

# 線溶系を介した脂肪細胞の正常細胞への影響

会津大学短期大学部

食物栄養学科

高橋 君子

## 線溶系を介した脂肪細胞の正常細胞への影響

高橋 君子

平成 25 年 1 月 10 日受付

**【要旨】** 肥満率の低下を目標に様々な取り組みがなされているが、生活習慣病は予備軍を含め増加傾向にある。脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインが生活習慣病の発症に深く関わっていることが知られているが、肥満状態にあると生活習慣病以外の疾患の病態や予後にも影響する可能性が大きいことも注目され始めている。特に肥満脂肪細胞から分泌され、虚血性循環器疾患に関連する線溶系の阻害物質であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1)は、線維化病変の指標にもなっている。全身に分布する血管内腔で血液と直接接する血管内皮細胞と脂肪細胞との細胞間相互作用を詳細に検討することは多くの疾患の予後を推測できると考えられる。そこで PAI-1 を産生する脂肪細胞の培養上清を血管内皮細胞に添加し、内皮細胞のウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ(uPA)および PAI-1 産生の変化を測定した。脂肪細胞の培養上清を添加した血管内皮細胞では、uPA および PAI-1 の産生が増加しており、脂肪細胞から分泌されたアディポサイトカインが血管内皮細胞や血管周囲組織の恒常性維持機能に影響を与えることが示唆された。

## はじめに

肥満とは、脂肪細胞に脂肪が大量に蓄えられ、脂肪細胞から分泌される悪玉アディポサイトカインが増加することで生活習慣病を引き起こす可能性が高まった状態である(1)。このため肥満率の低下を目標に様々な取り組みがなされているが、生活習慣病は予備軍を含め増加傾向にある(2)。脂肪細胞の分泌するアディポサイトカインが、正常細胞にどのような変化をもたらすかを分子レベルで解析することで、生活習慣病の詳細な病態が解明され多くの疾患の治療の一助になると考え、肥満脂肪細胞から分泌される血液凝固性を高める PAI-1 に着目し、培養脂肪細胞の培養上清を血管内皮細胞に添加することでの内皮細胞の変化を測定した。

## 脂肪細胞の分泌

脂肪細胞からは、様々なアディポサイトカインが分泌されている(図1)。このアディポサイトカインには善玉と悪玉が知られており、善玉は脂肪の蓄積が正常な(肥満ではない)脂肪細胞から分泌されるレプチン、アディポネクチンなどがあり、満腹中枢刺激や脂肪分解に作用することで過食を防ぎ脂肪の蓄積を抑制するように働く(3)。一方、悪玉アディポサイトカインは、脂肪が過剰に蓄積した肥満脂肪細胞から分泌され、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )やレジスチンによるインスリン抵抗性亢進による高血糖、遊離脂肪酸放出の増加による脂質異常症、アンジオテンシノゲンによる高血圧といった生活習慣病を起こすと考えられている(4-6)。さらに、血管壁を異常増殖させ、血管腔狭窄を起こすへパリン結合型上皮細胞増殖因子(HB-EGF)や血栓形成性を高める PAI-1 も分泌され(7)、肥満を放置すると生活習慣病の最悪の病態である動脈硬化発症の危険性が増大する。

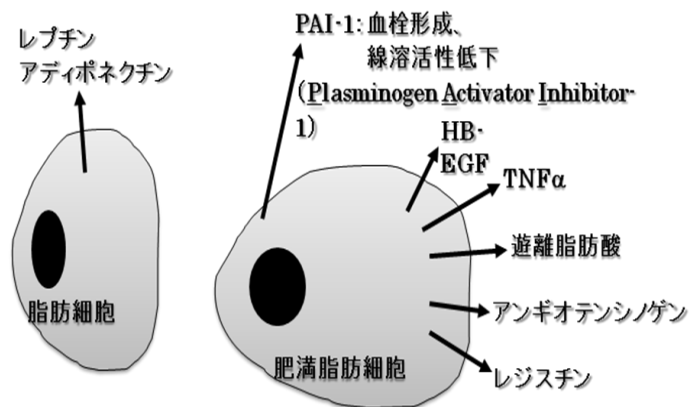


図1: 『脂肪細胞の分泌』 脂肪細胞は単なる

脂肪の貯蔵だけでなく、食欲や体内環境を変化させる生理活性物質を分泌している。脂肪を過剰に蓄えた肥満脂肪細胞では、特に生活習慣病に関わる生理活性物質を分泌するようになる。

