

機関番号：18001
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590651
 研究課題名（和文） 内臓脂肪由来活性酸素種による血管障害の分子メカニズム
 研究課題名（英文） Mechanism for vascular dysfunction caused by visceral fat-derived reactive oxygen species
 研究代表者
 島袋 充生（SHIMABUKURO MICHIO）
 琉球大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：60271144

研究成果の概要（和文）：

内臓肥満症を基盤にもつメタボリックシンドローム症例では、血管機能が障害され、心臓血管病の発症につながる。筆者らは、内臓脂肪に由来した活性酸素種が、メタボリックシンドロームの病態に重要な役割を担っていることを解明してきた。本研究では、血管内皮における内臓脂肪由来活性酸素種の発生様式を検討し、以下の結果を得た。第一、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）では、パルミチン酸添加で、細胞内活性酸素種シグナル（ROS）が増加した。ROS 産生は抗酸化物質 N-アセチルシステインで抑制されるが、NAD(P)H オキシダーゼ阻害薬や Rho-kinase 阻害薬で抑制されなかった。第二、パルミチン酸で複数の酸化ストレス関連蛋白の発現が増強した。第三、肥満マウス血管のアセチルコリンおよびニトロプルシッドに対する拡張反応は、通常食で明らかな変化しなかった。以上、食事中の主要な飽和脂肪酸が直接酸化ストレスを産生し、関連する蛋白群を活性化することで、血管機能に影響していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

In patients with the metabolic syndrome, vascular dysfunction cause cardiovascular events. We previously reported that visceral fat-derived reactive oxygen species (ROS) underlie onset of the metabolic syndrome. In this study, we found that first, human umbilical vein endothelium produce ROS by addition of palmitic acid, a saturated free fatty acid; second, palmitic acid induces complex of anti- and pro-ROS proteins in HUVEC; third, obese animal did not show any vascular dysfunction if it fed normal fat chow. Collectively, saturated fat can directly produce ROS and related proteins in endothelium, and regulate endothelia function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：内臓肥満症、血管内皮機能、心筋梗塞、活性酸素種

1. 研究開始当初の背景
 脂肪組織は、遊離脂肪酸や、TNF α 、アディポネクチンなどの生理活性物質（アディポサイトカイン）を分泌し糖脂質代謝に重要

な役割を果たしている。申請者らを含めた複数のグループにより、遊離脂肪酸、アディポネクチンが、インスリン分泌やインスリン作用発現に重要な鍵を握ることが示されてきた。両者は血管でも、インスリンと協調してさまざまな作用を示す可能性がある。肥満、インスリン抵抗性患者では、高遊離脂肪酸血症、インスリン抵抗性、血管内皮機能の障害が同時に存在すること (Steinberg et al, *J Clin Invest*, 1995, 1997), インスリン感受性増強作用のあるアディポネクチンが、インスリン抵抗性や冠動脈疾患患者で低下すること (Hotta et al., *Diabetes* 2001, Yang et al., *JCEM* 2001, Weyer et al., *JCEM* 2000), アディポネクチンが血管内皮の炎症反応シグナルを阻害し (Ouchi et al. *Circulation* 1999), マクロファージへの脂肪蓄積を抑制すること (Ouchi et al. *Circulation* 2001) が報告されている。申請者らはこれらの基礎的知見をもとに、遊離脂肪酸、アディポネクチンのヒト血管内皮における生理的/病態生理的意義を解明してきた (Shimabukuro et al. *JCEM* 2003, Shimabukuro et al. *Diabetic Med*, 2004, Watanabe et al. *ATVB* 2005, Chinen et al. *Endocrinology* 2006, Fujita et al. *Circ J*, 2006)。

申請者らは、過剰な遊離脂肪酸によるインスリン分泌およびインスリン感受性の障害を、脂肪毒性と呼ぶことを提唱した。メタボリックシンドロームの基盤にある耐糖能障害の発現には、(1) インスリン抵抗性増大、(2) インスリン分泌低下の2大要因がある。申請者らは肥満にともなうインスリン分泌能低下において、レプチン不応性・抵抗性による β 細胞脂肪毒性の機序を解明してきた (Shimabukuro et al, *PNAS* 1997, 1998a, 1998b, 1999, 2000, *JCI*, 1997, 1998, *JBC* 1998)。レプチン受容体(OBR)変異を有する Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat では、膵ランゲルハンス島(膵ラ氏島)の脂肪酸酸化能が低下し中性脂肪含量が増加するため apoptosis 亢進とグルコースに対するインスリン分泌反応(GSIR)低下がみられる。これら遊離脂肪酸(FFA)代謝関連酵素を調節する転写因子として PPAR α および γ の重要性を示す結果が得られた。adenovirus vector を用いた野生型 leptin 受容体(OB-Rb)の ex vivo 遺伝子導入により ZDF 膵ラ島の leptin 反応性が回復し、中性脂肪含量の減少と apoptosis が抑制され、GSIR が回復する。

