

## 81. 食欲調節シグナルを介した血管障害の新規分子基盤

土屋 恭一郎

山梨大学 大学院総合研究部 医学域 臨床医学系

Key words : 肥満, メラノコルチン受容体, 腹部大動脈瘤

### 緒言

メラノコルチン 4 型受容体 (melanocortin-4 receptor : MC4R) は、視床下部において  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone (MSH) を内因性リガンドとして、レプチンによる食欲抑制シグナルを導く。MC4R 遺伝子には多型・変異が報告されており、MC4R シグナル活性の低下は、単一遺伝子異常に起因する肥満として最も高頻度と報告されている [1, 2]。

肥満は動脈硬化症および腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm : AAA) 等の血管障害の危険因子である。最近、ヒト末梢血の遺伝子解析から、MC4R 遺伝子変異によるシグナル活性の低下が、冠動脈疾患リスクの増加と関連することが示されている [3]。しかし、MC4R シグナル活性の低下は、肥満に伴う危険因子を介して血管障害を促進するのか、または血管関連細胞 (平滑筋細胞、内皮細胞、マクロファージ等) に MC4R が発現し、直接血管障害に関与しているのかは明らかではない。本研究課題では、血管関連細胞に発現する MC4R を介した血管障害の新規分子基盤を明らかにすることを目的とする。

### 方法および結果

#### 1. 方法

MC4R 欠損マウスとして、loxP 配列に span された転写阻止 (transcriptional blocking : TB) 配列をマウス MC4R 遺伝子 (*Mc4r*) の ATG 部位の上流に挿入して *Mc4r* の発現を阻害するマウス (MC4R<sup>TB/TB</sup>マウス) を用いた [4]。このマウスは組織特異的 Cre 発現マウスとの交配により組織特異的な *Mc4r* 発現回復が可能である (図 1)。AAA は angiotensin II (Ang II) を浸透圧ポンプで持続皮下投与にて誘導した。

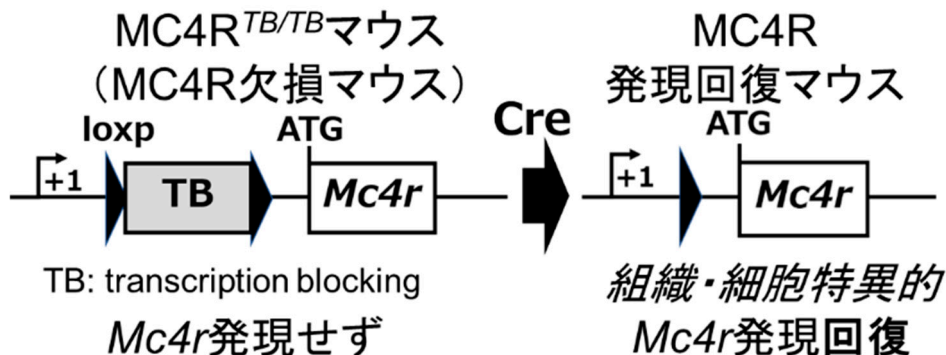


図 1. MC4R<sup>TB/TB</sup>マウス (=MC4R 欠損マウス)

MC4R<sup>TB/TB</sup>マウス (MC4R 欠損マウス) は TB 配列により全身で *Mc4r* の転写が停止しているが、Cre 発現マウスの交配により、組織・細胞特異的に *Mc4r* の発現回復が可能。

## 2. 結果

MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスは野生型マウスと比較して、Ang IIによる血圧上昇が有意に大きく、AAA 発症率および死亡率も有意に高値であった。MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスは野生型マウスと比較して、LDL 受容体欠損を背景とした際の粥状動脈硬化巣も有意に広範囲であった。MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスに対して hydralazine を投与し血圧を野生型マウスと合致させた比較においても、野生型と比較して Ang IIによる AAA 発症率および死亡率が有意に高値であった。

MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスは野生型マウスと比較して血中 leptin 濃度が有意に高値であった。MC4R<sup>TB/TB</sup>マウス、leptin 欠損 (*ob/ob*マウス)、および *ob/ob*×MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスの3群に Ang IIによる AAA を誘導すると、発症率、AAA 最大径、および死亡率はいずれも高い(大きい)順に MC4R<sup>TB/TB</sup>マウス、*ob/ob*×MC4R<sup>TB/TB</sup>マウス、*ob/ob*マウスであった。

leptin は血管平滑筋の炎症性遺伝子発現を誘導することが知られており、MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスの AAA 発症促進は leptin を介した機序が推察された。実際、培養血管平滑筋細胞において leptin (100 nM) は PI3 kinase 依存的に osteopontin の遺伝子発現を誘導し、MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスに osteopontin の受容体 CD44 に対する中和抗体を投与すると Ang IIによる AAA が部分的に抑制された。

一方で、*ob/ob*×MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスと *ob/ob*マウスの間にも AAA 発症頻度差を認めることから、MC4R が leptin 非依存的に AAA 発症を抑制する機序も想定された。視床下部以外の臓器に MC4R が発現し、直接血管障害を抑制する機構を検証するため、マウス末梢組織の MC4R 発現を解析した。マウス骨髄および骨髄由来マクロファージに MC4R 蛋白が発現しており (図 2A)、ApoE 欠損マウス大動脈プラーク内の CD68 発現細胞においても MC4R 蛋白が発現していた (図 2B)。

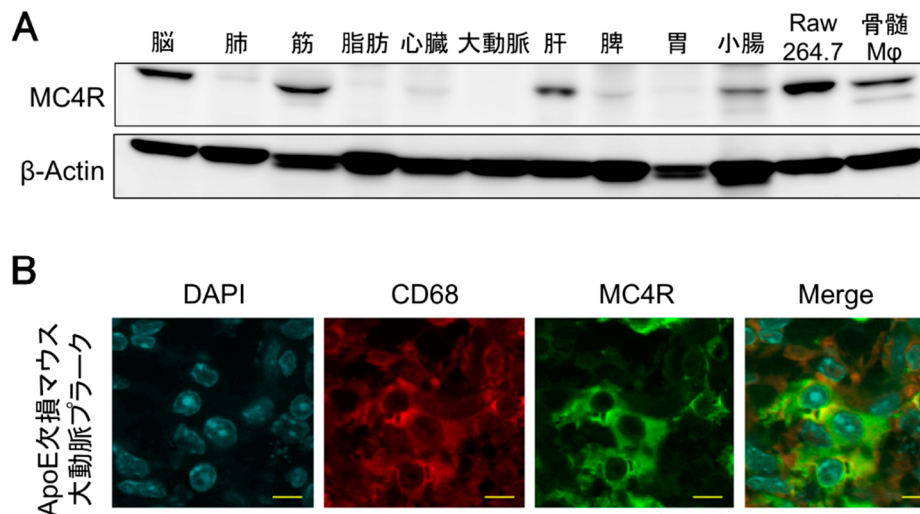


図 2. マウスマクロファージにおける MC4R 発現

- A) 野生型マウス各組織、Raw264.7 細胞および骨髄マクロファージにおける MC4R 蛋白発現。Mφ : マクロファージ。  
B) ApoE 欠損マウス大動脈プラークの CD68 陽性細胞における MC4R 発現。  
スケールバー : 10 μ m。

骨髄系細胞に Cre を発現する Lysozyme-M Cre マウスと MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスの交配により骨髄系細胞特異的 MC4R 発現回復マウスを作製すると、同マウスは MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスと比較して Ang IIによる AAA の発症頻度が低値であった (図 3A)。骨髄系細胞特異的 MC4R 発現回復マウス由来マクロファージは MC4R の内因性リガンド α-MSH による細胞内 cAMP の産生が認められ、LPS によるプロテインキナーゼ A および NF-κ B の活性化が減弱した (図 3B)。

