

176. 血液凝固因子を介した全身代謝制御機構の解明

吉田 陽子

新潟大学 大学院医歯学総合研究科 循環器内科学 先進老化制御学講座

Key words : 肥満, 糖尿病, 褐色脂肪

緒言

肥満や糖尿病により健康寿命の短縮や全死亡率が上昇するため、これらの病態を解明することは極めて重要である。これまで我々の研究グループでは、肥満や糖尿病、心不全時に白色内臓脂肪が老化することで全身のインスリン抵抗性が生じ、これらの老化疾患の病態が負に制御されることを明らかにしてきた¹⁻⁵⁾。褐色脂肪組織はかつて主に乳幼児に存在する熱産生器官として認識されてきたが、今日では、成人にも存在し全身の代謝を制御する可能性を秘めた臓器であることがわかってきた。加齢や肥満により褐色脂肪の機能が低下する分子機序は不明であったが、我々は最近、褐色脂肪組織内の微小血管ネットワークが組織の恒常性維持に必要な不可欠であり、肥満時には低酸素を介したシグナルによりミトコンドリア数が減少することで褐色脂肪組織の「白色化」と機能不全が進行し、全身の糖代謝異常が生じることを明らかにした⁶⁾。血液凝固因子は、凝固反応を制御する重要なシステムを構成する分子である。中でも凝固因子 A は肥満に伴い上昇することが以前より報告されていたが、肥満や糖尿病の病態における意義は殆どわかっていなかった。予備的検討の結果、褐色脂肪組織が凝固因子を発現することが明らかとなった。また、凝固因子 A は凝固因子受容体に結合する。白色脂肪組織では、凝固因子受容体 2 を介したシグナルにより脂肪炎症が生じ、肥満の病態が促進することが示唆されているが、肥満モデルマウスを用いて行った我々の予備実験の結果、褐色脂肪組織では凝固因子受容体 2 ではなく、凝固因子受容体 1 が多く存在し、かつ肥満ストレスに伴い発現レベルが上昇していたことから、肥満時には凝固因子 A のレベルが褐色脂肪で上昇し、凝固因子受容体 1 を介したシグナルにより褐色脂肪不全が生じ、糖尿病の病態が増悪する可能性が示唆された。そこで本研究では、血液凝固因子を介して生じる褐色脂肪不全により、全身の代謝的リモデリングが生じる詳細なメカニズムの解明に挑むこととした。

方法

1. 凝固因子 A 阻害による抗肥満効果の検討

野生型マウスに高脂肪食 (HFD) 負荷を行い食餌誘導性肥満モデルを作製した。また HFD 食に凝固因子 A 阻害薬を混餌投与したマウスを作製し、全身の糖代謝不全や熱産生能の低下が改善するか検討した。また各種染色による褐色脂肪の病理学的解析や電子顕微鏡を用いた構造病理学的解析、その他あらゆる分子細胞生物学的手法を用いて表現型を解析した。

2. 遺伝子改変マウスの表現型解析

これまでの予備実験において、凝固因子 A は褐色脂肪細胞に存在する凝固因子 A 受容体 1 を介したシグナルにより恒常性破綻をきたす可能性が示唆されていた。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて全身の凝固因子 A 受容体 1 ノックアウト (KO) マウスを作製した。また、さらに詳細な検討を行うために組織特異的な凝固因子 A 受容体 1 ノックアウトマウスを作製した。

3. 細胞実験

褐色脂肪細胞株を用いて、凝固因子 A が褐色脂肪細胞不全をきたす詳細な分子機序を検討した。

結 果

野生型マウスに高脂肪食（HFD）を負荷して作製した食餌誘導性肥満モデルマウスを用いて行った検討の結果、肥満群で耐糖能異常、インスリン抵抗性が惹起されるとともに、熱産生能が低下し、褐色脂肪機能不全が生じていることがわかった。その際の褐色脂肪組織では白色化が生じていた。また凝固因子 A が転写レベル、タンパクレベルで褐色脂肪組織に発現しており、HFD の代謝ストレスにより組織因子（TF）と血液凝固第 VII 因子（FVII）の発現レベルが褐色脂肪組織で上昇し、凝固因子 A が活性化することを見出した。凝固因子 A は凝固因子 A 受容体に結合するが、白色脂肪組織では凝固因子 A 受容体 2 を介したシグナルにより脂肪炎症が生じ、肥満の病態が促進することが示唆されている。我々の検討の結果、褐色脂肪組織では凝固因子 A 受容体 2 ではなく、凝固因子 A 受容体 1 が多く存在し、かつ肥満ストレスに伴い発現レベルが上昇することがわかった（図 1）。

