられているが、その働きについては未解明である。本研究では db/db マウスの食塩感受性の背景に副腎ステロイドホルモン合成亢進があると考え、その機序の解明並びに治療法の探索を目的とした。

方法: 副腎癌細胞株 Y1 細胞を高血糖状態で培養し正常血糖状態と比較してホルモン産生能や遺伝子変化を観察する。また、ペリリピン 1 の過剰発現・発現抑制を行い同様の検討を行う。db/db マウスに SGLT2 阻害薬を投与し血糖値を低下させ、副腎でのペリリピン 1 を含む遺伝子発現を検討する。

結果: Y1 細胞は高血糖状態でホルモン産生が増加した。ペリリピン 1 の過剰発現ではホルモン産生が増加し、細胞内の脂肪酸などの代謝変化も示唆された。db/db マウスへの SGLT2 阻害薬の投与では血糖値が低下し、副腎ペリリピン 1 の発現の低下や脂肪酸合成酵素の変化を認め細胞実験と同様の傾向が見られた。

考察: ペリリピン 1 は脂肪滴の安定化のみならず副腎皮質細胞内の代謝制御にも関与し、ステロイドホルモンの合成も制御することが示唆された。SGLT2 阻害薬は血糖低下を介してペリリピン 1 の発現を調整し、ステロイドホルモンの合成を抑制することで塩分感受性高血圧に影響する可能性が示唆された。

1. 研究目的

1.1 研究の背景

肥満糖尿病患者は食塩感受性高血圧を呈することが知られており、高血糖や高インスリン血症、交感神経系の関与が示唆されている¹⁾。また、2 型糖尿病患者では、コルチゾールの基礎値と副腎皮質刺激ホルモンに対する反応性が亢進しているという報告がなされており、血糖上昇のみならず臓器合併症の進行に関与していることが示唆されている²⁾。肥満糖尿病モデルである db/db マウスは食塩負荷による尿中塩分排泄増加が乏しく、食塩感受性

