

主論文の要旨

**Angiotensin II Receptor Blocker Ameliorates
Stress-induced Adipose Tissue Inflammation
and Insulin Resistance**

（ アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬はストレスにより誘発された
脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性を改善する ）

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

（指導：室原 豊明 教授）

林 元春

【諸言】

ストレスは高血圧、心血管疾患、メタボリックシンドローム(MetS)、糖尿病の発症と関係する。ストレスは交感神経系(SNS)と視床下部・下垂体・副腎系(HPA)を活性化し、ホルモンや免疫の反応を変化させる。その結果糖代謝を悪化させる。

我々は最近、ストレスが **Mets** に似たメカニズムで糖代謝の恒常性を乱すことを発見した。マウスを用いて、2週間の断続性拘束ストレスが脂肪組織の炎症を悪化させ、インスリン抵抗性に繋がることを示した。ストレスはカテコラミン・糖質コルチコイドの分泌を促し、脂肪分解を起こし遊離脂肪酸を放出する。遊離脂肪酸は **Toll-like receptor4** を介し、**TNF- α** ・**IL-6**・**MCP-1**等の炎症性サイトカインを作り、単球を集簇させる。**MCP-1**の阻害が、**Mets**のマウスと同じように内臓脂肪の炎症とインスリン抵抗性を抑制することも示した。レニンアンジオテンシン系(RAS)は高血圧の治療対象として確立されている。多くの臨床試験でアンジオテンシンII 1型受容体拮抗薬(ARB)が高血圧患者の糖尿病発症を遅らせることが示されている。肥満は全身と脂肪組織局所のRASを活性化させる。白色脂肪組織(WAT)はアンジオテンシノーゲンの有力な供給源である。脂肪組織のRASの活性化は脂肪組織の炎症に寄与する。

イルベサルタンは **MCP-1**分泌を抑制し、さらに **MCP-1**受容体(CCR2)の拮抗薬としても働く。よってイルベサルタンは **RAS**と **MCP-1/CCR2**経路の両方から脂肪組織の炎症を抑制することが予想される。ストレスにより誘発された脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の抑制についてイルベサルタンの影響を研究した。

【方法】

Animal and restraint stress procedure

8週齢オスの **C57BL/6J**マウスをコントロール群とストレス群に分けた。ストレス群は1日2時間の拘束ストレスを2週間受け、コントロール群はストレスを受けなかった。その間それぞれのマウスにランダムに **vehicle**・イルベサルタン (**3mg/kg/day**もしくは **10mg/kg/day**)を経口投与した(n=10)。体重と食事量を測定した。2週間のストレス終了後、血液・鼠径脂肪組織・骨格筋のサンプルを採取した。血漿の総コレステロール値・トリグリセリド値・遊離脂肪酸値を測定した。

Quantitative PCR

RNAを抽出し逆転写を行い、**quantitative PCR**を施行した。RNAの量はそれぞれの **β -actin mRNA**定量値で補正した。

Histological analysis of inguinal adipose tissue

鼠径の白色脂肪組織から **5 μ m**の切片を作り、**H&E**染色を行った。

Immunohistochemistry

鼠径の白色脂肪組織を抗 **CD11b**抗体にて免疫組織化学的に染色した。

Enzyme-linked immunosorbent assay

血漿中の MCP-1・TNF- α ・IL-6 の濃度を測定した。

Intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests

2 週間のストレスの後、腹腔内投与でグルコース負荷試験(GTT)とインスリン負荷試験(ITT)を行った。GTT の前に一晩絶食にし、その後 2g/kg の D-グルコースを投与した。ITT の前に 16 時間絶食にし、その後 0.75U/kg のインスリンを投与した。

【結果】

Irbesartan prevents stress-induced adipose inflammation

ストレスマウスの脂肪組織に CD11b 陽性細胞や F4/80 と CD68 の mRNA 発現の有意な増加を認めた(Figure1)。イルベサルタンはそれらを容量依存性に減らした。コントロールマウスにおいては、高容量でもイルベサルタンはそれらに影響を与えなかった。

Irbesartan reduces stress-induced angiotensinogen level

vehicle を与えたストレスマウスにおいて脂肪組織のアングiotenシノーゲンの mRNA 発現量はコントロールマウスの 2 倍以上であった(Figure2A)。イルベサルタンは容量依存性にアングiotenシノーゲン産生を減少させた(Figure2A)。

Irbesartan reduces inflammatory adipokine levels in stressed mice

ストレスは脂肪組織の MCP-1・TNF- α ・IL-6 の mRNA 発現を有意に増加させた。イルベサルタンは容量依存性にそれらを抑制した(Figure2B-D)。イルベサルタンはまたストレスマウスで起きた血漿中の MCP-1・TNF- α ・IL-6 濃度の上昇も同じように抑制した。ストレスにより誘発されたアディポネクチンの mRNA 発現の低下をイルベサルタンは回復させた(Figure2E)。しかし、コントロールマウスでは高容量のイルベサルタンでもこれらのアディポカインの発現に変化を認めなかった。