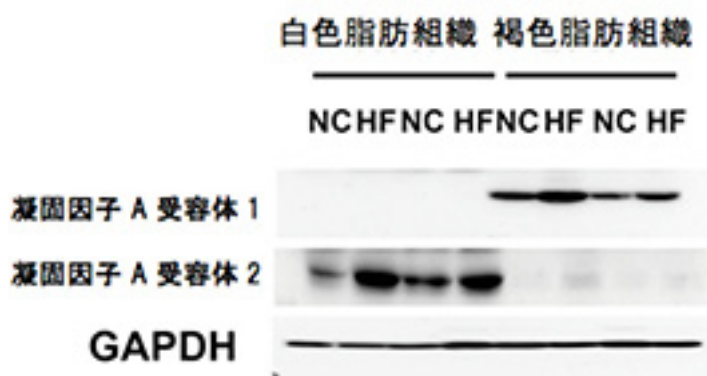


図 1. 褐色脂肪における凝固因子 A 受容体の発現

凝固因子 A 受容体 1 は肥満褐色脂肪組織に多く存在する。(NC : 通常食、HF : 高脂肪食)

この食餌誘導性肥満モデルマウスに対し、凝固因子 A 阻害薬を混餌投与し凝固因子 A-凝固因子 A 受容体 1 シグナルを抑制すると、耐糖能異常、インスリン抵抗といった全身の代謝異常とともに熱産生能などの褐色脂肪不全が抑制された。肥満ストレスに伴う褐色脂肪の白色化は凝固因子 A 阻害薬により抑制され、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアの減少が凝固因子 A 阻害薬により改善することがわかった（図 2）。

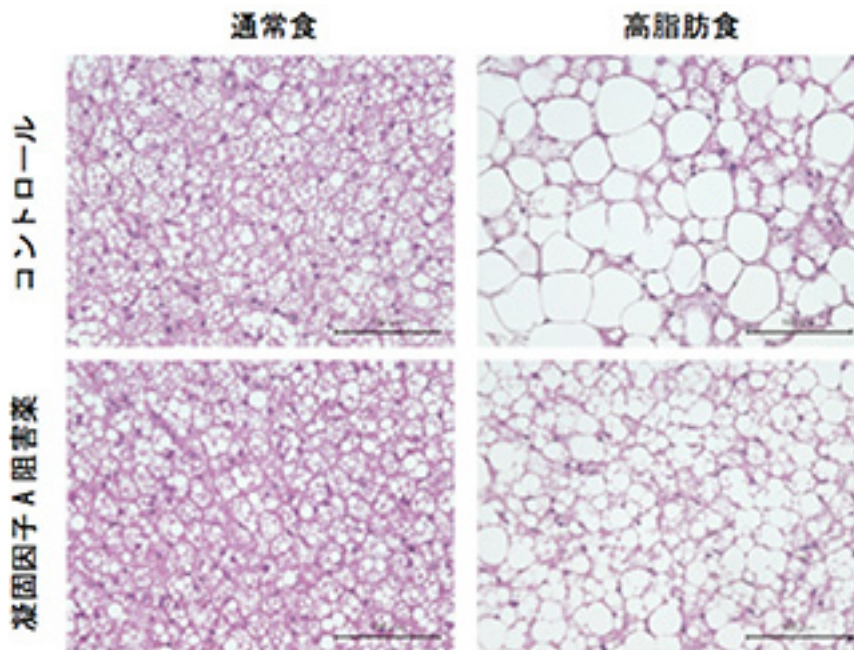


図2. 凝固因子 A 阻害薬による褐色脂肪不全の改善

褐色脂肪組織の HE 染色。凝固因子 A 阻害薬投与により褐色脂肪組織の白色化が抑制される。Scale bar: 50 μ m.