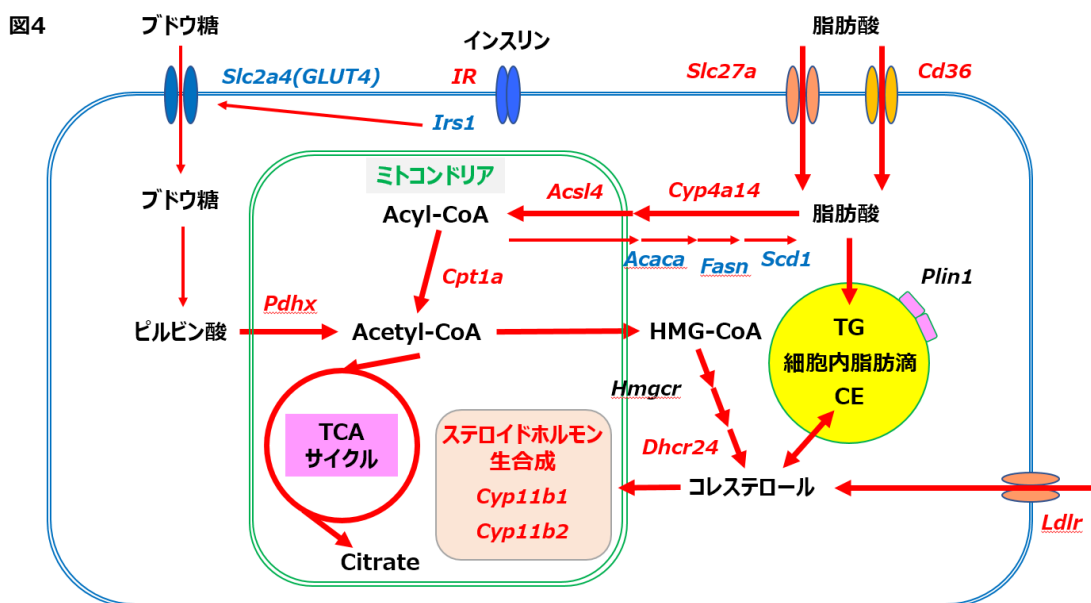
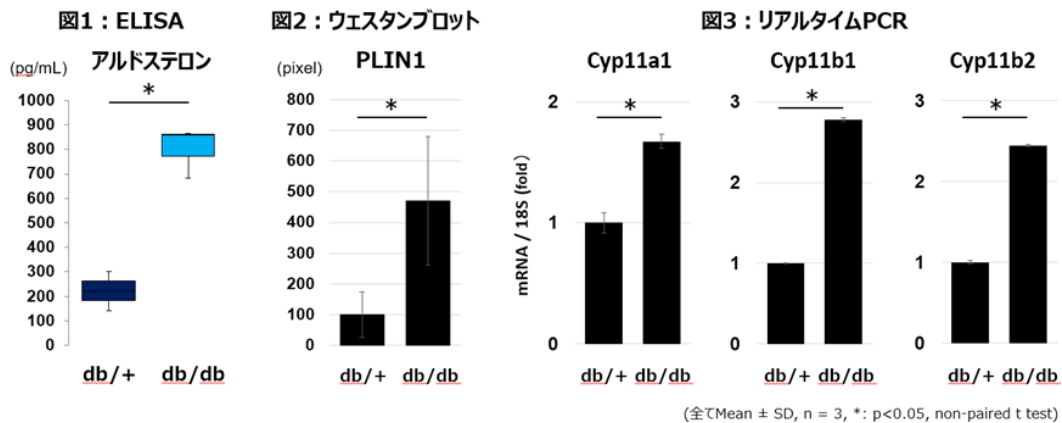
の高血圧を呈しやすいことが知られている³⁾。db/db マウスは血中のアルドステロンが高値を示すことが報告されており⁴⁾、食塩感受性の関連が示唆されているが肥満糖尿病病態における副腎ステロイドホルモン合成亢進機序については明らかでない。また、脂肪滴周囲蛋白ペリリピン 1 は脂肪滴の維持と分解の双方に関与し、副腎でもステロイドホルモンの基質であるコレステロールの調整を担っていると考えられているが、その働きについては未解明である。

1. 2 先行研究の結果

我々は肥満糖尿病におけるステロイドホルモン合成亢進の機序を解明するために db/db マウスならびに db/+ マウスの血液と副腎を採取し比較した。血中アルドステロン濃度は db/db マウスで有意に高値であり既報の通りであった(図 1)。ペリリピン 1 (PLIN1) の蛋白発現は db/db マウスで有意に高かった(図 2)。リアルタイム PCR ではステロイドホルモン合成酵素 Cyp11a1, Cyp11b1, Cyp11b2 の発現はいずれも db/db マウスで亢進していた(図 3)。

また db/db マウスの副腎ではインスリンシグナル伝達に重要な Ins1 (-2.95 倍), インスリンシグナルを受け膜状に移動するグルコーストランスポーター Slc2a4 (GLUT4: -2.57 倍) の発現が低下しており, インスリンシグナルの障害とブドウ糖取り込みの低下が示唆された。脂肪酸取込

みに関与する Cd36 (3.47 倍), Slc27a4 (2.41 倍) の発現は増加し, 脂肪酸分解酵素 Acsl4 (1.83 倍) と脂肪酸 ω 酸化に関与する Cyp4a14 (15.71 倍) も増加し, 脂肪酸合成に関与する Scd1 (-2.59 倍), Fasn (-7.94 倍), Elovl3 (-5.32 倍) の低下を認め, 脂肪酸分解亢進によるアセチル CoA の増加が示唆された。de novo コレステロール合成系の酵素である Dhcr24 (2.46 倍) の発現は増加しており, アセチル CoA からのコレステロール合成が増加していることが示唆された。リポ蛋白取込みに関与する Ldlr の発現も増加しており, コレステロールの細胞内合成と細胞外からの取込みの双方が増加し, その結果コレステロールを基質として合成される副腎ステロイドホルモンの合成が増加することが示唆された(図 4)。



