

血液凝固第 Xa 因子による褐色脂肪不全を介した新たな糖尿病発症機序の解明

清水逸平

新潟大学大学院医歯学総合研究科 先進老化制御学講座

【研究の背景】

これまで我々の研究グループは、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^{1~3)}。また最近、褐色脂肪不全を介して肥満や糖尿病の病態が促進することを明らかにした⁴⁾。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、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つてきた。血液凝固第 Xa 因子(FXa)は肥満や糖尿病に伴い上昇することが知られているが、これらの病態における意義はわかつていない。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、肥満時に FXa のレベルが褐色脂肪で上昇し、Proteinase-activated receptor(PAR)-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。そこで本研究において、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。

【目的】

本研究の目的は、血液凝固第 Xa 因子(FXa)を介して生じる褐色脂肪不全により、全身の代謝異常が生じる機序を解明することである。

【方 法】

1) FXa 阻害による抗肥満効果の検討:

4 週齢の野生型マウスに高脂肪食(HFD)負荷を 8-12 週間行い肥満モデルを作製した。HFD 食に FXa 阻害薬を混餌投与したマウス(HFD +FXai 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。代謝ケージや、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、FXa は褐色脂肪細胞に存在する PAR1 受容体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、全身 PAR1 ノックアウト(KO)マウスを作製した(崎村ら、笹岡ら)。また、さらに詳細な検討を行うために floxed PAR1 マウスを作製した(崎村ら)。

3) 細胞実験:

褐色脂肪細胞株を用いて、FXa 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】

肥満モデルマウスを用いて行った検討の結果、血液凝固第 X 因子(FX)が褐色脂肪組織に発現し、代謝ストレスにより組織因子(TF)と血液凝固第 VII 因子(FVII)、FXa の発現レベルが褐色脂肪組織で上昇することを見出した。また、FXa の受容体である「PAR-1」が褐色脂肪組織で多く存在し、肥満により発現レベルが上昇することがわかつた。FXa-PAR1 シグナル

を FXa 阻害薬で抑制すると、褐色脂肪不全と全身の代謝異常を抑制することができた。肥満ストレスに伴う褐色脂肪の白色化は FXa 阻害薬により抑制され、電子顕微鏡を用いた検討の結果、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアの減少が改善することがわかった。肥満モデルマウスの血液中では FXa の発現レベルが上昇しないことから、褐色脂肪における FXa シグナルが病的意義をもつ可能性が高いと考えられた。分化した褐色脂肪細胞を用いた検討の結果、FXa のリコンビナントタンパクを添加することでミトコンドリアの活性酸素レベルが上昇し、ミトコンドリアの膜電位が低下することがわかった。また、これらの変化は PAR-1 阻害薬によりいずれも抑制された。PAR1 アゴニストを用いても同様の変化が生じた。FXa、PAR-1 アゴニストによるこれらの変化は、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る。さらに我々は、代謝ストレス下で FVII、FXa、TF が上昇するメカニズムを検討することとした。分化褐色脂肪細胞に低酸素刺激を加えると FVII や PAR-1 の発現レベルの上昇を認めた。Hypoxia inducible factor-1a (Hif-1a) を発現するアデノウイルスを感染させると FVII や PAR-1 の発現レベルが上昇することから、低酸素刺激→Hif-1a →FVII or PAR-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。分化褐色脂肪細胞にパルミチン酸を添加すると TF の発現レベルが上昇することもわかった。現在 Crispr/Cas9 の系を用いて全身 PAR-1 ノックアウトモデルマウスを作製し、動物実験室で繁殖中である。さらに我々は Floxed PAR-1 マウスを作製し、動物実験室で繁殖中である。UCP-1 Cre マウスと交配し、褐色脂肪特異的 PAR-1 ノックアウトを作製し、解析する予定である。

【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 FXa-PAR-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 PAR-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。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だろうか。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。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、血液凝固因子がもつ負の代謝制御機構の一端が明らかとなった。FXa-PAR1-ミトコンドリア間に存在する負の連関が存在することが強く示唆された。FXa 阻害薬は心房細動症例に対してワーファリンに代わる抗凝固薬として広く使われるようになった。抗肥満は心房細動治療や再発予防にとって、非常に重要な治療戦略である。本研究をさらに発展させることで FXa が持つ負の代謝的側面が明らかになり、FXa 阻害薬が持つ抗肥満効果が明らかになると確信する。

【参考・引用文献】

- Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Minamino T. Adipose tissue inflammation in diabetes and heart failure. *Microbes Infect.* 2013;15(1):11-7.
- Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Tateno K, Okada S, Moriya J, et al. p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell Metab.* 2012;15(1):51-64.
- Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med.* 2009;15(9):1082-7.
- Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest.* 2014;124(5):2099-112.