一方で肥満モデルマウスの血液中では凝固因子 A の発現レベルが上昇しないことから、褐色脂肪局所における凝固因子 A シグナルが病的意義をもつ可能性が高いと考えられた。培養褐色脂肪細胞に凝固因子 A を添加するとミトコンドリアの活性酸素レベルが上昇し、ミトコンドリア機能が低下することがわかった。また、これらの変化は凝固因子 A 受容体 1 阻害薬によりいずれも抑制された。さらに培養褐色脂肪細胞に凝固因子 A 受容体 1 アゴニストを添加した際にも同様のミトコンドリア活性酸素の増加やミトコンドリア機能の低下が生じたことから、凝固因子 A は凝固因子 A 受容体 1 を介してこれらの変化を引き起こすものと考えられた。

さらに詳細に検討したところ、肥満群の褐色脂肪組織にて Extracellular signal-regulated kinases (ERK) のリン酸化が促進し、凝固因子 A 阻害薬投与群にて低下することがわかった。また培養褐色脂肪細胞における凝固因子 A、凝固因子 A 受容体 1 アゴニストによるミトコンドリア機能の低下やミトコンドリア活性酸素の産生は、いずれも ERK 阻害薬により抑制されるため、ERK を介したシグナルにより褐色脂肪のミトコンドリアの活性酸素レベルが上昇すると考えられた。また培養褐色脂肪細胞に低酸素刺激を加えると FVII や凝固因子 A 受容体 1 の発現レベルの上昇を認めること、褐色脂肪細胞に Hypoxia inducible factor-1 α (Hif-1 α) を過剰発現させると FVII や凝固因子 A 受容体 1 の発現レベルが上昇することから、低酸素刺激 \rightarrow Hif-1 α \rightarrow FVII or 凝固因子 A 受容体 1 というシグナル経路によりこれらの分子の発現が制御される可能性が高いと考えられた。この機序についてさらに検証を進めるため、現在、凝固因子 A 受容体 1 ノックアウトモデルマウスを用いて解析を進めているところである。

考 察

本研究により、褐色脂肪組織に血液凝固因子が発現すること、代謝ストレスに伴い過剰な凝固因子 A - 凝固因子 A 受容体 1 を介したシグナルにより、ミトコンドリア機能異常が生じ、褐色脂肪不全から全身の代謝異常が生じることがわかった。肥満時の褐色脂肪において、低酸素刺激、代謝ストレスが重要なシグナルであるが、前者により FVII や凝固因子 A 受容体 1 のレベルが上昇、後者により TF の発現レベルが上昇することが明らかとなった。本研究の結果は、凝固因子 A が褐色脂肪不全を介して全身の代謝不全を惹起するという新たな代謝的側面を明らかにするものであり、血液凝固因子への介入が今後の肥満、糖尿病などの代謝性疾患に対する新たな治療法の戦略となり得ると考えられる。

従来、血液凝固因子は止血機構において重要な役割を担うものであり、主に肝臓で産生されると考えられて来たが、褐色脂肪組織において血液凝固因子が発現する意義については未だ明らかではない。太古の時代では、飢えと寒冷に対する防御システムの構築が、生存する上で重要であったと考えられる。褐色脂肪は熱産生能を持つ活発な代謝臓器であるとともに微小な血管ネットワークに富む臓器であり、出血を抑制して褐色脂肪の機能を維持することが重要であったのであろうか。今後、遺伝子改変モデルマウスを用いた検討により、更なる検討を行う予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科の南野徹、清水逸平、林由香である。本稿を終えるにあたり、本研究に多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T. DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metab.* 2016;20(6):967-77. doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.008. PubMed PMID: 25456739
- 2) Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, Kobayashi Y, Minamino T. Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell Metab.* 2013;18(4):491-504. doi: 10.1016/j.cmet.2013.09.001. PubMed PMID: 24093674
- 3) Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Tateno K, Okada S, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Ito T, Zechner R, Komuro I, Kobayashi Y, Minamino T. p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell Metab.* 2012;15(1):51-64. doi: 10.1016/j.cmet.2011.12.006. PubMed PMID: 22225876
- 4) Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED, Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1506-14. doi: 10.1172/JCI40096. PubMed PMID: 20407209
- 5) Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med.* 2009;15(9):1082-7. doi: 10.1038/nm.2014. PubMed PMID: 19718037
- 6) Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S, Walsh K. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest.* 2014;124(5):2099-112. doi: 10.1172/JCI71643. PubMed PMID: 24713652