メタボリックシンドロームを構成する、内臓肥満、高トリグリセリド血症、低 HDL 血症、高血圧、耐糖能異常は、血中および組織中の遊離脂肪酸の過剰で説明できる可能性がある。私たちは、①メタボリックシンドロームにおけるインスリン抵抗性、内臓肥満のどちらがより上流にあるか、②内臓肥満にお

いて遊離脂肪酸並びにアディポサイトカインの動態変化がどのようなメタボリックシンドロームを発生させるか、③メタボリックシンドローム症例における血管内皮障害の存在、をすでに明らかにしてきた。現在、インスリン抵抗性または糖尿病モデルを用いて血管内皮機能を評価する動物モデルを新たに構築し、遊離脂肪酸あるいはレプチンの血管内皮機能に及ぼす基礎的検討をおこなっている。その研究のなかで、内臓脂肪に由来した活性酸素種が、メタボリックシンドロームの病態において重要な役割を担っていることを解明した (Furukawa, *J Clin Invest* 2004, Chinen, *Endocrinol* 2006, Fujita, *Cir J* 2006, Shimabukuro, *J Clin End Metab* 2006)。

2. 研究の目的

申請者らは、レプチン不応性・抵抗性による遊離脂肪酸の過剰がインスリン感受性組織のインスリン抵抗性増大を来し耐糖能異常を来するという考え(脂肪毒性)のもと、内臓脂肪の蓄積がメタボリックシンドロームの各因子を発現させる機序を検証してきた。このアプローチにより、内臓脂肪蓄積からインスリン抵抗性、血管内皮障害、心血管イベントの合併にいたる“メタボリックシンドロームのナチュラルコース”のメカニズムを明らかにすることを目指している。本研究では、第一に、内臓脂肪由来の活性酸素種(ROS)が、メタボリックシンドロームの病態における重要性、第二に、内臓脂肪由来の活性酸素種が血管内皮機能を障害する分子メカニズム、を明らかにした。

3. 研究の方法

①臨床疫学的研究

1. 男女、世代毎に生活習慣病センターの検診者で同意の得られた者を登録し(30-80才代まで7000名)、メタボリックシンドロームの頻度と各因子(内臓肥満測定、血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常)および内臓脂肪由来活性酸素種を含めたアディポサイトカインとの関係を明らかにする。

2. 上記メタボリックシンドロームの発症と生活習慣、家族歴(運動習慣、食習慣に関するアンケートを実施)との関係を明らかにする。

3. 登録した症例で、メタボリックシンドロームと診断された症例には二次検診をおこない3ヶ月毎に受診してもらい治療介入をおこなう。陰性者にも毎年受診を促すことで新規発症頻度および心血管イベントの発症の頻度を明らかにする。

②実験的臨床研究

上記症例でメタボリックシンドロームを診断されかつ同意の得られた方をランダムに抽出し下記のプロトコールを実施する。方法は下に記す。研究開始にあたり、当大学倫理委員会の許可を得て、被験者からは説明の後文書による同意を得る。

研究プロトコール1：メタボリックシンドロームを有する患者あるいは性、年齢をマッチさせた健常者で、血管内皮機能およびインスリン感受性（M値）を測定し、血中遊離脂肪酸、アディポネクチン濃度、内臓脂肪由来活性酸素種濃度との相関を検討する。

研究プロトコール2：健常人で、経静脈的に脂肪製剤＋ヘパリン、オクトレオチド、または生理食塩水を注入する。同時にグルコースクランプを用いてインスリン感受性を測定し血管内皮機能との関連を検討する。脂肪製剤負荷前後で、血中遊離脂肪酸、レプチン、アディポネクチン、内臓脂肪由来活性酸素種濃度を測定し血管内皮機能との相関を詳細に検討する。