HB-EGF: へパリン結合型上皮細胞増殖因子、TNF $\alpha$ : 腫瘍壊死因子

## 血液凝固と線溶系

傷害による血管壁の破壊や血管内腔の異常があると、血漿中に含まれる血液凝固因子が連続的に活性化を受け血液が凝固して止血する(図2)。出血の原因が血管壁の破壊の場合を外因性、血管内腔の異常の場合を内因性の血液凝固という。血液凝固反応初期に活性化を受ける血液凝固因子は外因性か内因性かによって異なるが、凝固反応終盤の因子は共通であり、最終段階でフィブリノゲンが分解されて繊維状タンパク質のフィブリンとなる。このフィブリン繊維中に血球が絡まって血液凝固塊を形成し、傷害部位からの出血を阻止する。止血後、傷害組織が修復された時に、血液凝固塊が剥離、処理されることで組織修復は完了する。しかし、内因性の場合には血管内で形成された血液凝固塊が剥離すると、血流に乗り、より微小な血管腔を閉塞させる原因になる可能性があるため、血管内腔の修復後はフィブリンを可溶性ペプチドに分解する線溶系酵素が活性化されて消失する。

上記のように血液凝固と線溶は相反する反応であるが、生命維持には不可欠な機能であるため、それぞれの反応が必要な時期に、複数の因子が連続的に増幅しながら活性化されるカスケード反応によって速やかに進行する。

また、適切な時期にのみ血液凝固あるいは線溶が起こるように、それぞれの血液凝固因子と線溶系因子に対する阻害物質が生体内に存在する。

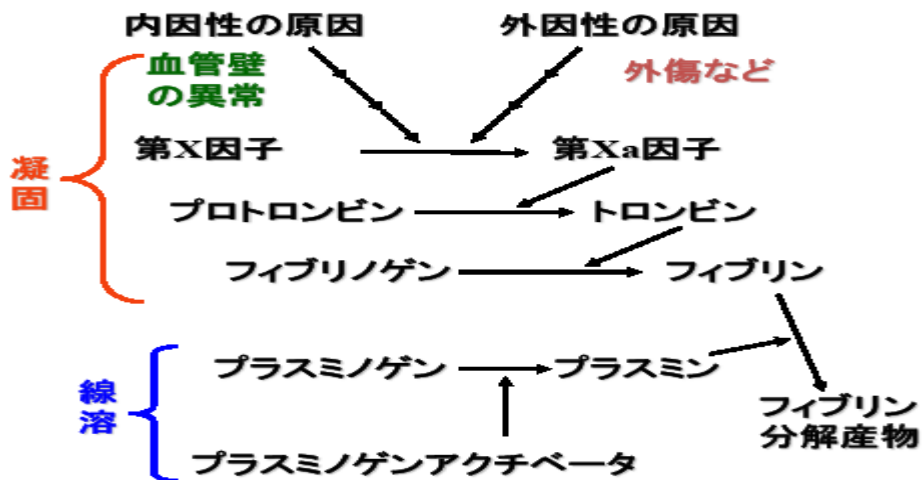


図2 : 『血液凝固と線溶』内因性あるいは外因性の傷害が起こると血液中にある凝固因子が活性化を受けてフィブリンが形成され血液は凝固する。凝固により止血され傷害の修復が完了すると、凝固塊は溶解し血流に乗って処理される。この血液凝固塊の消失を、線維状タンパク質フィブリンの溶解がおこることから線溶と呼ぶ。

本稿で着目している線溶系の阻害因子 PAI-1 は、フィブリンを可溶性ペプチドへ分解するプラスミンの活性化酵素であるプラスミノゲンアクチベータを阻害する。この PAI-1 の増加は血液が凝固系に傾き、血液流動性の低下や易血栓性をもたらす (図2) (7)。

また、プラスミンは血液凝固塊だけでなく、必要に応じて細胞間質の分解や細胞増殖因子の活性化を行う酵素でもあるため、細胞遊走や細胞増殖にも関連が深い(8-9)。このため肥満などで PAI-1 が増加することは、生理的組織修復あるいは炎症などの病態の推移に変化をもたらす可能性がある。すなわち肥満が起因となって、脂肪細胞から分泌される PAI-1 などのアディポサイトカインが生体の恒常性維持機能に大きな影響を与えられ(4)。

## 炎症

炎症反応は恒常性維持のための修復を前提にした生体防御反応であり、細胞傷害をきっかけに合成されるプロスタグランジンなどにより血管透過性亢進と炎症細胞の誘導、種々サイトカインの放出が起こる。このサイトカインの一部が周囲の正常組織へ作用し修復を促す(10)。傷害による炎症組織辺縁に存在する血管内皮細胞の uPA の産生分泌が促進され、その活性が表面に限局し血管内皮細胞の遊走を促すことで血管を誘導する。また炎症性サイトカインに反応した血管内皮細胞は細胞増殖因子の産生を増加させる(8, 11-12)。不活性型で分泌された細胞増殖因子は、やはり uPA のようなプロテアーゼにより活性型に変換される(9)。

炎症組織では線維芽細胞も増殖し傷害組織を囲い込むことで傷害の限局化をはかるとともに、上皮系細胞に作用する増殖因子の産生・放出を行う(8-9)。培養ヒト線維芽細胞も炎症性サイトカインの刺激で細胞増殖因子を産生し、分泌された細胞増殖因子は細胞外マトリックス(ECM) に選択的に吸着・結合して貯蔵され、ECM に結合している細胞増殖因子は内皮細胞などが産生する uPA で切り出される(9, 13)。

炎症組織の修復を助けるために増殖が顕著になる線維芽細胞は傷害組織への遊走と、そこで活発に増殖しながら

ら細胞増殖因子やコラーゲンなどの ECM の産生を行う(8-9)。線維芽細胞が異常に増殖している組織では ECM の集積や傷害によって漏出したフィブリン塊残留が認められている(14)。このような組織内の線維芽細胞がアポトーシス（細胞死）を起し、その線維だけが残った状態が線維化である。

線維化組織には ECM 成分集積やフィブリン塊の残留があることから、組織のプロテアーゼよりもインヒビターが優位であるとされている(15)。中でも PAI-1 の顕著な増加が指摘された(16)。最近になって、腎臓の線維化病変である慢性腎不全や皮膚の癒痕部位、肺線維症のような線維芽細胞の多い組織に PAI-1 の増加が認められている(17-19)。

## 脂肪細胞と血管内皮細胞との相互作用

肥満で肥大化した脂肪細胞からの PAI-1 分泌が増加している場合には、生活習慣病の発症に加え線維化病変が起りやすくなる可能性が高いと考えられる。そこで血管内皮細胞に脂肪細胞の培養上清を加えることによる血管内皮細胞の変化を測定した。

脂肪細胞に分化する Swiss albino マウス由来線維芽細胞 3T3-L1 細胞 (JCRB9014)およびヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC 細胞 (IF050271)を財団法人ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクより分株を受けた。3T3-L1 および HUVEC の培養は、それぞれダルベッコ変革イーグル培地(DMEM)および Ham's F12 培地 (Sigma Aldrich, St Louis, MO) に 10%牛胎児血清 (Tissue Culture Biologics, Tulare, CA)を添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 湿潤インキュベーターで行った。

脂肪細胞への分化は、confluent に至った 3T3-L1 細胞に 167 nM インスリン、0.5 μM イソブチルメチルキサンチン、1 μM デキサメタゾン (いずれも和光純薬,東京)を添加した培地で 48 時間培養して脂肪細胞へ分化させた(20)。その後 167 nM インスリンのみを添加した培地を 48 時間ごとに交換し分化状態を維持した。この操作による細胞数の変化は認められず、細胞内への脂肪貯蔵をオイルレッド (和光純薬)の取り込み増加により確認した (data not shown)。また脂肪細胞へ分化した 3T3-L1 細胞は、4 時間培養中に 42.794 ± 0.261 ng/ml の PAI-1 を培養上清に分泌していることを確認した。

上記の方法で脂肪細胞へ分化させた 3T3-L1 細胞に 0.3% ウシ血清アルブミン添加 Ham's F12 培地を加え、4 時間後に培養上清を回収した。3T3-L1 脂肪細胞の培養上清を 6-well プレート(Coster, Corning, NY)中で confluent に至った血管内皮細胞 HUVEC に添加しさらに 4 時間培養後、HUVEC 細胞の総 RNA を抽出した。

抽出総 RNA 1 μl 中の uPA、PAI-1 およびハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)遺伝子をそれぞれワンステップ RT-PCR キット(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)を用いて増幅した。得られた産物の 7 μl を 4%アガロース (和光純薬)ゲルで電気泳動後、臭化エチジウム (和光純薬)で染色した。電気泳動で分離した分画の密度を Scion Image (Frederick, MD)で解析し、それぞれの試料中の GAPDH を標準として uPA および PAI-1 mRNA 発現量を比較した。