1.3 研究の目的

以上から、本研究では db/db マウスの食塩感受性の背景に副腎ステロイドホルモン合成亢進があると考え、その機序の解明並びに治療法の探索を目的とした。

2. 研究方法

2.1 Y-1 細胞を用いた細胞実験

インスリンシグナルの障害が上記代謝異常の主因である可能性を考え、マウス副腎癌細胞株でステロイドホルモン産生能を有する Y-1 細胞をブドウ糖濃度を変えて培養し、代謝関連因子の遺伝子・蛋白発現ならびに PLIN1 発現を検討する。また、PLIN1 の過剰発現プラスミドならびに siRNA を投与した状態でブドウ糖濃度を変え、ステロイドホルモン産生ならびに代謝への影響を検討する。

ブドウ糖濃度は 100 mg/dL, 450 mg/dL で 24 時間 Y-1 細胞を刺激し、上清、RNA、蛋白を回収しそれぞれ ELISA によるプロゲステロン測定 (Progesterone ELISA Kit, Cayman Chemical Company), Irs1 や Glut4, Cpt1a, Dhcr24 など細胞内代謝に関連するリアルタイム PCR, ウェスタンブロットにより解析を行う。

PLIN1 の過剰発現プラスミドはマウス副腎から, RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて得られた total RNA を出発物質として, ReverTra-Plus-™ (東洋紡) を用いて cDNA を作成し, pENTR™/SD/D-TOPO™ (Thermo Fisher) をエントリークローン, Gateway™ pEF-DEST51 Vector (Thermo Fisher) をデスティネーションベクターとして手順書に従い作成する。PLIN1 siRNA は Santa Cruz Biotechnology より

購入して実験を行う。過剰発現プラスミド, siRNA とともに Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher) を用いて Y-1 細胞にトランスフェクションし、ブドウ糖濃度 100mg/dL, 450mg/dL で 24 時間培養したのち上清, RNA, 蛋白を回収しそれぞれ上述の ELISA によるプロゲステロン測定, リアルタイム PCR, ウェスタンブロットによる解析を行う (図 5)。

これらの細胞実験から高血糖が副腎細胞の代謝に影響しステロイドホルモン合成を亢進させる機序を明らかとする。

2.2 db/db マウスを用いた動物実験

高血糖を呈する db/db マウスに食塩負荷を行った上で血糖改善作用を有する SGLT2 阻害薬 dapagliflozin 投与を行い、非投与群と比較して血中アルドステロン濃度や副腎代謝が変化するかを検討する。具体的には 8 週齢の雄 db/db マウスを 2.0% 食塩水の飲水下で dapagliflozin 混合餌投与群と通常餌投与群の 2 群に分け (各群 n = 10), 2 週間後の血糖値ならびに血中アルドステロン値を測定し比較する。また薬剤投与後に副腎を摘出し、RNA・蛋白を抽出し Plin1, Cyp11b1, Cyp11b2 や上述の代謝関連因子の発現をリアルタイム PCR 法で評価する (図 6)。

これらのマウス実験から血糖改善による副腎代謝、PLIN1 発現の変化を確認し、また食塩負荷による影響と合わせて肥満糖尿病病態における食塩感受性の病態を明らかにする。