試験方法

1. 血管内皮機能の判定：アセチルコリンあるいはニトロプルシッドを動注し血管内皮依存性あるいは非依存性の血流変化を前腕プレチスモグラフィによる測定することで抵抗血管における血管内皮機能を評価する。NOを介さないアセチルコリン血管拡張は、L-NMMA 前動注後ニトロプルシッドで補正し評価する。抵抗血管における基礎的NO産生は、L-NMMAの血管収縮作用で評価する

(Petrie et al. Circulation 1996)。インスリンの血管拡張作用は、インスリン（5 mU/min）およびD-グルコース（75 μ mol/min）を動注し、前腕血流量の変化を測定する

(Ueda et al. JCEM 1998)。伝導血管の血管内皮機能は、阻血解除後の上腕動脈の血管径拡張率（flow mediated dilation, FMD）で評価する。

2. グルコースクランプ法：インスリン（1.5 mU/kg/min）、20%グルコースを180分間静注する。グルコースの投与速度は血中グルコースを5.2 mmol/Lに維持するように調節する。平衡状態でのグルコース投与量からインスリン感受性（M値）を求める（Morris et al. JCPP 1997）

3. 酸化ストレス（ROS）状態と血管内皮機能の関係について検討する。

③基礎研究

メタボリックシンドロームモデル（db/dbマウスおよび野生型、アディポネクチンノックアウトマウス）を用いて、メタボリックシンドロームの発症と血管内皮障害の病態における脂肪毒性の関わりについて明らかにす

る。

1. 肥満糖尿病動物モデル db/db マウスは、肥満、高インスリン血症の後に糖尿病を発症する。肥満、高インスリン血症の時期には、脂質代謝異常、軽度の高血圧を呈し、ヒトのメタボリックシンドロームのモデルと言える。本研究では、ZDF および野生型の血中糖脂質代謝パラメーター（血糖、インスリン、steady state plasma glucose）と、遊離脂肪酸、レプチン、アディポネクチン、TNF- α の相関を週齢毎に調べることで、メタボリックシンドロームおよび糖尿病発症におけるアディポサイトカイン、内臓脂肪由来活性酸素種濃度の役割を明らかにする。

2. メタボリックシンドロームの出現する過程で、（1）ex vivo 摘出血管（大動脈および腸間膜動脈）の収縮弛緩反応（Magnus法）、

（2）Langendorf 灌流心臓の冠動脈圧-流量関係、に及ぼす acetyl choline \pm L-NMMA, sodium nitroprusside の作用をみることで、血管内皮機能を判定する。レプチン、アディポサイトカイン血中濃度、インスリン感受性と血管内皮機能の指標との相関を検討する。血小板凝集能測定装置を用いて、メタボリックシンドロームの出現過程と血小板凝集能が相関するか検討する。Northern および RT-PCR 法で血管における脂肪酸代謝関連酵素（acyl CoA oxidase, acetyl CoA carboxylase, fatty acid transporter protein-1, CD36）eNOS の発現レベルを定量する。このとき、アデノウイルスを用いてアディポネクチンまたはレプチン受容体を過剰発現させたときこれらの変化がされるかどのように回復するか検討する。（3）酸化ストレス（ROS）の産生様式と産生メカニズムを解明する。NADPH オキシダーゼのサブユニットを網羅的に定量し、メタボリックシンドローム発生過程との関連を明らかにする。

分子生化学的研究

1. 血管内皮培養細胞で、内臓脂肪由来活性酸素種、遊離脂肪酸、TNF- α のインスリンによる IRS-2 依存性 PI3K 活性、糖取り込み、NF κ B binding (gel shift assay) および eNOS mRNA 発現レベルへの影響をみる。アデノウイルスを用いてアディポネクチンまたはレプチン受容体を過剰発現させたときこれらの変化がどのように回復するか検討する。メタボリックシンドロームにおける ROS 産生様式を測定する系を樹立する。ROS 産生メカニズムについてアディポサイトカインを中心とした分子レベルで明らかにする。

2. 経静脈的脂肪負荷によるインスリン感受性（SSPG）および in vivo 血管内皮機能（電磁血流計による下肢血流測定）の変化を肥満モデルおよび野生型で検討する。アデノウイルスを用いてアディポネクチンまたはレプ

チン受容体を過剰発現させたときこれらがどのように回復するか検討する。内臓脂肪除去あるいは皮下脂肪除去により、インスリン感受性 (SSPG) および in vivo 血管内皮機能 (電磁血流計による下肢血流測定) の変化をみる。マイクロアレイを用いて RNA の変化を組織的に検討する。

