

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21590756

研究課題名（和文）

新たな脂肪細胞機能制御分子としての脂肪細胞内 eNOS の役割の解明

研究課題名（英文）

Novel Functional Roles of Adipocyte-Expressed eNOS

研究代表者

江頭 正人 (ETO MASATO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80282630

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、脂肪細胞内に発現する eNOS の発現調機構ならびに脂肪細胞機能制御における役割を、分子、細胞、組織、個体レベルにて明らかにすることである。

培養脂肪細胞において eNOS がその分化とともに発現することを見出した。また、eNOS を阻害することで脂肪細胞における脂肪分解が亢進することから、脂肪細胞内の eNOS が脂肪分解に対し抑制的に作用することを明らかにした。マウスの脂肪組織においても eNOS が発現していること、高脂肪食負荷を加えた肥満マウスの脂肪組織において eNOS の発現はむしろ低下すること、また高脂肪食負荷による肥満マウスに対し、通常食に戻したところ、肥満、代謝異常の改善とともに、脂肪組織 eNOS の発現が回復することを見いだした。脂肪組織内 eNOS 発現レベルと肝臓内トリグリセリドレベルが負の相関を示すことを示した。eNOS ノックアウトマウスに、高脂肪食を負荷したところ、wild-type マウスにくらべて、体重と総脂肪量の増加がみとめられ、血液中のインスリン濃度もより増加しており、個体レベルのインスリン抵抗性が悪化していることが示唆された。また、eNOS ノックアウトマウスにおいて肝重量の増加、肝臓内トリグリセリド濃度の増加、肝臓でのインスリンに対する反応性の低下が認められた。また、組織学的検討により高度の脂肪沈着、線維化、炎症細胞の浸潤も認められ、NASH 様の組織をていしていた。eNOS の発現は wild-type マウスの肝臓においてもともと認められず、血中遊離脂肪酸の基礎濃度およびイソプロテレノール負荷による血中遊離脂肪酸の上昇の程度は、eNOS ノックアウトマウスにおいて有意に高かったことから、eNOS ノックアウトマウスでは、脂肪組織における脂肪分解能が亢進しこのことが NASH の形成に寄与しているものと考えられた。さらに、培養細胞を用いた研究において、脂肪細胞内 eNOS の発現が、PPAR-gamma 阻害薬により、強く増強することを見出した。PPAR-gamma 阻害薬を高脂肪食負荷マウスに投与したところ脂肪組織において、eNOS の発現の増強が確認されるとともに肝における脂肪蓄積の程度が PPAR-gamma 阻害薬により軽減した。

以上、脂肪内 eNOS は脂肪分解能を負に制御しており、eNOS ノックアウトマウスは、脂肪分解能が亢進し遊離脂肪酸の分泌が上昇しており、このことが NASH の形成に寄与しているものと考えられた。これらの結果は、代謝性老年疾患の新たな治療戦略に対する実験的エビデンスになりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is emerging as an independent risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease associated with insulin resistance. However, pathogenesis of NASH is not fully elucidated. eNOS knock-out (KO) mice show metabolic consequences but the hepatic phenotype remain determined.

In this project, we found that only administration of high fat diet (HFD) could induce NASH in eNOS KO mice, not in wild type mice. eNOS was expressed in adipocytes and the inhibition of eNOS/NO enhanced lipolysis in vitro and in vivo. A PPAR gamma antagonist up-regulated the expression of eNOS in adipocytes and gave

rise to the resistance to HFD induced fatty liver. Furthermore, reduction of eNOS expression in adipocytes by HFD was also prevented by the drug.

In conclusion, eNOS in adipocytes plays a preventive role in the pathogenesis of NASH through the inhibition of lipolysis. These findings could provide new insights into the therapeutic approach for NASH and atherosclerotic cardiovascular disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）

キーワード：eNOS、脂肪細胞、脂肪酸、インスリン抵抗性

#### 1. 研究開始当初の背景

現在、わが国の65歳以上の高齢人口は年々増加しつづけ、2007年には高齢化率は21%をこえた。さらに75歳以上の後期高齢者の割合も10%をこえ、さらにその割合は増え続けていくものと予測されている。このような超高齢社会においては、心疾患や脳血管疾患などの動脈硬化性疾患は、高齢者の主な死因としてだけでなく、多くの要介護高齢者を生み出し、患者ならびに家族のADL阻害要因として、大きな問題となっている。