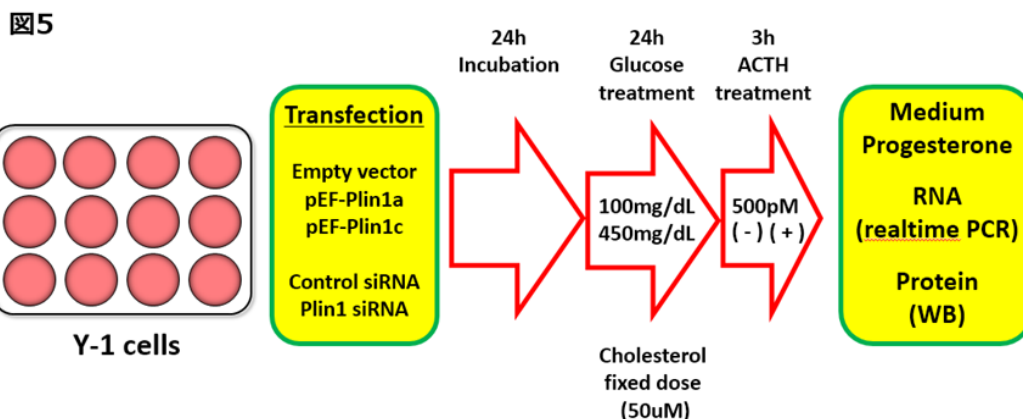
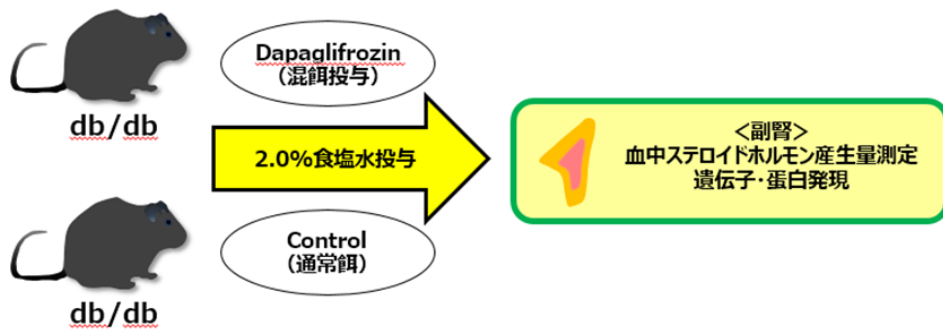


図6



3. 研究結果

3.1 Y-1 細胞を用いた細胞実験

3.1.1 高血糖・高コレステロール状態における遺伝子発現の変化(図7)

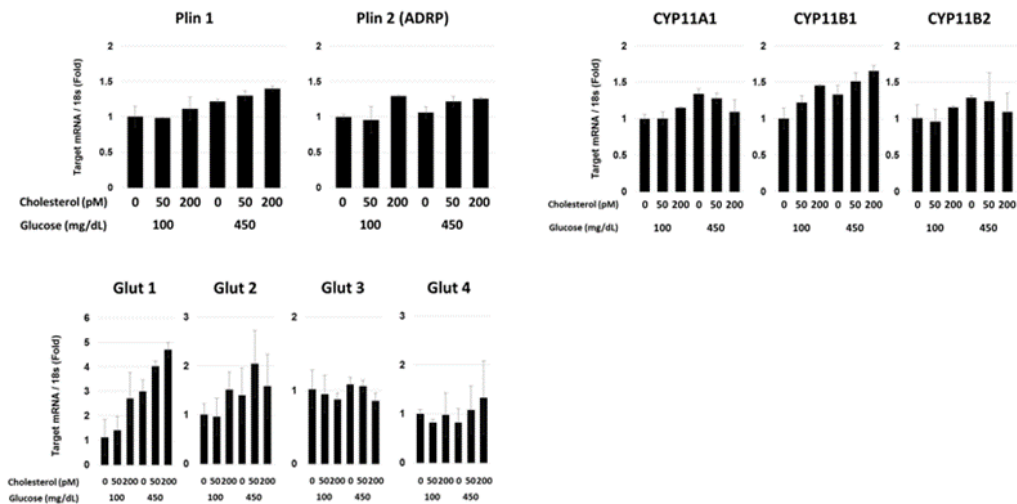
まず Y1 細胞において高血糖や高コレステロールの培養条件でペリリピンの遺伝子発現に変化があるかを検討した。グルコース 100 mg/dl と 450 mg/dl の条件下ではペリリピン 1 の発現が増加した。また、ペリリピン 2 (ADRP) の発現は変化なかった。ステロイドホルモン合成酵素 (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2) の発現はいずれも高