骨髄系細胞特異的 MC4R 発現回復マウスへの α-MSH の慢性投与により Ang IIによる AAA 発症頻度が減少

したが、MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスへの $\alpha$ -MSHの慢性投与では減少が認められなかった。2型糖尿病患者由来の培養単球において、MC4R遺伝子発現量と血漿 $\alpha$ -MSH濃度には有意な負の相関が認められた。

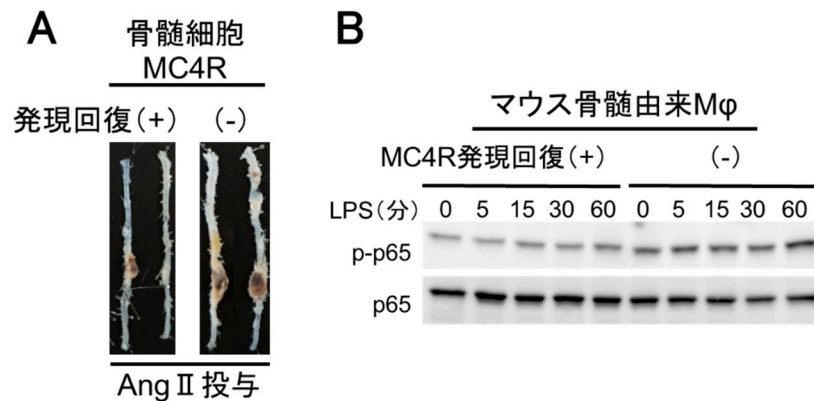


図3. 骨髄細胞特異的 MC4R 発現回復マウス

- A) MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスと LysM-Cre マウスの交配による骨髄細胞発現回復マウスは Ang II 誘導性 AAA の発症が抑制される。
- B) 骨髄系細胞特異的 MC4R 発現回復マウス由来マクロファージは、LPS による NF- $\kappa$ B p65 の活性化（リン酸化）が抑制される。

## 考 察

本研究では、MC4R が血管障害、特に AAA と動脈硬化を抑制することを Mc4r 欠損マウスを用いて示した。マクロファージに MC4R が発現することを新たに見出し、MC4R が NF- $\kappa$ B 活性を抑制することが肥満の発症および進展とは独立して血管障害の抑制に寄与した可能性が考えられた。

MC4R が血管障害を抑制する機序は、1) MC4R の欠損による血中レプチン濃度の代償的上昇、2) マクロファージに発現する MC4R の直接機序、の 2 つが想定された。レプチンは視床下部弓状核の POMC ニューロンに作用し、MC4R の内因性アゴニストである  $\alpha$ -MSH を分泌させることで MC4R シグナルを活性化する [5]。従って、MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスにおける血中レプチン濃度の上昇は、MC4R の欠如による代償性機序が想定される。加えて、腹部大動脈周囲には脂肪組織が存在しており、MC4R<sup>TB/TB</sup>マウスにおいて大動脈に近接する脂肪組織においてもレプチンの分泌が亢進し、血中のレプチンに加えて血管壁に作用している可能性がある。レプチンはマウスにおいて、MMP-9 産生を介して AAA の発症を促進することが示されており [6]、オステオポンチンは血管平滑筋において MMP-2 および 9 の発現促進を伴って AAA の発症が促進することも報告されている [7]。また、2 型糖尿病治療薬メトホルミンが大動脈のオステオポンチンの発現を抑制し、Ang II 誘導性 AAA を抑制することも示されている [8]。今後、レプチンおよびオステオポンチンの血管障害マーカーおよび治療標的としての意義に関する知見の蓄積が待たれる。

2 型糖尿病患者由来の培養単球において、MC4R 遺伝子発現量と血漿  $\alpha$ -MSH 濃度には有意な負の相関が認められた。これは MC4R シグナルの減弱の結果、血漿  $\alpha$ -MSH の代償的増加が認められた結果として矛盾せず、臨床的には血中  $\alpha$ -MSH 濃度および末梢血 MC4R 発現量がヒトにおいて血管障害マーカーとなる可能性を有する。加えて、AAA に対する  $\alpha$ -MSH の外因性投与についても、臨床的に検証し得ることも示唆している。末梢血の MC4R 発現量はフローサイトメトリーなど定量性の高い手法を応用できる可能性があり、今後の研究課題としたい。

視床下部以外では、MC4R は肝臓および小腸上皮 L 細胞において発現が報告されている [9]。小腸上皮 L 細胞において MC4R は GLP-1 およびペプチド YY の分泌を促進し、MC4R の機能喪失型変異を有するヒトでは血中ペプチド YY 濃度とブドウ糖経口投与に対する GLP-1 分泌が減少することが示されている。しかし、別の報告

では、L 細胞における MC4R 発現は微量であり、GLP-1 分泌に影響を及ぼさないとする見解 [10] もあり一貫しない。末梢組織における MC4R の機能およびシグナル経路の解析は今後の課題である。

## 文 献

- 1) Hainerova I, Larsen LH, Holst B, Finkova M, Hainer V, Lebl J, et al. Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response, and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3689-96. Epub 2007/06/21. doi: 10.1210/jc.2007-0352. PubMed PMID: 17579204.
- 2) Larsen LH, Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Wulff BS, Pedersen O. Prevalence of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):219-24. Epub 2004/10/16. doi: 10.1210/jc.2004-0497. PubMed PMID: 15486053.
- 3) Lotta LA, Mokrosinski J, Mendes de Oliveira E, Li C, Sharp SJ, Luan J, et al. Human Gain-of-Function MC4R Variants Show Signaling Bias and Protect against Obesity. *Cell.* 2019;177(3):597-607 e9. Epub 2019/04/20. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.044. PubMed PMID: 31002796; PubMed Central PMCID: PMC6476272.
- 4) Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell.* 2005;123(3):493-505. Epub 2005/11/05. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.035. PubMed PMID: 16269339.
- 5) Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):571-8. Epub 2005/04/28. doi: 10.1038/nn1455. PubMed PMID: 15856065.
- 6) Tao M, Yu P, Nguyen BT, Mizrahi B, Savion N, Kolodgie FD, et al. Locally applied leptin induces regional aortic wall degeneration preceding aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2):311-20. Epub 2012/12/12. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300543. PubMed PMID: 23220275; PubMed Central PMCID: PMC3645930.
- 7) Isoda K, Kamezawa Y, Ayaori M, Kusuhara M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin transgenic mice fed a high-cholesterol diet develop early fatty-streak lesions. *Circulation.* 2003;107(5):679-81. Epub 2003/02/13. doi: 10.1161/01.cir.0000055739.13639.d7. PubMed PMID: 12578867.
- 8) Kunath A, Unosson J, Friederich-Persson M, Bjarnegard N, Becirovic-Agic M, Bjorck M, et al. Inhibition of angiotensin-induced aortic aneurysm by metformin in apolipoprotein E-deficient mice. *JVS Vasc Sci.* 2021;2:33-42. Epub 2021/10/08. doi: 10.1016/j.jvssci.2020.11.031. PubMed PMID: 34617056; PubMed Central PMCID: PMC8489247.
- 9) Panaro BL, Tough IR, Engelstoft MS, Matthews RT, Digby GJ, Moller CL, et al. The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metab.* 2014;20(6):1018-29. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.004. PubMed PMID: 25453189; PubMed Central PMCID: PMC4255280.
- 10) Kuhre RE, Modvig IM, Jepsen SL, Kizilkaya HS, Baech-Laursen C, Smith CA, et al. L-Cell Expression of Melanocortin-4-Receptor Is Marginal in Most of the Small Intestine in Mice and Humans and Direct Stimulation of Small Intestinal Melanocortin-4-Receptors in Mice and Rats Does Not Affect GLP-1 Secretion. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:690387. Epub 2021/08/24. doi: 10.3389/fendo.2021.690387. PubMed PMID: 34421821; PubMed Central PMCID: PMC8375664.