Irbesartan reduces stress-induced lipolysis

高容量イルベサルタンはコントロールマウスの体重増加量を変化させなかった。一方、ストレスマウスでは有意に体重増加量が減少していた。イルベサルタンは容量依存性にその減少を回復させた。それぞれの食事量に差はなかった。

ストレスやイルベサルタンは総コレステロール値やトリグリセリド値は変化させなかった。一方、遊離脂肪酸値はストレスで上昇し、イルベサルタンにより容量依存性に低下した(Figure3B)。鼠径の脂肪組織重量はストレスマウスで明らかに減少しており、イルベサルタン投与により容量依存性に回復された(Figure3C)。ストレスにより誘発された脂肪組織の減量と脂肪細胞サイズの縮小はイルベサルタン投与により回復された(Figure3D and E)。

Irbesartan rescues stress-induced insulin insensitivity

ストレスマウスにおいて vehicle 群とイルベサルタン群でグルコース耐性に有意な差は認めなかった(Figure4A)。しかし、インスリン耐性は高容量イルベサルタン群において ITT45 分以降改善した(Figure4A)。高容量のイルベサルタンにより単径脂肪組織の IRS-1 と GLUT4 の mRNA 発現量が回復した(Figure4B)。骨格筋の IRS-1 と GLUT4 の mRNA 発現量は変化しなかった。

【結論】

RAS as a therapeutic target in stress-induced adipose inflammation

我々はストレスが脂肪組織のアンジオテンシノーゲンを増加させ、RAS を活性化させることを示した。アンジオテンシノーゲンは多くの臓器で分泌されているが、齧歯動物において脂肪組織由来のアンジオテンシノーゲンは循環するアンジオテンシノーゲンの 1/3 に及び、肥満は大動脈・腎臓・肝臓での発現は変化させないので、脂肪組織由来のアンジオテンシノーゲンの増加がストレスによる RAS 活性化の原因である可能性が高い。脂肪組織のアンジオテンシノーゲンはアンジオテンシン II、交感神経活性、インスリン、炎症性アディポカインにより増加する。脂肪組織の RAS の活性化はまた炎症性アディポカインやアンジオテンシノーゲンを作り出す。そのように、RAS と炎症は相乗的に脂肪組織の炎症を悪化させる。イルベサルタンは NF κ B の活性抑制を介し MCP-1 分泌を抑制し、またその分子的構造から CCR2 に高い親和性を有する。イルベサルタンは脂肪組織のアンジオテンシノーゲンを減少させ、さらに MCP-1/CCR2 経路を妨げる。その結果ストレスにより誘発される脂肪組織の RAS 活性化の悪循環を断ち切ったと考えられる。

RAS inhibition suppressed stress-induced lipolysis

ストレスにより誘発されたコルチゾール放出と脂肪組織の SNS 活性化は脂肪分解を起こす。その結果脂肪細胞は縮小し、遊離脂肪酸濃度が上昇する。脂肪分解と遊離脂肪酸放出は脂肪組織の炎症を誘発する。さらに、脂肪組織の炎症が脂肪分解を加速させる(Figure2B)。マクロファージ由来の TNF- α は脂肪細胞の TNF- α 受容体に作用し、炎症性サイトカインの産生と脂肪分解を誘発する。イルベサルタンは単球の集簇・TNF- α 発現を減少させ、脂肪分解と脂肪組織の炎症の悪循環を断ち切ったと考えられる(Figure3)。

Anti-inflammatory effect of irbesartan restored stress-induced insulin resistance

今回の研究で、我々はイルベサルタンがストレスにより誘発される MCP-1 産生や脂肪組織の炎症を抑制し、インスリン抵抗性を改善することを示した。イルベサルタンはまた PPAR γ 活性化作用を有する。脂肪組織のアディポネクチンの回復も全身のインスリン感受性を改善させうる。イルベサルタンは抗炎症効果と多面的シグナル効果を介してストレスにより誘発されたインスリン抵抗性を改善したと考える。

Possible benefits in hypertensive patients with mental stress beyond blood pressure control

今日の高血圧患者はストレスにさらされており、しばしばインスリン抵抗性となる。イルベサルタンはストレスを抱えた高血圧患者においてインスリン感受性を改善するかもしれない。

結論として、我々はイルベサルタンが RAS と炎症性サイトカインの調整と脂肪分解の抑制を介して、ストレスに誘発される脂肪組織の炎症を阻害することを示した。脂肪組織の抗炎症効果はストレスにより誘発されたインスリン抵抗性を改善する。