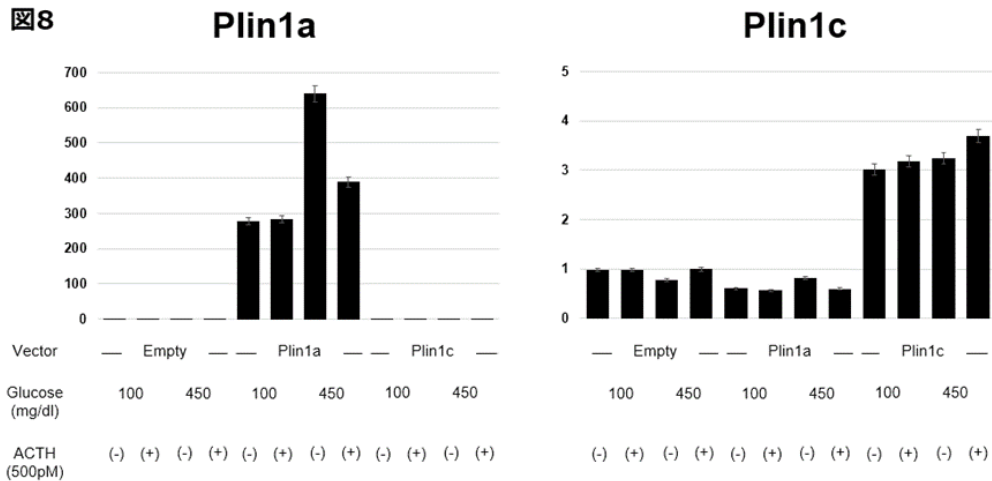
血糖や高コレステロール条件下で増加した。グルコーストランスポーターでは Glut1, Glut2 の発現が高血糖条件下で増加した。

3.1.2 ペリリピン 1a, 1c 過剰発現プラスミド投与後のペリリピン遺伝子発現(図8)

2.2 の項で述べたペリリピン 1a, 1c 過剰発現プラスミドを作成し、Y1 細胞に前述の方法でトランスフェクションした。それぞれのプラスミドのトランスフェクションでペリリピン 1a, 1c がそれぞれ増加しプラスミドは標的の遺伝子を正しく過剰発現させることが示された。

図7





3. 1. 3 ペリリピン 1a, 1c 過剰発現プラスミドならびにペリリピン siRNA 投与後の細胞内脂肪滴の評価(図 9)

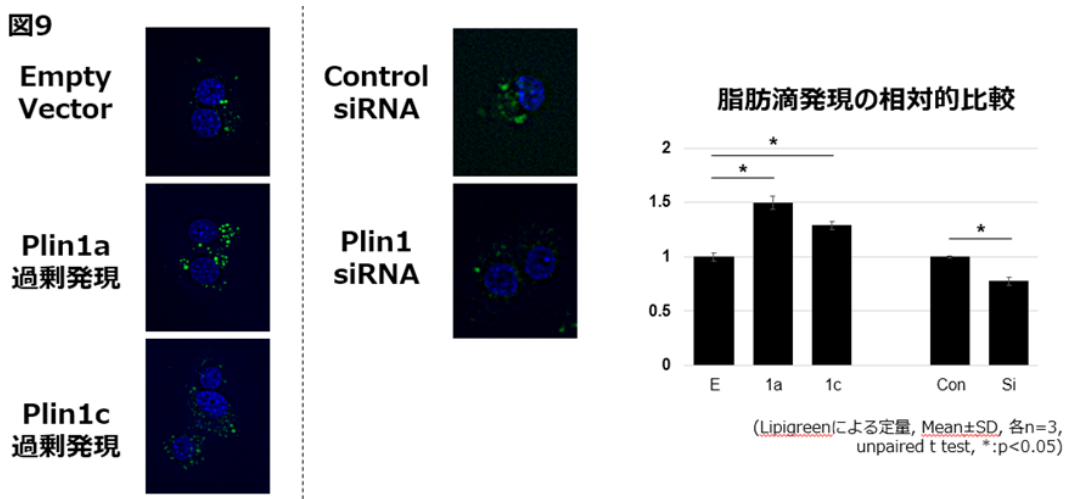
ペリリピン 1a, 1c 過剰発現プラスミドならびにペリリピン siRNA を 2.2 に記載の方法でトランスフェクションし、Lipigreen を用いて脂肪滴染色し蛍光顕微鏡で観察したところペリリピン 1a, 1c の過剰発現で脂肪滴の増加を認め、siRNA の投与で脂肪滴の減少を認めた。同様に Lipigreen を投与して脂肪滴量を定量的に測定したところコントロールと比較してペリリピン 1a, 1c の過剰発現で脂肪滴の増加、siRNA で脂肪滴の減少が確認された。