脂肪細胞培養上清の添加は、未分化の脂肪細胞培養上清および 0.3% ウシ血清アルブミン添加 Ham's F12 培地添加群に比べて血管内皮細胞の uPA mRNA 発現が有意に増加した (図 3)。これは脂肪細胞培養上清中に脂肪細胞由来の PAI-1 が存在したため、PAI-1 活性を低下させるために uPA 産生が増加したと考えられた。

一方、未分化脂肪細胞培養上清添加群に比べて、脂肪細胞培養上清添加 HUVEC の PAI-1 mRNA 発現は有意に増加していたが、0.3% ウシ血清アルブミン添加 Ham's F12 培地添加群に比べ、脂肪細胞培養上清群の PAI-1 mRNA 発現には有意差はなかった。本来 HUVEC の PAI-1 産生量は、uPA 産生量に比べて約 100 倍高いことから(9)、培養上清採取用培地による培養と脂肪細胞培養上清添加群とでは PAI-1 mRNA 発現量に有意差は認められなかった

と考えられる。

しかし、未分化脂肪細胞培養上清添加によって HUVEC の PAI-1 mRNA 発現は有意に低下した。また、HUVEC の uPA mRNA 発現量も有意差はないものの未分化脂肪細胞培養上清添加によって低下傾向にあった。この結果は、未分化脂肪細胞は増殖が速く、培養上清採取のための4時間という短時間の培養であっても培地中の栄養素消費が多かったため、HUVEC 細胞に必要な栄養成分が不足していた可能性が考えられた。

おわりに

脂肪細胞は、血管内皮細胞の uPA および PAI-1 産生を増加させる生理活性物質を含むアディポサイトカインを分泌していた。この結果は、脂肪組織から分泌されたアディポサイトカインが血管を通過して全身に運ばれる間に、血管内で血管内皮細胞からの PAI-1 分泌を増加させると考えられる。肥満で炎症組織があった場合にはその修復を遅らせ、または修復ではなく線維化への変化を助長する可能性が示唆される。脂肪細胞が炎症などの生体反応にどのような影響を与えるかを推測するためには、脂肪細胞からのアディポサイトカインの詳細な分泌条件、炎症からの修復等に影響するアディポサイトカインの種類の特定、さらに血管内皮細胞以外の細胞とアディポサイトカインとの相互作用がどのような機序で影響を与えるのかを検討する必要がある。

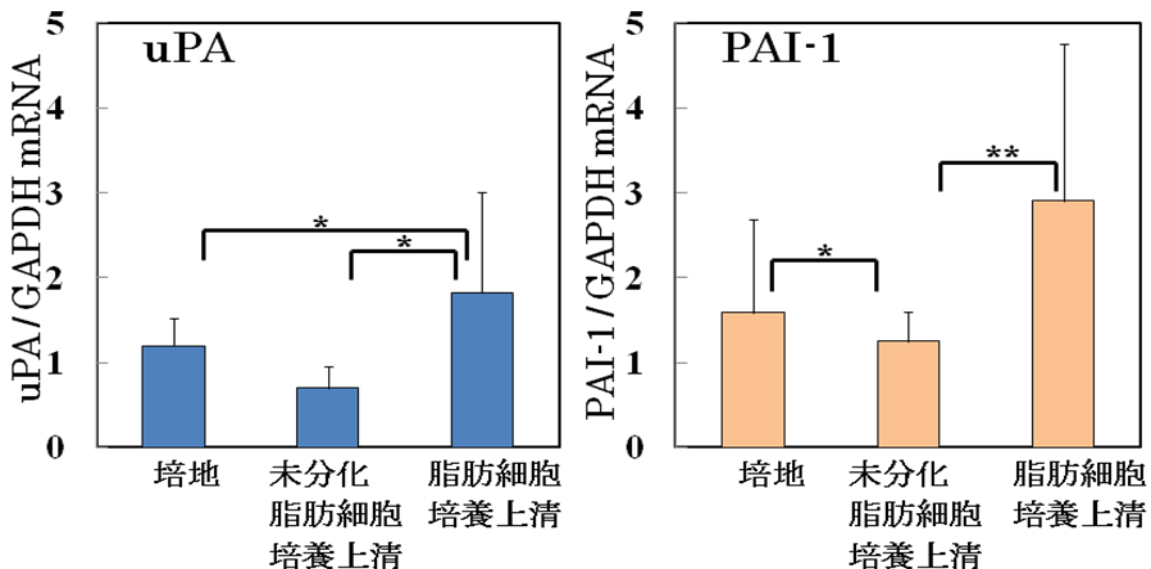


図3：『脂肪細胞と血管内皮細胞の相互作用』3T3-L1細胞を脂肪細胞へ分化させ、4時間培養上清を採取し、対照として未分化の3T3-L1細胞からも同様の方法で培養上清を採取した。この培養上清を confluent に至った血管内皮細胞、HUVEC細胞に添加して4時間後にHUVEC細胞の総RNAを抽出した。抽出した総RNA中のuPA、PAI-1およびGAPDH mRNAをRT-PCR法で増幅し、アガロースゲル電気泳動法でuPA、PAI-1およびGAPDH分画を分離した。染色後可視化した各分画を画像解析し、GAPDHを指標にuPAおよびPAI-1 mRNA発現量をそれぞれ比較した。

培地：0.3%ウシ血清アルブミン添加Ham's F12培地、n=6、\*：p<0.05、\*\*：p<0.01

### 参考文献

1. Matsuzawa Y. Adipocytokines and metabolic syndrome. *Semin Vasc Med.* 5: 34-39, 2005.
2. 厚生労働省. 「健康日本21」最終評価.

<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001r5gc-att/2r9852000001r5np.pdf>

3. Nishimura K, Soda T, Nakazawa S, Yamanaka K, Hirai T, Kishikawa H, Ichikawa Y. Serum adiponectin and leptin levels are useful markers for prostate cancer screening after adjustments for age, obesity-related factors, and prostate volume. *Minerva Urol Nefrol.* 64: 199-208, 2012.
4. Majumdar I, Mastrandrea LD. Serum sphingolipids and inflammatory mediators in adolescents at risk for metabolic syndrome. *Endocrine.* 41: 442-449, 2012.
5. Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR Jr, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem.* 276: 25651-25653, 2001.
6. Yiannikouris F, Gupte M, Putnam K, Thatcher S, Chamigo R, Rateri DL, Daugherty A, Cassis LA. Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice. *Hypertension.* 60:1524-1530, 2012.
7. Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 92: 386-395, 2007.
8. Morisako T, Takahashi K, Kishi K, Kiguchi T, Mikami R, Kobayashi K, Yagyu H, Nakamura H, Matsuoka T. Production of hepatocyte growth factor from human lung microvascular endothelial cells induced by interleukin-1 $\beta$ . *Exp. Lung Res.* 27: 675-688, 2001
9. 岸厚次、柳生久永、高橋君子、松岡 健. 肺線維芽細胞と細胞外基質 分子呼吸病 6: 296-301, 2002.
10. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* 70: 427-451, 1990.
11. Takahashi K, Uwabe Y, Sawasaki Y, Kiguchi T, Nakamura H, Kashiwabara K, Yagyu H, Matsuoka T. Increased secretion of urokinase-type plasminogen activator by human lung microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 275: L47-L54, 1998.
12. Kobayashi K, Takahashi K, Yagyu H, Kishi K, Nakamura H, Narushima K, Matsuoka T. Expression of urokinase-type plasminogen activator mRNA by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in human lung microvascular endothelial cells. *東京医科大学雑誌* 59: 462-469, 2001.
13. Naldini L, Vigna E, Bardelli A, et al: Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J. Biol. Chem.* 270: 603-611, 1995.
14. Kioi K, Takahashi K, Kishi K, Kobayashi K, Yagyu H, Nakamura H, Narushima K, Matsuoka T. Transforming growth factor-b1 up-regulates the c-met expression in human lung fibroblasts. *東京医科大学雑誌* 62: 261-272, 2004.
15. Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J Immunol.* 164: 6174-9, 2000.
16. Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit. Care Med.* 31: S213-S220, 2003.
17. Motojima M, Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF- $\kappa$ B and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int.* 63: 1671-1680, 2003.
18. Zhang Q, Wu Y, Chau CH, Ann DK, Bertolami CN, Le AD. Crosstalk of hypoxia-mediated signaling pathways in upregulating plasminogen activator inhibitor-1 expression in keloid fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 199: 89-97, 2004.
19. Hou B, Eren M, Painter CA, Covington JW, Dixon JD, Schoenhard JA, Vaughan DE. Tumor necrosis factor a activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor  $\kappa$ B site. *J. Biol. Chem.* 279: 18127-18136, 2004.

20. Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J.* 21:2185-2194, 2007.