

血管内皮細胞 PDK1シグナルの生理的役割の解明 ～血管内皮細胞特異的 PDK1欠損マウスを用いた検討

俵本 和仁

川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 種々の成長因子によって支配される細胞内の分子機構に phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) シグナル伝達系は広く関わると考えられている。本研究では血管内皮細胞特異的 PDK1欠損 (VEPDK1KO) マウスを作製し, そのフェノタイプを詳細に解析して, 血管内皮細胞における PDK1シグナルの生理的役割を検討した。その結果, 通常食飼育下24週齢の VEPDK1KO マウスでは非欠損コントロール群に比し, 耐糖能および全身のインスリン感受性増強を認めた。また血中アディポネクチン値上昇, 肝での糖新生系酵素活性の抑制を認め, 肝での糖産生の抑制が確認された。インスリン感受性亢進の機構の詳細解明のため生後4週齢から高脂肪食負荷をしたところ VEPDK1KO 群では12週齢で既にコントロール群に比し, 内臓脂肪量の減少, 白色脂肪細胞におけるアディポネクチン mRNA 量は増加, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, レプチン, tumor necrosis factor (TNF) - α の mRNA 量は低下を認めた。その結果, 肝での AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化がみられインスリン抵抗性の改善をもたらしたと考えられた。更に VEPDK1KO 群に認められた高脂肪食負荷による内臓肥満あるいは脂肪細胞肥大の抑制には, 脂肪組織における血管新生の抑制が関与する可能性が強く示唆された。本研究によって, 血管内皮細胞における PDK1シグナルが血管新生系調節による脂肪組織の形成に深く関与するとともに, ひいてはインスリン感受性や糖代謝にも影響を及ぼすことが明らかにされた。

(平成22年10月22日受理)

キーワード : 血管内皮細胞, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1),
インスリン感受性, 血管新生, 肥満, 脂肪組織

緒言

生体内の各種細胞における phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDK1) /Akt シグナルは細胞増殖, 代謝調節などに関わっていると考えられ, その活性化シグナル伝達機構は, インスリン作用を理解する上で重要である¹⁻³⁾。血管内皮細胞におけるインスリンシグナルは細胞増殖, 代謝調節以外に血管拡張, 血管収縮作用にも大きく関与

しており, endothelial NO synthase (eNOS) が主に寄与していると考えられている⁴⁻⁶⁾。Akt は血管内皮細胞 eNOS の1177位をリン酸化させ, nitric oxide (NO) を合成する⁷⁾。一方, インスリン以外にも, 血管内皮系の増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) も PI3K/PDK1/Akt シグナル活性化を介して, 血管内皮細胞の増殖, 機能調節に関わっている⁸⁾。

インスリンは細胞膜上のインスリン受容体

への結合、インスリン受容体基質蛋白 insulin receptor substrate (IRS) ファミリーや Shc などの内因性基質のチロシンリン酸化、その下流の PI3キナーゼ調節サブユニットにある SHドメインの活性化によって PI3K が活性化する。さらに PI3K シグナルによってセリンキナーゼである PDK1 がリン酸化され、活性化された PDK1 は、さらにその下流の Akt を 308 位セリン残基のリン酸化により活性化する。PDK1 は Akt 以外にも p70S6 キナーゼ、atypical PKC, Serum- and glucocorticoid-inducible kinases (SGK), p90Rsk などの蛋白キナーゼを活性化させ、各細胞内の糖取り込み、蛋白合成、グリコーゲン合成、細胞増殖を亢進させる。このように PDK1 はインスリンシグナルの中心的役割を担うと考えられている。

PDK1 完全欠損マウスは胎生期に中枢神経系の形成不全が起こり、完全致死であるため、Cre-loxP システムを用いて臓器特異的に PI3K/PDK1/Akt シグナルに関わる遺伝子を欠損させたマウスによる各臓器の PI3K/PDK1/Akt 経路の役割解明が試みられてきた。肝特異的 PDK1 欠損マウスは定常状態では高血糖を認めないものの、腹腔内グルコース負荷試験を行うと耐糖能障害を示し、肝における PDK1 が全身のインスリン作用に重要であることを明らかになった^{9, 10)}。心筋、骨格筋特異的 PDK1 欠損マウスでは心筋細胞サイズが縮小化し、心室壁が菲薄し、心不全が進行した¹¹⁾。膵β細胞特異的 PDK1 欠損マウス (β pdk1KO) では膵ランゲルハンス島面積が縮小し、膵β細胞サイズも縮小し、インスリン分泌不全が顕性化し、耐糖能障害が自然発症した¹²⁾。さらに forkhead transcription factor (FOXO) 1 を介して、膵β細胞増殖に関わる pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) や細胞分裂に関わる p27^{Kip1} にも影響を与えていた。これらの成績は、インスリンシグナル異常、すなわち PI3K/PDK1/Akt 経路の遮断が各臓器、各細胞の機能維持に悪影響を示し、肝機能、心機能、膵β細胞機能の低下をもたらす可能性があることを示唆している。

本研究では、血管内皮機能における PDK1 の役割を解明するために、Cre-loxP システムを用いて血管内皮細胞特異的に PDK1 遺伝子を欠損させたマウス (VEPDK1KO) を作製し、そのフェノタイプを詳細に解析し、血管新生系、脂肪組織の形成との関連、さらには耐糖能、インスリン感受性へ影響を検討した。