3. 1. 4 ペリリピン 1a, 1c 過剰発現プラスミド投与後の遺伝子発現の変化(図 10)

ペリリピン 1a, 1c 過剰発現プラスミド投与後の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で確認したところ CYP11b1, CYP11b2 の発現上昇、Irs-1, Acc の発現低下を認めた。

3. 1. 5 ペリリピン 1a, 1c 過剰発現プラスミドならびにペリリピン siRNA 投与後のメディウム中プロゲステロンの変化(図 11)

ペリリピン 1a, 1c 過剰発現プラスミド投与により baseline ならびに ACTH 投与後のメディウム中プロゲステロン濃度の上昇を、ペリリピン siRNA 投与により baseline ならびに ACTH 投与後のメディウム中プロゲステロン濃度の低下を認めた。



脂肪滴発現の相対的比較

Condition	Relative Lipid Droplet Expression
E	1.0
1a	~1.5
1c	~1.3
Con	1.0
Si	~0.8

(Lipigreenによる定量, Mean±SD, 各n=3, unpaired t test, *:p<0.05)

図10

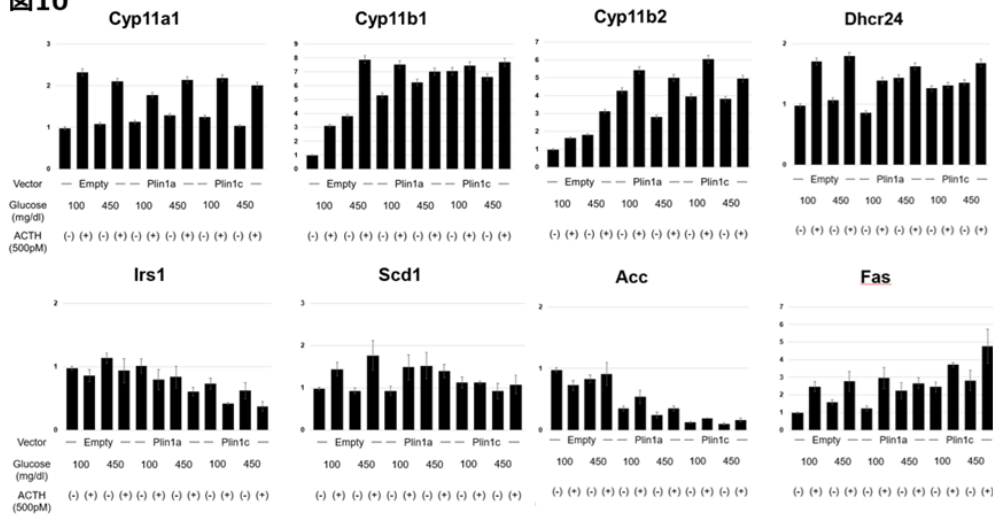
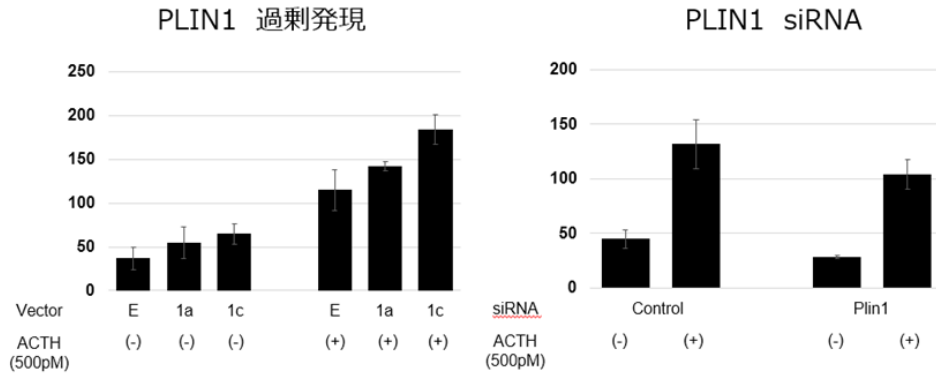