4. 研究成果

①臨床疫学研究

健診センターの受診者 (年齢 30~79 才、男性 3839 名、女性 3146 名、総計 6985 名) を対象に、生活習慣病 (内臓肥満症、高血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常、高尿酸血症) および動脈硬化性疾患のリスクファクターの陽性率と心血管イベントの関係を調べた。平均観察期間男性 1346 日、女性 1358 日で、急性心筋梗塞の発症率は、男性 2.01、女性 1.03 (千人年)、冠動脈疾患 (急性心筋梗塞+労作性狭心症) 男性 3.40、女性 2.06 (千人年)、脳卒中 3.47、女性 2.49 (千人年) といずれも男性が女性に比較して、高率であった。一方で、腹部肥満、高血圧、高血糖、高中性脂肪、低 HDL 血症の陽性率、喫煙率、習慣飲酒率でも、男性が女性に比較して高く、高コレステロール血症は男女で有病率に差がなかった。心血管イベントの発生率には男女差があり、その発生要因も明らかな差がある。メタボリックシンドロームの診断・管理のためには、男女差を考慮にいれ個別のアプローチ基準を設定する必要があると考えられた。健診センターの受診者で血管内皮機能および酸化ストレスマーカーを測定した。メタボリックシンドロームを有する症例では、血管内皮機能および酸化ストレスマーカーが内臓肥満増加と関連することが示された。

地域住民を対象としたデータベースを作成した (合計人口は 123142 名、65 才以上人口は 4 市町総計 218897 名 (人口の 15.8%)。本集団は沖縄県全体の人口構成に近似し、かつ、沖縄県総人口のおよそ 1 割を対象とした大規模な集団である。現在、①一次健診データ、②二次健診データ (75 g 糖負荷検査、頸部エコー、微量アルブミン)、③生活習慣病病歴データ、④医療費データ、⑤保健指導情報のうち、①から④までの突合が完了、⑤保健指導情報の入力にかかっている。

健診センターの受診者 (年齢 30~79 才、総計 6985 名) を対象に、生活習慣病 (内臓肥満症、高血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常、高尿酸血症) および動脈硬化症リスクファクターの陽性率と心血管イベントの関係を調べた。平均観察期間男性 1346 日、女性 1358 日で、急性心筋梗塞の発症率は、男性 2.01、

女性 1.03 (千人年)、冠動脈疾患 (急性心筋梗塞+労作性狭心症) 男性 3.40、女性 2.06 (千人年)、脳卒中 3.47、女性 2.49 (千人年) といずれも男性が女性に比較して高率であった。一方、腹部肥満、高血圧、高血糖、高中性脂肪、低 HDL 血症の陽性率、喫煙率、習慣飲酒率でも、男性が女性に比較して高く、高コレステロール血症は男女で差がなかった。心血管イベントの発生率には男女差があり、その発生要因も差がある。さらに、メタボリックシンドローム (内臓肥満症) を有する症例では、血管内皮機能および酸化ストレスマーカーが内臓肥満増加と関連することが強く示唆された。

沖縄県住民 (総人口 123142 名中、国保加入者 56810 名) を対象とし①一次健診データ (住民健診・人間ドック全ての一次健診データ) ②二次健診データ (75 g 糖負荷検査、頸部エコー、微量アルブミン)、③生活習慣病病歴データ、④医療費データ、データベースを作成。①一次健診データ②保健指導、③生活習慣病病歴データ、④医療費データ⑤保健指導情報 (保健指導記録による) 生活習慣病有病者・予備群の概数の把握、健診、医療機関への受診の割合とその効果を把握するための解析を実施した。健診未受診者では、一次検診および二次健診受診者の何れに比較しても、全死亡が多いという結果が得られた。内臓肥満症をベースにした脳・心イベント発症およびその他の致死性疾患が関与している可能性が高いことが示唆された。