これらの疾患の基盤にある病態として、過食や身体活動低下を原因とする肥満、中でも内臓脂肪や異所性脂肪（肝、骨格筋）の蓄積とそれともなうインスリン抵抗性が重要であると考えられている。実際に、内臓脂肪量は、加齢とともに増加することが知られているし、メタボリックシンドロームの有病率も増加する。さらに近年の老化研究によれば、個体のインスリン感受性が寿命の規定因子になることも示唆されて

いる。したがって、インスリン抵抗性形成の鍵をにぎる（内臓、異所性）脂肪蓄積やそれともなう機能障害を治療標的とすることにより、動脈硬化性疾患の予防・治療を効果的に行うこと、ひいては健康長寿の実現が可能になると考えられる。このためには、脂肪細胞の分化、肥大、機能の制御に関する分子メカニズムの理解が必須であるが、いまだ十分明らかになっていないと言えない。

脂肪組織は、単なる余分な体内のエネルギー貯蔵庫としての役割だけではなく、多くの液性因子を分泌する内分泌臓器であることがわかってきた。さらには、脂肪の蓄積とともに生じるこれらの液性因子の分泌異常が、メタボリックシンドロームの病態形成に大きな役割を果たしていると考えられている。中でも中心的な役割を果たしているのが、アディポネクチンの分泌低下とともに、脂肪分解ともなう遊離脂肪酸の分泌亢進である。実際、内臓脂肪は脂肪分解活性が皮下脂肪にくらべて高く、また、

内臓脂肪より分泌される過剰な遊離脂肪酸は、肝臓に作用し、肝臓への脂肪沈着とインスリン抵抗性亢進を引き起こす。さらに、骨格筋に対してインスリン抵抗性（糖取り込み低下）を、膵臓β細胞に作用しインスリン分泌低下を、血管に作用し内皮機能低下を引き起こすことにくわえ、近年マクロファージにも作用し TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの分泌を促す作用も報告されており、これらをまとめて“脂肪毒性”という概念が提唱されている。

一方、NO(nitric oxide)は、生体内でその合成酵素 NOS(nitric oxide synthase)により産生され、種々の生命現象を制御している多機能性分子である。NOS には3つのアイソフォームが存在するが、動脈硬化の観点でいえば、血管内皮細胞に発現している eNOS (endothelial NOS)が重要であると考えられている。すなわち、eNOS は NO の産生を介した血管拡張、血小板凝集抑制、抗炎症、血管平滑筋細胞の増殖抑制作用を有し、動脈硬化に対し抑制的に働いている。また、加齢、高血圧、糖尿病、脂質異常症などの危険因子により、内皮由来 NO の生物学的活性が低下することも知られている。従来、eNOS は内皮細胞にほぼ exclusive に発現していると信じられていたが、近年、気道上皮細胞や心筋細胞、血小板においても“異所性”に発現していることが報告されてきている。近年、脂肪細胞においても主要なアイソフォームとして eNOS が発現していることが報告された (Science 2003;299:896)。その報告によれば、褐色脂肪組織由来の脂肪細胞において、eNOS は NO 産生ならびに細胞内 cGMP の上昇を引き起こし、ミトコンドリアの biogenesis を誘導する作用をもつとされている。しかしながら、ヒトの主要な脂肪組織である白色

脂肪由来の脂肪細胞における eNOS の役割、特に脂肪分解/遊離脂肪酸分泌における役割は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究の目的は、脂肪分解/遊離脂肪酸分泌に対する脂肪細胞内 eNOS の役割ならびにその発現調節機構を詳細に分子レベルにて明らかにすることにより、脂肪沈着にともなう代謝障害に対する新たな治療・予防戦略の開発につなげることである。具体的には

- 1) 脂肪細胞での eNOS 活性に関わるシグナルの解明ならびに脂肪細胞内 eNOS の脂肪分解抑制作用とその分子メカニズムの解明
  - 2) 脂肪細胞における eNOS 発現制御の分子メカニズムの解明とそれにもとづく脂肪内 eNOS 発現を増強する方法の開発
  - 3) 高脂肪食負荷マウスを用いた脂肪分解、fatty liver disease 形成における eNOS の役割の解明
- について研究を行う。

## 3. 研究の方法

脂肪細胞内 eNOS の脂肪分解抑制作用

培養細胞系として白色脂肪由来脂肪細胞のモデルである 3T3-L1 脂肪細胞をもちいた。脂肪分解は、基礎ならびにイソプロテレノール刺激下での培養上清中の遊離脂肪酸濃度にて評価した。eNOS 選択的阻害薬である L-NIO ならびに外因性 NO の添加 (NO ドナー) の脂肪分解/遊離脂肪酸分泌に及ぼす効果を検討した eNOS の siRNA による遺伝子ノックダウンに関しても検討した。

一般的に NO による生物学的作用は、cGMP 依存性のものと非依存性 (蛋白の S-nitrosylation) のものに分類される。そこで、脂肪細胞内 eNOS/NO の効果が、cGMP を介するかどうかを明らかにするため、cGMP アナログ、PKG (cGMP 依存性キナーゼ) 阻害薬、PDE-5 (cGMP 分解酵素) 阻害薬の効果について検討した。S-nitrosylation の関与を検討するため、N-ethylmaleimide (NEM) や DTT の効果を調べた。

脂肪細胞における eNOS 発現

分化刺激を加えた脂肪細胞を経時的に回収し、eNOS の発現をタンパク (ウエスタン解析) ならびに mRNA (real-time RT-PCR)

にて検討した。eNOS 遺伝子の転写活性は、ルシフェラーゼアッセイにて評価した。

高脂肪食負荷マウスを用いた脂肪分解、fatty liver disease 形成における eNOS の役割

eNOS ノックアウトマウスならびに wild-type マウスに対し、高脂肪食負荷を行い、経時的に体重、食餌量、総脂肪組織重量、内臓脂肪組織重量、皮下脂肪組織重量を測定した。肝臓の重量、組織（とくに脂肪の沈着、線維化）トリグリセリド含有量についても検討した。血中コレステロール、トリグリセリド、グルコース、インスリン、遊離脂肪酸レベル、血中 AST、ALT も測定し、比較検討した。また、脂肪細胞のサイズについても組織学的に検討した。脂肪組織（内臓脂肪、皮下脂肪）における eNOS (wild-type のみ)、の発現を real-time RT-PCR にて検討した。

#### 4. 研究成果

培養脂肪細胞において eNOS の発現を検討したところ、脂肪細胞への分化とともに発現が強く増強することを見出した。一方で、nNOS、iNOS の発現はみとめ認められなかった。続いて脂肪細胞における eNOS の機能について検討した。薬理的または siRNA により eNOS を阻害することでイソプロテレノール刺激による脂肪分解が亢進することから、脂肪細胞内の eNOS が脂肪分解に対し抑制的に作用することが明らかになった。イソプロテレノール刺激により、脂肪細胞内 eNOS が活性化が認められた。また、eNOS の脂肪分解抑制作用は、cGMP を介するものではなく、s-nitrosylation を介するものであることを明らかにした。つづいて個体レベルにおいても検討を加えた。マウスの脂肪組織においても eNOS が発現していること、その発現は間質ではなく主に脂肪細胞において認められること、高脂肪食負荷を加えた肥満マウスの脂肪組織において eNOS の発現はむしろ低下すること、また高脂肪食負荷による肥満マウスに対し、通常食に戻したところ、肥満、代謝異常の改善とともに、脂肪組織 eNOS の発現が回復することを見いだした。また肝臓におけるトリグリセリドの貯蓄量は、内臓脂肪組織からの遊離脂肪酸の分泌量と相関することが知られているが、脂肪組織内 eNOS 発現レベルと肝臓内トリグリセリドレベルが負の相関を示すこと、を明らかにした。

続いて、eNOS ノックアウトマウスをもちいた検討をおこなった。eNOS ノックアウト

マウスに、高脂肪食を負荷したところ、wild-type マウスにくらべて、体重と総脂肪量の増加がみとめられたが、興味深いことに内臓脂肪量はむしろ低下していた。血液中のインスリン濃度もより増加しており、個体レベルのインスリン抵抗性が悪化していることが示唆された。インスリン抵抗性にかかわる臓器として肝臓をしらべたところ、eNOS ノックアウトマウスにおいて肝重量の増加、肝臓内トリグリセリド濃度の増加、肝臓でのインスリンに対する反応性の低下が認められた。また、組織学的検討により高度の脂肪沈着、線維化、炎症細胞の浸潤も認められ、NASH 様の組織を呈していた。eNOS の発現は wild-type マウスの肝臓においてもともと認められなかったこと、血中遊離脂肪酸の基礎濃度およびイソプロテレノール負荷による血中遊離脂肪酸の上昇の程度は、eNOS ノックアウトマウスにおいて有意に高かったことから、eNOS ノックアウトマウスの脂肪組織における脂肪分解能が亢進しており、このことが NASH の形成に主に寄与していると考えられた。