図11

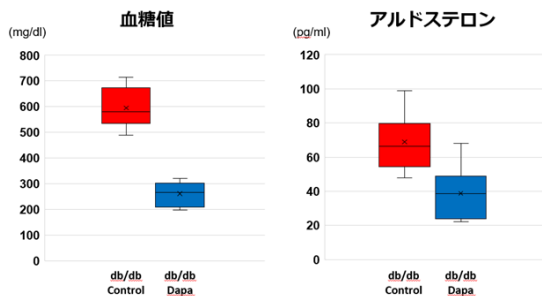


3. 2 db/db マウスを用いた動物実験

3. 2. 1 血糖値, アルドステロン濃度の変化 (図 12)

Dapagliflozin (Dapa) 投与 2 週間後の血糖値は投与群 (db/db Dapa) で非投与群 (db/db Control) と比較して優位に低下した ($p < 0.01$)。血中アルドステロンは db/db Dapa で有意に低下した ($p < 0.05$)。

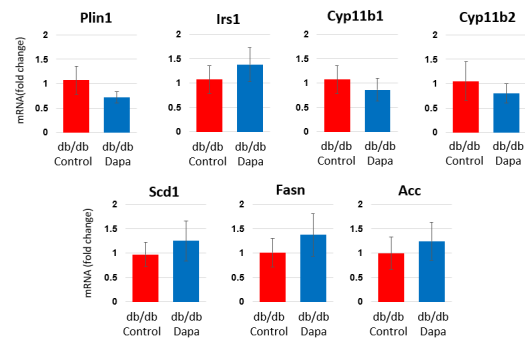
図12



3. 2. 2 副腎遺伝子発現 (図 13)

db/db Dapa では db/db control と比較して Plin1 の発現は低下した。Irs1 の発現は増加し, Cyp11b1, Cyp11b2 は低下, また脂肪酸合成酵素の Scd1, Fasn, Acc の発現はいずれも低下する傾向を認めた。

図13



4. 考察

Y1 細胞において高血糖状態でペリリピン 1 の発現が増加しており背景で述べた db/db マウス副腎での変化と同様の変化を認めた。ペリリピン 1 の Y1 細胞への強制発現実験ではペリリピン 1 により脂肪滴の増加ならびにステロイドホルモン合成酵素の発現増加からペリリピン 1 がステロイドホルモン合成を促進することが示唆された。またインスリンシグナルを調整する *Irs1* や脂肪酸代謝に参与する *Scd1* などの発現が変化することからペリリピン 1 は副腎皮質細胞内の代謝制御にも関与することが示唆された。

マウスでの実験では食塩水飲水下で SGLT2 阻害薬の投与により血糖値が低下し、ステロイドホルモン(アルドステロン)の低下も認めた。副腎内遺伝子変化ではペリリピン 1 の低下、*Irs1* の増加、ステロイドホルモン合成酵素の低下、脂肪酸合成酵素の上昇など細胞実験での結果と同様の傾向を認めた。SGLT2 阻害薬は血糖低下を介してペリリピン 1 の発現を調整し、ステロイドホルモンの合成を抑制することで塩分感受性高血圧に影響する可能性が示唆された。