②基礎的研究

血管内皮における内臓脂肪由来活性酸素種の発生様式を検討するために、以下の検討をおこなった。第一、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を、パルミチン酸 0 で培養し、細胞内活性酸素種シグナル (ROS) 発生の推移をみた。パルミチン酸は、150-200 μ M を閾値として ROS 産生が増加した。これは抗酸化物質 N-アセチルシステイン (NAC) により抑制されるが、NAD(P)H オキシダーゼ阻害薬 (diphenylene idonium ; DPI) や Rho-kinase 阻害薬では抑制されなかった。第二、パルミチン酸処理後の蛋白発現量の変動を網羅的に解析した (琉球大学医化学講座との共同研究)。パルミチン酸で発現が増強される Spot70,71,88,89,90 が同定された (pH4-7)。spot のひとつは抗酸化分子のひとつでこれまで脂肪酸との関係が指摘されていない。さらに既知あるいは未知の蛋白スポットの発現量変動がみられた。これらのうち蛋白発現量が著明に増加した spot に絞り、siRNA 等を用いた遺伝子発現制御により脂肪酸の細胞機能に及ぼす影響を検索している。第三、遺伝子改変および高脂肪食負荷モデルの作成・病態解析、モデル動物およびヒ

ト組織のマイクロ RNA およびプロテオミクス解析を計画・実施中である。第四、インビボモデルにおける血管障害の病態を明らかにするため、以下の検討をおこなった。レプチン受容体変異マウス db/db および その野生型で、通常食を 4 週間給餌後、切り出した大動脈リング状標本で血管作動性物質に対する反応をみた。通常食ではアセチルコリンおよびニトロプルシッドに対する拡張反応に明らかな変化はみられず、脂肪負荷や体重増加といった追加のストレス因子が必要と想定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Shimabukuro M, Higa M, Tanaka H, Shimabukuro T, Yamakawa K, Masuzaki H, Distinct effects of pitavastatin and atorvastatin on lipoprotein subclasses in patients of type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Med* 2011;28:856-64 (査読あり)
2. Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, PhD, Yamakawa K, Oshiro Y, Higa M, Masuzaki H. Impaired glucose tolerance, but not impaired fasting glucose, underlies left ventricular diastolic dysfunction. *Diabetes Care* 2011;34:686-690. (査読あり)
3. Okuno Y, Matsuda M, Miyata Y, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M Shimomura I. Human Catalase Gene is Regulated by Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma through a Response Element Distinct from That of Mouse. *Endocr J.* 2010;57:303-309. (査読あり)
4. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab.* 2009;10:178-88. (査読あり)
5. Okuno Y, Matsuda M, Kobayashi H, Nakamura H, Suzuki E, Morita K, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M Shimomura I. Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR γ -responsive region.

Biochem Biophys Res Commun 2008;366:698-704. (査読あり)

6. Maeda Y, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sawada F, Sasaki S, Fujii M, Saito R, Yanase T, Shimabukuro M, Nawata H, Takayanagi R. High prevalence of peripheral arterial disease diagnosed by low ankle-brachial index in Japanese patients with diabetes: The Kyushu Prevention Study for Atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82:378-382. (査読あり)

[学会発表 (国際学会のみ)] (計 5 件)

1. Shimabukuro M, Masuzaki H. Ectopic fat deposition (EFD), metabolic syndrome, and type 2 diabetes. ICE 2010 Satellite program, Obesity and Metabolic Syndrome. March 30th, 2010, Kyoto, Japan.
2. Shimabukuro M, Masuzaki H. Ectopic fat deposition and lipotoxic disorders. JES-Sponsored Symposia, 14th International Congress of Endocrinology, March 28, 2010, Kyoto, Japan.
3. Shimabukuro M Higa M, Tanaka H, Uezu Y, Masuzaki H. Effects of miglitol on fat distribution and insulin sensitivity in subjects with metabolic syndrome. 14th International Congress of Endocrinology, March 26-30, 2010, Kyoto, Japan.
4. Hasegawa J, Higa M, Tanaka H, Shimabukuro M Masuzaki H. Effects of brown and white rice diet on visceral adiposity and endothelial function: The BRAVO study. 14th International Congress of Endocrinology, March 26-30, 2010, Kyoto, Japan.
5. Shimabukuro M, Higa M, Masuzaki H. Visceral adiposity strongly predicts delayed hyperinsulinemia in obese and non-obese subjects. 14th International Congress of Endocrinology, March 26-30, 2010, Kyoto, Japan.

[図書] (計 2 件)

1. 島袋 充生、益崎裕章、日本医事新報、異所性脂肪《メタボリックシンドロームの新常識》、2010年、29-38頁
2. チーム医療レベルアップ糖尿病セミナー(第3巻) ケアネット DVD 田中 逸、赤井 裕輝、島袋 充生、穴澤園子、2009年

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島袋 充生 (SHIMABUKURO MICHIO)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60271144

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし