

学位論文題名

げっ歯類の褐色脂肪組織での血管内皮細胞増殖因子  
(VEGF) ファミリー発現の交感神経性調節

学位論文内容の要旨

動物を長期間寒冷暴露すると、BATでは交感神経の活性化と共に組織増生が起こり熱産生能が増大する。このようなBATの増生に伴い血管新生が起こるが、この血管新生のメカニズムは不明であった。本研究では血管新生因子の一つであるVEGFファミリー（VEGF、VEGF-B、VEGF-C）に着目し、VEGFファミリーのBATにおける血管新生への関与を明らかにするため、ラットとマウスを用いてBAT及び褐色脂肪細胞でのVEGFファミリーの発現調節機構について調べた。

ラットの成熟個体のBATにおいて、VEGF-C mRNAは検出できなかったが、VEGFとVEGF-Bは大量に発現していた。この定常的なVEGFとVEGF-Bの発現はBATの血管構造の形成や維持に必要な因子であることが推察された。ラットに寒冷刺激を加えると、BATのVEGF mRNAレベルは早期に一過性の上昇が起こったが、VEGF-Bは全く変化しなかった。また他の組織のVEGF及びVEGF-B mRNAレベルは寒冷暴露の影響を受けなかった。従って、VEGFは、BATの増生に伴って組織特異的に発現量が増加し、血管新生に重要な役割を果たす可能性が示された。また、VEGF mRNAレベルに対する寒冷暴露の影響は、BATに分布する交感神経枝を外科的に切除することによって完全に消失し、ノルアドレナリンやCL316,243といったアドレナリン作動薬を投与することによって寒冷暴露と同等の効果が得られた。これらの結果から、寒冷暴露によるVEGF遺伝子の発現誘導は交感神経によって直接調節されていると結論した。さらに、 $\beta$ 3受容体作動薬によってもVEGF mRNA誘導がみられたことから、VEGFは褐色脂肪細胞でおもに産生され、 $\beta$ 作用によって発現が調節されていることが推定された。また、VEGFのアイソフォームのうち、ヘパリン結合能を欠くVEGF120 mRNAの発現の割合が寒冷暴露時に

高くなっていた。つまり、BATの増生時には、周囲の血管内皮細胞に到達しやすい VEGF120がより多く産生され、効率よく血管新生を促進していることが示唆された。

がん抑制遺伝子p53を欠失させたマウスより、不死化褐色脂肪細胞株を樹立し、HB2細胞と名付けた。HB2細胞は褐色脂肪細胞の分化マーカーであるUCP1やaP2のmRNAを発現しており、褐色脂肪細胞としての性質を有すると結論した。次にこの細胞を用いて VEGFファミリーの発現調節機構について検討した。VEGF mRNAは分化前のHB2細胞よりも分化して脂肪を蓄積した細胞の方が発現レベルが高かった。また、分化前の細胞ではノルアドレナリンやcAMP誘導体刺激でVEGFの発現が亢進したが、分化した細胞については効果がみられなかった。これらの結果より、少なくとも前駆褐色脂肪細胞においてはアドレナリンの $\beta$ 作用によりVEGF mRNAの発現が調節されていると結論した。一方、VEGFはフォルボールエステルや $Ca^{2+}$ イオノフォアの刺激によっても誘導された。従って、アドレナリン $\alpha$ 1受容体を介した調節機構や他の細胞増殖因子による調節機構の存在も予想された。VEGF-B mRNAの発現は、HB2細胞の分化状態に影響されず、交感神経性刺激や種々の細胞内シグナル伝達経路の活性化による影響もみられなかった。つまり、褐色脂肪細胞ではVEGF-Bが安定して発現していると考えた。VEGF-C mRNAは成熟個体組織では検出できなかったが、HB2細胞においては検出可能であり、血清により発現が誘導されたと考えられた。また、ノルアドレナリン、cAMP誘導体及びトログリタゾンの刺激によってVEGF-Cの発現が低下した。これらの結果から、アドレナリン $\beta$ 受容体や核内レセプターPPAR $\gamma$ を介したVEGF-Cの発現抑制機構が存在することが示唆された。さらにin vivoにおいて、寒冷暴露や交感神経性刺激によるBATの増生時に、VEGF-Cの発現が上昇して血管新生を促進する可能性は低いと結論した。以上の結果をまとめると、前駆褐色脂肪細胞はアドレナリン $\beta$ 作用によりVEGFの産生を増加させ、血管新生を促進することが考えられた。また各VEGFアイソフォーム遺伝子の発現調節機構は全く異なる結論した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 雅 之  
副 査 教 授 葉 原 芳 昭  
副 査 教 授 渡 邊 智 正  
副 査 助 教 授 木 村 和 弘