5. 今後の課題

- ・マウス副腎については DNA マイクロアレイによる網羅的解析やウェスタンブロット法による蛋白発現の解析などを追加してさらなる検討を進める必要がある。
- ・今回の検討はマウス細胞株ならびにマウスを用いたものであり、ヒトでも同様の傾向を示すかどうかは今後検討が必要である。

・ヒトで同様の傾向を示すかどうかの検討には、例えば腎癌手術時に付属して切除される副腎組織を用いて、背景の糖尿病・高血圧の有無などで分けて副腎組織変化や RNA を抽出して遺伝子発現を調べるなどが必要と考えられる。

6. 文献

1. Uzu T. Salt and hypertension in diabetes. *Diabetol Int.* 2017 Jan 28;8(2):154-159.
2. Chiodini I, Adda G, Scillitani A, Coletti F, Morelli V, Di Lembo S, Epaminonda P, Masserini B, Beck-Peccoz P, Orsi E, Ambrosi B, Arosio M. Cortisol secretion in patients with type 2 diabetes: relationship with chronic complications. *Diabetes Care.* 2007 Jan;30(1):83-8.
3. Hirata K, Kume S, Araki S, Sakaguchi M, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Sugimoto T, Nishiyama A, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Uzu T. Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt-sensitive mice model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 27;380(1):44-9.
4. Hofmann A, Peitzsch M, Brunssen C, Mittag J, Jannasch A, Frenzel A, Brown N, Weldon SM, Eisenhofer G, Bornstein SR, Morawietz H. Elevated Steroid Hormone Production in the db/db Mouse Model of Obesity and Type 2 Diabetes. *Horm Metab Res.* 2017 Jan;49(1):43-49.

Adrenal Metabolic Changes and Elevated Steroidogenesis in Obesity and Diabetes Affecting Salt Sensitivity

Kameda Hiraku, Nakamura Akinobu, Shibayama Yui, Sekizaki Tomonori, Kamigaki Risa

Hokkaido University Hospital, Diabetes and Endocrinology

Summary

Aim: Obese diabetic patients are known to exhibit salt-sensitive hypertension. db/db mice, a model of obese diabetes mellitus, are also known to be susceptible to salt-sensitive hypertension due to a lack of increased urinary salt excretion upon salt loading. db/db mice have been reported to show higher levels of aldosterone in the blood, suggesting a link to salt sensitivity. But the mechanism of increased adrenal steroid hormone synthesis in obese diabetic pathology is not clear. Perilipin 1, a peri-lipid droplet protein, is involved in both maintenance and degradation of lipid droplets, and is also thought to regulate cholesterol, a substrate of steroid hormones, in the adrenal gland, but its function is not yet understood. In this study, we hypothesized that increased adrenal steroid hormone synthesis underlies salt sensitivity in db/db mice and aimed to elucidate the mechanism and explore therapeutic strategies.

Methods: We cultured Y1 adrenal carcinoma cells under hyperglycemic conditions and observed their hormone production capacity and mRNA changes compared to normoglycemic conditions. In addition, we will overexpress and suppress perilipin-1 expression in Y1 cells. We decrease blood glucose levels in db/db mice by administering SGLT2 inhibitors and examine gene expression including perilipin-1 in the adrenal gland.

Results: Increased steroid hormone production in Y1 cells under hyperglycemic conditions was observed. Overexpression of perilipin 1 increased hormone production, suggesting metabolic changes such as fatty acids in the cells. db/db mice treated with SGLT2 inhibitor showed decreased blood glucose levels, decreased adrenal perilipin 1 expression and changes in fatty acid synthase, similar to cell experiments.

Discussion: Perilipin 1 is involved not only in lipid droplet stabilization but also in metabolic regulation in adrenocortical cells and in the synthesis of steroid hormones. SGLT2 inhibitors may affect salt-sensitive hypertension by regulating perilipin 1 expression through lowering blood glucose level and suppressing steroid hormone synthesis.