材料と方法

血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損マウスの作成

血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損マウスを作成するために、Cre-loxP システムを利用した¹³⁾。PDK1 遺伝子の exon 3, exon 4 の両端に loxP 配列を組み入れたトランスジェニックマウス (PDK1^{lox/lox})¹⁴⁾ と血管内皮細胞特異的遺伝子である Tie2 遺伝子をプロモーターとして Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを交配させ (Tie2Cre^{+/+})、誕生したヘテロ遺伝子改変マウス (PDK1^{lox/+}Tie2Cre^{+/+}) を再度交配し、誕生した PDK1^{lox/lox}Tie2Cre^{+/+} を血管内皮 PDK1 欠損マウスとし、PDK1^{lox/lox}Tie2Cre^{-/-} マウスをコントロール群とした。生後 4 週目に離乳前に尾組織一部から DNA を採取し、genotype を確認した。離乳後は通常飼育マウスにはオリエンタル酵母 (東京、日本) 通常食 (5% 脂肪, 30% タンパク質, 53% 炭水化物, 12% ビタミンおよび電解質) を、高脂肪食マウスにはオリエンタル酵母特別高脂肪食 (30% 脂肪, 33% タンパク質, 25% 炭水化物, 12% ビタミンおよび電解質) を自由摂食下で投与した。体重測定は毎週施行し、摂餌量測定は生後 21 週から 22 週までの期間測定した。マウスは通常食 3 か月, 6 か月齢, 高脂肪食 3 か月齢に以下の実験を施行し、組織採取を行った。本研究は川崎医科大学組み換え DNA 実験安全委員会 (05-04, 08-118) に認可を受け、実験動物は川崎医科大学医用生物センター使用規定に沿って飼育された。

肺血管内皮細胞の単離初代培養

生後 8 ~ 12 週齢マウスを頸椎脱臼法により

絶命させ、その後開胸し、肺内をヘパリン含有生理食塩水で還流し、肺組織を摘出、0.1%collagenase (Worthington Biochemical Co, Lakewood, NJ, USA) /Ham's F-12 medium (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA) 処理をし、140 μ m sieve を通過させ粗大な膠原繊維を除去した後、0.1%ゼラチンコートティッシュ上で血管内皮細胞培養液 (40% Ham's F-12培養液, 40% low-glucose DMEM, 20% foetal bovine serum, 50 μ g/ml kanamycin, 2mM L-glutamin, 50 μ g/ml endothelial mitoge, 100 μ g/ml heparin) 内で初代24時間培養した。その後、CD16/CD32 monoclonal 抗体接着 magnetic beads (Invitrogen) と CD102 monoclonal 抗体接着 beads を用いて血管内皮細胞を positive selection し、再度血管内皮細胞培養液を用いて培養、75% 程度 confluent となった状態でさらなる実験に用いた。

VEGF 刺激によるシグナル伝達を検証する実験では、採取した肺血管内皮細胞を16時間 FBS 非添加 low-glucose DMEM に培養後、VEGF (50ng/ml) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 10分間刺激を行い、その後氷上でシグナル伝達を遮断した後、lysis buffer (20 mM Tris/HCl, pH7.4, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 10 mM Na₄P₂O₇, 100 mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml leupeptin) を用いてその細胞可溶性成分を抽出し、-80°Cで凍結保存した。

血圧測定, 生化学パラメータの解析

血圧測定は非麻酔下で tail-cuff 血圧測定器 (Muromachi Kikai Co, 東京, 日本) を用いて測定した。血液検体は空腹時 (マウスを一晩絶食下) および非空腹時で非麻酔下尾静脈から採取し、15000 rpm, 10分間, 4°Cで血清成分を遠心分離し、-80°Cで凍結保存した。血清インスリン (Morinaga, 東京, 日本), 遊離脂肪酸, 中性脂肪 (Wako, 大阪, 日本) は ELISA キットを用いて計測し、血中一酸化窒素代謝物 (Eicom, 京都, 日本), アディポネクチン (Otsuka Pharmaceutical Co Ltd, 東京, 日本), レプチン

(Ray Biotech Inc, Norcross, GA, USA) MCP-1 (R&D systems), VEGF (R&D systems) もアッセイキットを用いて計測した。

グルコース負荷試験とインスリン負荷試験

グルコース負荷試験は一晩絶食下マウスの腹腔内にグルコース (1g D-glucose/ kg body weight) を注射し、各時間帯における全血血糖値をフリースタイルセンサー (Kissei Pharmaceutical Co. LTD., 東京, 日本) を用いて計測した。インスリン負荷試験はマウスを5時間絶食させた、腹腔内にレギュラーインスリン (1U/kg body weight) を投与し、全血血糖値は同様にフリースタイルセンサーを用いて計測した。