学 位 論 文 題 名

## げっ歯類の褐色脂肪組織での血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) ファミリー発現の交感神経性調節

寒冷暴露によって熱産生臓器である褐色脂肪組織 (BAT) は増生し、同時に血管新生が起こる。この血管新生の調節機構を明らかにするために、血管新生因子 VEGF (血管内皮細胞増殖因子) ファミリーに着目し、ラット BAT と、不死化褐色脂肪細胞 (HB2 細胞) における発現を検討し、血管新生との関連について以下の結果を得た。

1. ラットを 4℃ の寒冷環境下で飼育すると、寒冷暴露後 1-4 時間で BAT の VEGF mRNA レベルが約 2.4-2.7 倍上昇した。しかし、24 時間以内にもとのレベルにまで低下し、10 日後まで変化はなかった。一方、BAT の VEGF-B mRNA レベルは寒冷暴露の期間中変化しなかった。従って、VEGF は BAT の増生に伴う血管新生に関与する可能性が示唆された。VEGF mRNA レベルに対する寒冷暴露の効果は、この組織に分布する交感神経枝を外科的に切除することにより完全に消失した。しかし、ノルアドレナリンを投与すると寒冷暴露と同様に mRNA レベルが上昇した。これらの結果から、BAT の VEGF mRNA レベルは交感神経のノルアドレナリンによって調節されていることが明らかになった。さらに、 $\beta 3$  受容体作動薬の CL316,243 を投与しても寒冷暴露の効果が再現されたことから、この効果は褐色脂肪細胞に対するアドレナリン  $\beta$  受容体を介した機構によるものと予想された。

2. 褐色脂肪細胞における VEGF ファミリー遺伝子の発現調節機構を調べる目的で、がん抑制遺伝子 *p53* 欠失マウスより HB2 細胞を樹立した。分化する前の HB2 細胞は、VEGF、VEGF-B 及び VEGF-C の各 mRNA を発現していた。HB2 細胞を分化させると VEGF は発現が増加したが、VEGF-B と VEGF-C の発現に変化はなかった。分化前の HB2 細胞をノルアドレナリンあるいは cAMP 誘導体で刺激すると VEGF mRNA レベルが上昇し、 $\beta$  受容体を介する情報伝達路の存在が示唆された。また、フォルボールエステルと  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアでも VEGF の誘導がみられ、アドレナリン  $\alpha 1$  受容体を介した調節機構や他の細胞増殖因子を産生させて VEGF を誘導する機構が予想された。しかし、分化させた細胞ではノルアドレナリンの効果が消失した。VEGF-B mRNA レベルは、分化前後に関わらず種々の刺激に対して変動しなかった。VEGF-C mRNA レベルは VEGF とは逆に、ノルアドレナリン刺激で低下した。この効果は cAMP 誘導体刺激でもみられたことから、 $\beta$  受容体を介した発現抑制機構の存在が示唆された。以上の結果をまとめると、前

駆褐色脂肪細胞はアドレナリン $\beta$ 作用によりVEGFの産生を増加させ、血管新生を促進することが考えられた。

以上のように、本研究は、小型げっ歯類のBATの増生に伴う血管新生に、褐色脂肪組織が発現するVEGFが関与する可能性を示し、その発現調節を交感神経系が行うことを明らかにしたものであり、哺乳類の生理学への貢献が大である。よって審査員一同は浅野淳氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分あると認めた。