さらに、培養細胞を用いた研究において、脂肪細胞内 eNOS の発現が、PPAR-gamma 阻害薬を脂肪細胞への分化を阻害しない程度の濃度において投与することにより、強く増強することを明らかにした。また、この作用は遺伝子発現レベルではたらいっていることも確認した。さらに、PPAR-gamma 阻害薬を高脂肪食負荷マウスに投与し、培養細胞で認められた効果が個体レベルでも確認できるかどうかを検討した。結果として、脂肪組織において、PPAR-gamma 阻害薬によって eNOS の発現の増強が、確認された。さらに PPAR-gamma 阻害薬による脂肪細胞内 eNOS 発現の増強が、脂肪分解機能の抑制につながっているかどうかを確認するため肝における脂肪蓄積を検討したところ、その程度が PPAR-gamma 阻害薬により軽減した。

以上、脂肪内 eNOS は脂肪分解を負に制御していることが明らかになった。eNOS ノックアウトマウスは、脂肪分解能が亢進し遊離脂肪酸の分泌が上昇しており、このことが NASH の形成に寄与しているものと考えられた。さらに、PPAR-gamma 阻害薬は脂肪細胞内 eNOS の発現を増加し脂肪分解を減少させるとともに脂肪肝の程度を低下させることを明らかにした。これらの結果は、代謝性老年疾患の新たな治療戦略に対する実験的エビデンスになりうると考えられる。

#### 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 7 件)

1) Ota H, Akishita M, Akiyoshi T, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Testosterone deficiency accelerates neuronal and vascular aging of SAMP8 mice: protective role of eNOS and SIRT1. PLoS One. 2012;7:e29598.

2) Takemura A, Iijima K, Ota H, Son BK, Ito Y, Ogawa S, Eto M, Akishita M, Ouchi Y. Sirtuin 1 retards hyperphosphatemia-induced calcification of vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:2054-62.

3) Ota H, Eto M, Kano MR, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:2205-11

4) Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis. J Atheroscler Thromb. 2010;17:431-5.

5) Yu J, Akishita M, Eto M, Ogawa S, Son BK, Kato S, Ouchi Y, Okabe T. Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. Endocrinology. 2010;151:1822-8.

6) Son BK, Akishita M, Iijima K, Ogawa S, Maemura K, Yu J, Takeyama K, Kato S, Eto M, Ouchi Y. Androgen receptor-dependent transactivation of growth arrest-specific gene 6 mediates inhibitory effects of testosterone on vascular calcification. J Biol Chem. 2010;285:7537-44.

7) Ota H, Eto M, Ako J, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. Sirolimus and everolimus induce endothelial cellular senescence via sirtuin 1 down-regulation: therapeutic implication of cilostazol after drug-eluting stent implantation. J Am Coll

Cardiol. 2009;53:2298-305.

[学会発表] (計 4 件)

1) 江頭正人: "高齢者における抗凝固療法の適応と注意点" 日本循環器学会学術集会 (2011年8月4日). 横浜

2) 江頭正人: "高齢者の脂質管理-現状と展望" 日本動脈硬化学会学術集会 (2011年7月16日). 札幌

3) 江頭正人: "高齢者における脂質異常症治療の意義と問題点" 日本老年医学会学術集会. (2010年6月24日-26日). 神戸

4) 江頭正人: "高齢者脂質異常症の薬物療法 動脈硬化性疾患予防のために" 日本老年医学会学術集会. (2009年6月18日-20日). 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江頭 正人 (ETO MASATO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号 : 80282630

(2) 研究分担者

飯島 勝矢 (IIJIMA KATSUYA)

東京大学・高齢社会総合研究機構・准教授

研究者番号 : 00334384

大田 秀隆 (OTA HIDETAKA)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20431869

(3) 連携研究者  
なし