正常血糖高インスリンクランプ実験

正常血糖高インスリンクランプ実験施行1週間前にイソフルレン (Abbot) 麻酔下で右頸静脈からカテーテルを挿入。実験前日から一晩絶食下したマウスに120分間の正常血糖高インスリンクランプ実験を既報¹⁵⁾と同内容で施行した。概略を示すが、microdialysis pump (CMA/Microdialysis, Solna, Sweden) を用いてヒトレギュラーインスリン (15pmol/kg/min) と40%グルコース溶液 (血糖値を110mg/dl 程度に維持するよう量を調節) を持続静脈内投与し、注入量が安定したところで、[3-³H]グルコース (10 μ Ci bolus, followed by 0.1 μ Ci/min; GE Healthcare Bio-sciences Co., Buckinghamshire, UK) を投与してグルコース注入量 (Glucose Infusion Rate; GIR) を計測した。各組織におけるグルコース取り込み量を検討するため、試験開始後120分時に2-deoxy-D-[1-¹⁴C] glucose (GE Healthcare Bio-sciences Co.) を10 μ Ci ボーラス投与し、試験終了後、マウスをペントバルビタール過剰投与で絶命させ、各組織を採取し、液体窒素を用いて急速凍結し、-80°Cで凍結保存した。凍結保存した組織をホモジナイズし、組織中¹⁴C から組織中糖取り込み量を計測した。

Western blotting

採取された組織を lysis buffer とともにホモジナイズし、可溶性細胞成分を抽出した。蛋白量 10-30 μ g 相当の抽出液を 200V、45分で電気泳動し、その後 100V、1時間 アクリルゲルから PVDF メンブレンに転写させた。その後、5% non-fat milk もしくは 5% BSA にて 1時間 ブロッキングし、各種一次抗体で 4℃、一晚 blot し、翌日対応した二次抗体液に反応させた。ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-sciences Co.) で反応させ、Chemiluminescence にて撮影した。一次抗体は以下のもの各社から購入し使用した。抗 PDK1 抗体 (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany)、抗 Akt 抗体、抗 Ser473リン酸化 Akt 抗体、抗 Thr308Akt 抗体、抗リン酸化 S6キナーゼ抗体、抗 S6キナーゼ抗体、抗リン酸化 eNOS 抗体、抗 eNOS 抗体、抗リン酸化 ERK1/2抗体、抗 ERK1/2抗体 (Cell Signaling, Boston, MA, USA)

組織学的評価

傍精巣脂肪組織を採取し、IHC Zinc 固定液を用い 24時間室温下で固定。その後、パラフィン包埋し、4 μ m 切片を作成した。脂肪細胞面積はヘマトキシリン・エオジン染色切片を用いて 1 個体 400 個以上計測し Image J[®] (National Institutes of Health) にて平均脂肪細胞面積を算出した。CD34抗体 (Nichirei Biosciences Inc, 東京, 日本) 免疫染色組織像も同様にパラフィン包埋した切片を用い、強拡大視野 ($\times 400$) 5 視野における CD34陽性毛細血管数を算出し、脂肪細胞数で除し、その比を算出した。

内臓脂肪面積の測定

小動物用 CT 撮影装置 (LaTheta[®], Aloka, 東京, 日本) を用いた第 5 腰椎レベルにおける腹部断面像から皮下脂肪面積、内臓脂肪面積、総脂肪面積を計測した。

リアルタイム RT-PCR 法

各組織の Total RNA は SV total mRNA isolation

system (Promega, Fitchburg, WI, USA) を用いて採取し、2 μ g 量の mRNA を TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, foster city, CA, USA) にて逆転写反応させ、cDNA を作成した。リアルタイム RT-PCR は 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて施行、内部コントロールとして 36B4 mRNA を使用した。使用したプライマーの塩基配列を下記に示す。

mouse 36B4,

5' -TTCCAGCTTTGGGCATCA-3' (sense),

5' -ATGTTTCAGCATGTTTCAGCAGTGTG-3' (antisense) ;

mouse phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK),

5' -GCATAACTAACCCCGAAGGCAAG-3' (sense),

5' -CATCCAGGCAATGTCATCGC-3' (antisense),

mouse glucose-6-phosphatase (G6Pase)

5' -CAGAATGGGTCCACCTTGACAC-3' (sense),

5' -AGCGGAATGGGAGCAACTTG-3' (antisense) ;

mouse adiponectin

5' -CGGCAGCACTGGCAAGTT-3' (sense),

5' -CCGTGATGTGGTAAGAGAAGTAGTAGA-3' (antisense) ;

mouse leptin:

5' -AACCTCATCAAGACCATTGTCA-3' (sense),

5' -CCTCTGCTTGCGGATACC-3' (antisense) ;

mouse MCP-1:

5' -CTTCCTCCACCACCATGCA-3' (sense),

5' -CCAGCCGCAACTGTGA-3' (antisense) ;

mouse TNF- α :

5' -CACAAAGATGCTGGGACAGTGA-3' (sense),

5' -TCCTTGATGGTGGTGCATGA-3' (antisense) ;

mouse platelet / endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1) :

5' -CTGGGAGGTCGTCCATGT-3' (sense),
5' -CACAGGACTCTCGCAATC-3' (antisense) ;

mouse vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1):

5' -CCCCAAGGATCCAGAGATTCA-3' (sense),
5' -ACTTGACTGTGACCGGCTT-3' (antisense).

mouse sterol regulatory element binding protein (SREBP) 1c:

5' -GAGCCATGGATTGCACATTT-3' (sense),
5' -CACGGACGGGTACATCT-3' (antisense).

統計学的手法

全データは平均±標準誤差で表記し、二群間の比較はマンホイットニーのU検定、分散分析を用いて統計学的有意差を算出した。

結果

血管内皮細胞特異的 PDK1 遺伝子欠損の確認

VEPDK1KO およびコントロールマウスの肺組織から得た血管内皮細胞の初代培養細胞 (MLECs) における PDK1 蛋白の発現を検討した。その結果、PDK1KO マウスでは PDK1 蛋白の発現は、約90%低下していた。一方、筋肉、肝臓、脂肪組織などその他の組織における PDK1 蛋白発現量は、非欠損マウスと同等であり、VEPDK1KO マウスは血管内皮細胞特異的 PDK1 遺伝子欠損を有していることが確認された (図1)。

血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損が VEGF シグナル伝達に及ぼす影響

PI3K/PDK1/Akt および mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介して血管内皮細胞の増殖や透過性の関与する VEGF のシグナル伝達を検証するため MLECs を用いて PDK1 シグナルの下流に位置する Akt のリン酸化反応を検討した。その結果、PDK1KO マウスでは VEGF 刺激下において、PDK1 依存性である

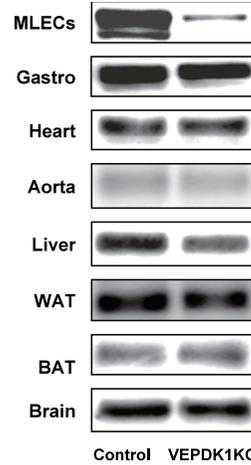


図1 血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損 (VEPDK1KO) マウスとコントロールマウスから得た各臓器中の PDK1 蛋白発現。MLECs: 肺組織から得た血管内皮細胞, Gastro: 腓腹筋, WAT: 白色脂肪組織, BAT: 褐色脂肪組織

Akt の Thr308リン酸化は認められず、PDK1非依存性の Ser473リン酸化のみを認めた。一方、コントロールマウスでは両部位ともリン酸化が認められた。さらに S6K の Thr389リン酸化も PDK1KO マウスでは認められなかったが、eNOS はリン酸化されていた。両群マウスの Akt, S6K, eNOS 蛋白量に差はなかった。以上より血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損では PI3K/PDK1/Akt シグナル伝達障害を認めるが、Ras/ERK 系シグナルは影響を受けないことが確認された。

血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損による代謝への影響

VEPDK1KO マウスの出生率はメンデルの法則に従っており、各臓器の組織像はコントロール群と明らかな差を認めなかった。通常食飼育下での12週齢、24週齢で比較した VEPDK1KO 群の体重と血圧は非欠損コントロール群と差はみられず、生存率も12ヶ月までの観察では両群間で同等であった。同様に血圧、血糖値、血中遊離脂肪酸 (FFA) や総コレステロール値にも両群間に有意差を認めなかった (表)。血中インスリン値とトリグリセリド (TG) 値は12週

表 通常食 12 週齢, 24 週齢における VEPDK1KO の体重, 血圧, 血液生化学パラメータ (食後採血)

	12 週齢		24 週齢	
	コントロール	VEPDK1KO	コントロール	VEPDK1KO
体重 (g)	26.2 ± 0.9	26.6 ± 0.7	32.9 ± 1.2	32.7 ± 0.4
心拍数 (bpm)	643 ± 22	662 ± 31	702 ± 34	637 ± 75
収縮期血圧 (mmHg)	122 ± 2	122 ± 9	131 ± 9	136 ± 14
拡張期血圧 (mmHg)	72 ± 2	72 ± 7	82 ± 9	91 ± 7
血糖値 (mg/dl)	130 ± 8	125 ± 5	145 ± 8	137 ± 12
インスリン値 (ng/ml)	0.43 ± 0.08	0.35 ± 0.03	1.31 ± 0.19	0.82 ± 0.24*
遊離脂肪酸値 (mEq/L)	0.22 ± 0.05	0.28 ± 0.06	0.93 ± 0.08	0.95 ± 0.06
中性脂肪値 (mg/dl)	83 ± 5	77 ± 3	140 ± 22	90 ± 6*
総コレステロール値 (mg/dl)	99 ± 5	95 ± 3	110 ± 5	113 ± 4
NO 代謝産物値 (μM)	113 ± 17	100 ± 7	54 ± 13	49 ± 6

(平均 ± SEM, n=8-10, *:p<0.05)

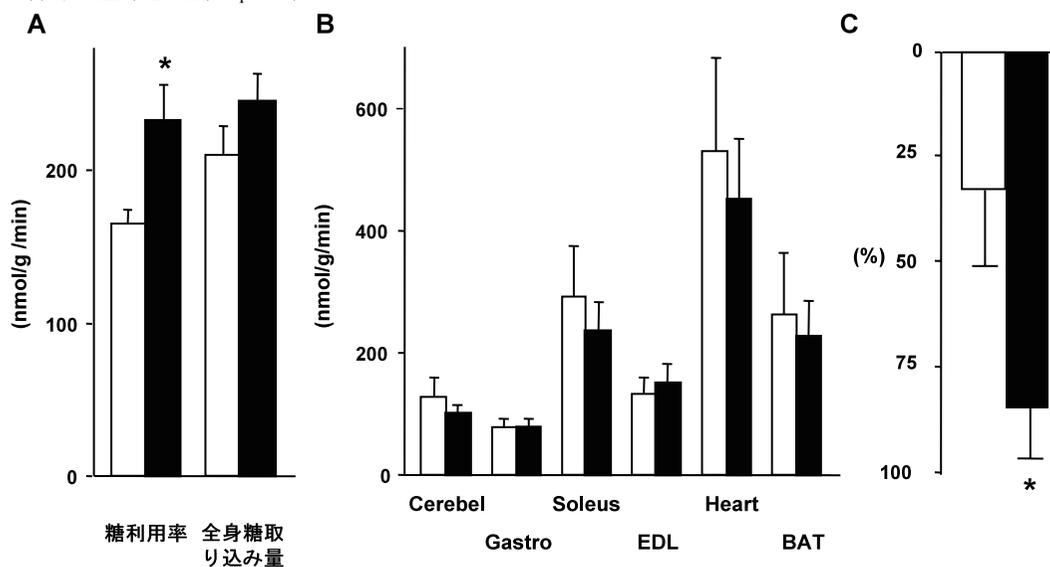


図2 正常血糖高インスリンクランプ実験での糖利用率 (GIR), 2-deoxy-D-[1-¹⁴C] グルコースでみた全身の糖取り込み, 肝からの糖放出抑制率の比較. A: 糖利用率, B: 全身の糖取り込み, C: 肝からの糖放出抑制率. コントロール群: open bar, VEPDK1KO 群: black bar, Cerebel: 脳, Gastro: 腓腹筋, Soleus: ヒラメ筋, EDL: 長指伸筋, BAT: 褐色脂肪組織

齢では両群で差はなかったが, 24週齢ではコントロールマウスに比し, コントロールマウスでそれぞれ37%と36%の低下を認めた (いずれも $p < 0.05$). 血中の NOx 量は両群間で有意差を認めなかった. 全身の耐糖能をグルコース負荷試験により検討した結果, 12週齢では対照群と同等であったが, 24週齢では, VEPDK1KO 群で負荷後60分以内の血糖値は有意に低く, 耐糖能の亢進がみられた. またインスリン負荷試験 (12週齢0.8U/kg, 24週齢0.95U/kg インスリン腹腔内投与) によるインスリン感受性をみたところ, 24週齢の VEPDK1KO 群で有意に亢進していた. さらに高脂肪食を両マウスに離乳直後

から与え, 人為的な肥満状態にし, 同様に耐糖能についての検討を行ったところ, 12週齢から VEPDK1KO のインスリン感受性は亢進していた.

24週齢の VEPDK1KO 群で耐糖能およびインスリン感受性の亢進を認めたことから, 同週齢マウスで, 2-deoxy-D-[1-¹⁴C] グルコースを用いた正常血糖-高インスリンクランプ法による体内グルコース代謝の解析を行った. その結果, VEPDK1KO 群ではコントロール群に比し, 全身の糖取り込み量 (図2A), 各組織での糖取り込み量 (図2B) の総量はわからないものの, グルコース注入率 (GIR) でみた糖代謝は

亢進していた (図 2 A)。また高インスリンクランプ時の肝糖放出量は有意に抑制されていた (図 2 C)。また PEPCK と G6Pase の mRNA 発現量は、VEPDK1KO 群でコントロール群に比し、それぞれ37%と32%低下していた。また SREBP1c の mRNA 量も VEPDK1KO 群で有意な低下がみられた。

高脂肪食負荷による VEPDK1KO マウスのインスリン感受性への影響

24週齢の VEPDK1KO マウスでインスリン感受性亢進を認めたことから、その機構の詳細説明のため生後 4 週齢から高脂肪食負荷をしたマウスを用いて、同様のフェノタイプ解析を行った。両群マウスの体重を比較したところ、VEPDK1KO は高脂肪食負荷開始 2 週目以降から徐々に体重増加が抑制され、24 週齢では対照に比し、約16%の体重増加抑制を認めた (図 3 A)。両群マウス間で摂餌量には有意差はなかった。直腸温には両群間で有意差はなかったが、indirect calorimetry で測定した酸素消費量は VEPDK1KO 群で有意に増加しており、特に夜間の活動期により顕著であった (12 週齢：54.7±1.5 ml/min/kg VEPDK1KO 群 vs 49.2±0.6 ml/min/kg コントロール群、各群 n=4, P<0.05)。インスリン負荷試験 (1.2 U/kg インスリン負荷) により、12 週齢の VEPDK1KO マウスで有意な全身のインスリン感受性亢進を認める (図 3 B)

とともに、インスリンによる肝臓での Akt のセリンリン酸化の亢進を認めた。さらに AMP-activated protein kinase (AMPK) および acetyl CoA carboxylase (ACC) のリン酸化がコントロール群に比し、それぞれ3.7倍、11.2倍と顕著に亢進していた。

VEPDK1KO マウスの低体重およびインスリン感受性亢進と脂肪細胞の関係

VEPDK1KO マウスの低体重およびインスリン感受性亢進をもたらす機序を明らかにするため、まず通常食下での24週齢および高脂肪食下での12週齢の両群マウスにおける各臓器重量を体重に対する比率で解析したところ、筋肉や肝臓などの主要臓器重量比に差はないものの、白色脂肪組織において両群間に有意差を認めた (VEPDK1KO 1.31±0.15 % vs コントロール 1.79±0.02 %、各群 n=8, P<0.05、高脂肪食下での12週齢)。小動物用 CT 装置を用いて腹部 CT 画像を撮影し内臓脂肪面積、総脂肪面積を算出したところ、総脂肪面積には差がなかったものの、内臓脂肪面積のみ有意に低下していた (総脂肪：VEPDK1KO 3.2±0.1 cm² vs コントロール 3.8±0.1 cm²、内臓脂肪：VEPDK1KO 1.8±0.1 cm² vs コントロール 2.2±0.2 cm²、各群 n=8, P<0.05)。また脂肪細胞サイズは VEPDK1KO 群でコントロール群に比し、有意に小さいこと (VEPDK1KO 4544±214 μm² vs コントロール

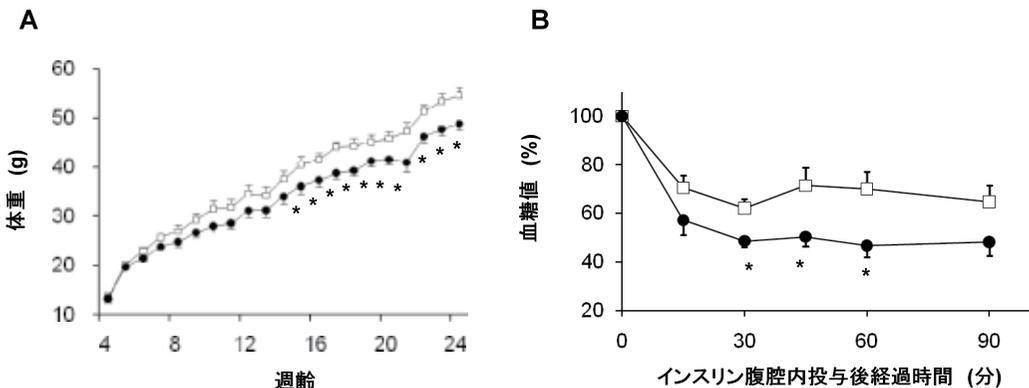


図 3 高脂肪食負荷によるマウス体重の変化と 12 週齢でのインスリン感受性の比較。
A：体重の変化，B：12 週齢での腹腔内インスリン負荷試験 (1.2U/kg)。各群 n=8，*：p<0.05。コントロール群：□，VEPDK1KO 群：○

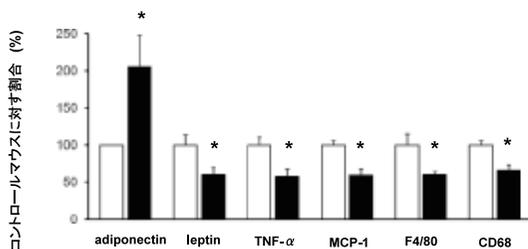


図4 高脂肪食負荷(12週齢)マウスの内臓脂肪組織における各種アディポカイン mRNA 量の比較. コントロール群: open bar, VEPDK1KO 群: black bar.

6469 \pm 213 μ m², 各群 n=10, P<0.05, 高脂肪食下での12週齢)が明らかになり, このことが内臓脂肪量の減少をもたらしたものと思われた.

脂肪細胞によるアディポカインの発現と分泌

VEPDK1KO マウスにおいて脂肪細胞サイズの縮小によると思われる内臓脂肪量の減少を認めたことから, アディポカインの解析を行った. 高脂肪食負荷12週齢マウスの白色脂肪細胞中のアディポネクチン, レプチン, TNF- α , MCP-1遺伝子発現をみたところ, VEPDK1KO 群においてアディポネクチン mRNA の増加がみられ, その他の mRNA 発現はコントロール群に比し, 有意に低下していた. さらに炎症機転のマーカーである CD68および F4/80 の mRNA は VEPDK1KO 群において有意に増加していた(図4). アディポカインの血中濃度をみると, VEPDK1KO 群においてアディポネクチン値の上昇をみた(VEPDK1KO 群10.2 \pm 1.8 μ g/ml vs. コントロール群8.2 \pm 0.7 μ g/ml, 各群 n=7, P<0.05). また血中 VEGF 濃度は VEPDK1KO 群でコントロール群に比し, 明らかに低値であった(VEPDK1KO 群40.0 \pm 1.3 pg/ml vs. コントロール群48.7 \pm 5.6 pg/ml, 各群 n=8, P<0.05).

VEPDK1KO による脂肪組織の血管新生への影響

血管内皮細胞 PDK1欠損が内臓脂肪組織の肥大を抑制する機序を解明するため, VEPDK1KO マウスの脂肪組織における血管新生能を検討した. 血管新生能を評価するため,

高脂肪食負荷12週齢マウスの内臓脂肪内の血管数を脂肪細胞数に対する CD34陽性血管内皮細胞数比率で求めた. その結果, CD34陽性血管内皮細胞数比率は VEPDK1KO 群でコントロール群に比し, 有意に低下しており, 血管新生能の低下が示唆された(VEPDK1KO 群0.682 \pm 0.016 μ m² vs. コントロール群0.983 \pm 0.011, 各群 n=8-10, P<0.05). 血管内皮細胞は VEGF を産生し, その VEGF は血管内皮細胞の VEGF 受容体と結合し, PI3K/PDK1/Akt 経路を介して血管新生を刺激すると考えられる. そのため VEPDK1KO マウスの肺から単離, 培養した血管内皮細胞を用いてシグナル伝達を検討した結果, 308位 Akt リン酸化が抑制されていた.

考察

本研究は血管内皮細胞特異的 PDK1欠損によってインスリン感受性亢進を介する肝臓からの糖放出の抑制, 耐糖能の亢進が惹起されることを明らかにした. その機序として VEGF のシグナル伝達障害による血管新生の減少と, それによる内臓脂肪蓄積の抑制が考えられた. 内臓脂肪量の減少は個々の脂肪細胞の小型化によるものであり, そのことがアディポネクチン増加, インスリン感受性低下に働くレプチン, MCP-1, TNF- α の発現, 分泌の低下を介するインスリン感受性亢進をもたらしたものと考えられた. 当初は, eNOS 活性が抑制による血圧上昇が想定されたが, 本研究結果では PDK1KO マウスの eNOS のリン酸化は抑制されず, さらに血中 NOx 濃度変化もなく, 血圧への有意な影響は認めなかった. eNOS 欠損マウスでは血圧上昇がみられる^{16,17)}ものの, Akt トランスジェニックマウスに NOS 抑制薬を用いても血圧には影響しなかったとの報告¹⁸⁾もあり, PDK1/Akt 経路による血圧調節機構は endothelin-1 との関連を含めて今後更なる解明を要するものと思われる.

VEPDK1KO マウスでは摂餌量がコントロールマウスと同等にも関わらず, 体重増加の抑制がみられた. アディポネクチン過剰発現させた

マウスを高脂肪食負荷した場合、コントロールに比し、摂餌量が同じでも体重増加が抑制されるとの報告がある¹⁹⁾。このマウスでは酸素消費量が増大していることも明らかにされている。酸素消費量増大に加えて、アディポネクチン増加を認める VEPDK1KO マウスにおいても同様のメカニズムが働いている可能性が示唆された。しかしながら、アディポカイン調節機構、摂餌量、エネルギー消費の関連性については、今後更なる詳細解明が必要である。

アディポネクチンによる筋肉や肝臓でのインスリン感受性増強作用および作用機構については、詳細な解明が進んでいる²⁰⁻²⁴⁾。Yamauchiらはアディポネクチン受容体 AdipoR1と AdipoR2を同定し、それらの機能解析を行った²⁵⁻²⁷⁾。その結果、AdipoR1は主に AMPK 活性化抑制を介して、肝臓での糖新生系を抑制するとともに、SREBP1c 活性化抑制による脂肪酸化の亢進に働くこと、AdipoR2は peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α の活性化にはたらくことを明らかにした。本研究において肝糖放出抑制を認めたと、その機構としてアディポネクチン増加による AMPK 活性化とそれに基づく PEPCCK, G6Pase, SREBP1c 発現低下が寄与するものと考えられた。

一方、血管内皮細胞における PI3K/PDK1/Akt 経路は血管新生と血管の形成に関与すると言われている。血管内皮の Akt トランスジェニックマウスでは NO 産生が亢進し、血管内皮細胞のアポトーシスが抑制されること、血管内皮細胞における PI3K シグナルに対する特異的 negative regulator である phosphatase and tensin homolog (PTEN) のヘテロ欠損マウスでは血管新生が有意に減少する等の報告がある^{8, 19)}。血管内皮細胞特異的 PDK1欠損動物を用いた本研究でも同様の結果が得られたことは、PI3K/PDK1/Akt シグナルが血管新生系の重要な調節経路であることを明確に示唆するものである。また脂肪組織の形成と血管新生系の関連についてもこれまでに報告がみられる^{28, 29)}。脂肪細胞集団におけるマクロファージ（おそらく脂肪細

胞の前駆細胞？）や微小血管の共存は脂肪細胞の分化・増殖に不可欠なものであり、さらに VEGF, VEGF 受容体, matrix metalloproteinase といった血管新生の関連因子の発現、活性化が重要と考えられている。本研究結果も過去の報告内容にほぼ一致しており、脂肪組織の形成と血管新生は互いに強く関連し合うことをより明確に示したものと見える。

本研究において、血管内皮細胞特異的 PDK1 欠損モデルマウス作製し、そのフェノタイプを詳細に解析した。PDK1シグナル欠損は血管新生系を抑制による脂肪組織の形成抑制（脂肪細胞の小型化）を惹起した。その結果、アディポネクチン増加をはじめとするアディポカイン発現調節がみられ、インスリン感受性亢進、さらには耐糖能の亢進をもたらした。組織内の血流やそれを構成する血管は、動脈硬化性疾患の形成・進展のみならず全身の細胞や臓器の成長、維持という観点から重要なファクターである。また脂肪組織は肥大、縮小を繰り返す組織であり、他臓器と比べて、極めてユニークな存在である。生活習慣病と内臓肥満の関係が明らかにされた今、脂肪組織の血管新生を制御する機構の詳細解明と、その機構を分子ターゲットとした創薬や遺伝子治療の分野の進展に果たす役割は大きく、今後の生活習慣病治療に広く貢献するものと大いに期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の立案から論文作成までご指導いただいた川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学教授の加来浩平先生に、また実験遂行にあたり、ご助力いただいた同教員並びに研究補助員の皆様に深謝申し上げます。更に遺伝子改変動物作成にあたり、ご助力いただいた神戸大学大学院教授の春日雅人先生（現国際医療センター生活習慣病研究センター長）にも心より御礼申し上げます。

尚、この研究は日本学術振興会科学研究費補助金（課題番号：21591153）および川崎医科大学プロジェクト研究費（課題番号：21-501, 22- A53）から助成を受けた研究である。

引用文献

- 1) Kasuga M: Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *J Clin Invest* 116:1756-1760, 2007
- 2) Manning BD: Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol* 167: 399-403, 2004
- 3) Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ: Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction : molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113:1888-1904, 2006
- 4) Zeng G, Nystrom F H, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ: Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 101:1539-1545, 2000
- 5) Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL: Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101:676-681, 2000
- 6) Harmann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S: Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:402-409, 2000
- 7) Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M: Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H813-H822, 2005
- 8) Hamada K, Sasaki T, Koni PA, *et al.* : A. The PTEN/P13 K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis. *Genes Dev* 19 : 2054-2065, 2005
- 9) Mora A, Lipina C, Tronche F, Sutherland C, Alessi DR: Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure. *Biochem J* 385:639-648, 2005
- 10) Okamoto Y, Ogawa W, Nishizawa A, *et al.* : Restoration of glucokinase expression in the liver normalizes postprandial glucose disposal in mice with hepatic deficiency of PDK1. *Diabetes* 56:1000-1009, 2007
- 11) Mora A, Davies AM, Bertrand L, *et al.* : Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia. *EMBO J* 22:4666-4676, 2003
- 12) Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, *et al.* : Ablation of PDK1 in pancreatic beta cells induces diabetes as a result of loss of beta cell mass. *Nat Genet* 38:589-593, 2006
- 13) Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M: Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230:230-242, 2001
- 14) Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, *et al.* : Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab* 3:267-275, 2006
- 15) Kim JK, Zisman A, Fillmore JJ, *et al.* : Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J Clin Invest* 108:153-160, 2001
- 16) Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch K, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-242, 1995
- 17) Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege J H, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O : Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13176-13181, 1996
- 18) Mukai Y, Rikitake Y, Shiojima I, *et al.* : Decreased vascular lesion formation in mice with inducible endothelial-specific expression of protein kinase Akt. *J Clin Invest* 116: 334-343, 2006
- 19) Otabe S, Yuan X, Fukutani T, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Hirota N, Kojuma M, Yamada K: Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E210-E218, 2007
- 20) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, *et al.* : The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946, 2001
- 21) Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7:947-953, 2001
- 22) Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF: Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte

- complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010, 2001
- 23) Maeda N, Shimomura I, Kishida K, *et al.* : Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731-737, 2002
- 24) Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, *et al.* : Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277:25863-25866, 2002
- 25) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, *et al.* : Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769, 2003
- 26) Yamauchi T, Nio Y, Maki T, *et al.* : Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13:332-339, 2007
- 27) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, *et al.* : Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and Apo-E deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278:2461-2468, 2003
- 28) Cho CH, Koh YJ, Han J, *et al.* : Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res* 100:45-57, 2007
- 29) Nishimura S, Manabe I, Magasaki M, *et al.* : Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56:1517-1526, 2007

The physiological role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in vascular endothelial cells ~ Investigation by using vascular endothelial cell-specific PDK1 knockout mice

Kazuhito TAWARAMOTO

*Division of Diabetes, Endocrinology, and Metabolism, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

ABSTRACT The phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) signaling pathway is involved in a broad range of cellular processes governed by growth factors. This study investigated the physiological role of PDK1 in vascular endothelial cells by generating tissue-specific knockout mice that lacked PDK1 in their vascular endothelial cells (VEPDK1KO). The VEPDK1KO mice at 24 weeks of age fed the standard diet manifested enhanced glucose tolerance and whole-body insulin sensitivity due to the suppression of hepatic glucose production. Circulating adiponectin levels were higher and the activities of hepatic gluconeogenic enzymes were lower in the VEPDK1KO mice than in the control mice. When the VEPDK1KO and the control mice were fed a high-fat diet, adiponectin mRNA abundance was readily higher and MCP1, leptin and TNF α mRNA levels were lower in white adipose tissue of the VEPDK1KO compared with the control mice at 12 weeks of age. As a result, hepatic AMP-activated protein kinase (AMPK) was significantly activated, subsequently enhancing whole-body insulin sensitivity in the VEPDK1KO mice. High-fat-diet-induced obesity and adipocyte hypertrophy were attenuated in the VEPDK1KO mice, due to the suppression of angiogenesis in the white adipose tissue, in association with a reduction in the visceral fat area. These results suggest that angiogenesis and adipogenesis are closely related and that PDK1 signaling

in endothelial cells plays an important role in maintaining proper glucose homeostasis, primarily through regulation of adipocyte development.

(Accepted on October 22, 2010)

Key words : Vascular endothelial cells, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), Angiogenesis, Insulin sensitivity, Obesity, Adipose tissue

Corresponding author
Kazuhiro Tawaramoto
Division of Diabetes, Endocrinology, and Metabolism,
Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki,
701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111
Fax : 81 86 464 1046
E-mail : tawara@kawasaki-m.ac.jp