

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590877

研究課題名(和文) Sirt-1による異所性脂肪蓄積の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Ectopic fat accumulation and dysfunction in cultured myocytes-Regulatory role of Sirt1

研究代表者

江頭 正人 (Eto, Masato)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80282630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う骨格筋減少と異所性脂肪蓄積が代謝異常、骨格筋機能障害の基盤となりうる。この機序の解明は、高齢者における代謝性疾患、サルコペニアの治療の開発につながりうる。本研究の目的は、骨格筋脂肪蓄積にともなう骨格筋機能障害の機序を明らかにすることである。C2C12培養骨格筋細胞に高濃度飽和脂肪酸を添加することにより、脂肪滴形成が生じアポトーシスが誘導された。また、インスリンによるAktリン酸化が抑制された。ビタミンD3によりSirt-1発現レベルが増加し、ビタミンD3添加により、パルミチン酸によるインスリン抵抗性は改善した。イソプロテレノール刺激によりビタミンD受容体の発現が上昇した。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia and ectopic fat deposition is related to aging and age-associated disorders. Therefore, to develop the efficient therapeutic strategy, the molecular mechanisms need to be clarified. Aim of this project was to examine the mechanisms underlying fatty acid-induced skeletal muscle dysfunction. Treatment with high dose of fatty acids induced lipid droplet formation and apoptosis accompanied with cellular insulin resistance, in C2C12 myocytes. Vitamin D3 induced Sirt-1 upregulation and restoration of fatty acid-induced insulin resistance. Finally, isoproterenol upregulated the expression levels of VDR in C2C12 cells.

研究分野：内科学

キーワード：骨格筋 脂肪酸 ビタミンD

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う代表的な身体組成の変化として、骨格筋の減少と脂肪の割合の増加、中でも内臓脂肪蓄積ならびに肝や骨格筋への異所性の脂肪蓄積が挙げられる。これらの変化とともに、高齢者ではインスリン抵抗性増大、代謝異常、骨格筋機能障害を呈しやすくなることが知られている。いったんこれらの変化が生じると、活動性の低下、基礎代謝の低下からさらなる内臓脂肪蓄積、異所性の脂肪蓄積が亢進するという悪循環を呈する。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。

従って、骨格筋などにおける脂肪蓄積やそれに伴う機能障害を治療標的とすることにより、高齢者における代謝性疾患、動脈硬化性疾患、サルコペニアの予防・治療を効果的に行うだけでなく、ひいては健康長寿の実現の可能性が高くなると考えられる。このためには、脂肪蓄積やそれともなう機能障害に関する分子メカニズムの理解が必須であるが、それについてはいまだ十分明らかになっていない。

最近の研究によると、脂肪組織は単なる過剰エネルギーの貯蔵庫としての役割だけではなく、多くの分泌因子を放出し、全身の臓器、組織とネットワークを形成していることがあきらかになっている。脂肪組織から砲手すされる分泌因子のひとつに遊離脂肪酸があり、脂肪分解に伴う遊離脂肪酸の分泌亢進が種々の病態と関連する。実際、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蓄積とともにインスリン抵抗性亢進を引き起こすことが報告されている。しかしながら、遊離脂肪酸の骨格筋に及ぼす影響は必ずしも全容が解明されているわけではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋脂肪蓄積ならびにそれともなう骨格筋機能障害とそれらに対する Sirt-1 の役割、効果を分子レベルにて明らかにすることである。

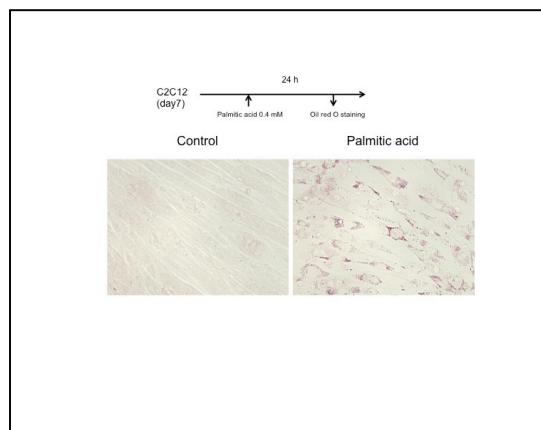
3. 研究の方法

培養骨格筋細胞 (C2C12 細胞) を使用した。脂肪染色として Oil Red-O 染色をおこなった。インスリン刺激による Akt のリン酸化をウエスタン解析にて評価し、細胞レベルのインスリン感受性の指標とした。タンパク発現はウエスタン解析にて、mRNA の発現は定量的リアルタイム RT-PCR 法にておこなった。細胞から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ

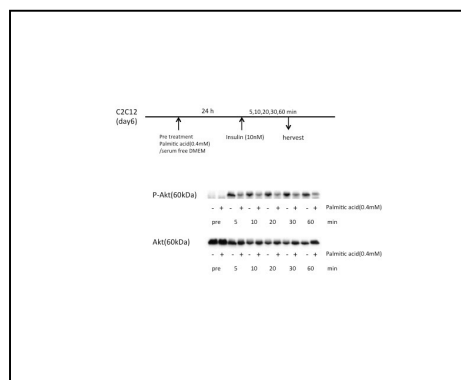
をおこない刺激にて発現が変動する遺伝子を網羅的に検討した。

4. 研究成果

サルコペニアを呈する骨格筋組織においては、異所性の脂肪蓄積が特徴的に認められることが知られているが、骨格筋機能に対する意義は不明確である。われわれは、培養マウス C2C12 培養骨格筋細胞に高濃度飽和脂肪酸 (パルミチン酸) を添加することにより、Oil Red-O 染色にて細胞内に脂肪がとりこまれ脂肪滴形成が生じるとともに、アポトーシスが誘導されることを見いだした。



また、パルミチン酸添加により、インスリンによる Akt のリン酸化反応が著明に抑制されており、細胞レベルでのインスリン抵抗性が誘導されたと考えられた。

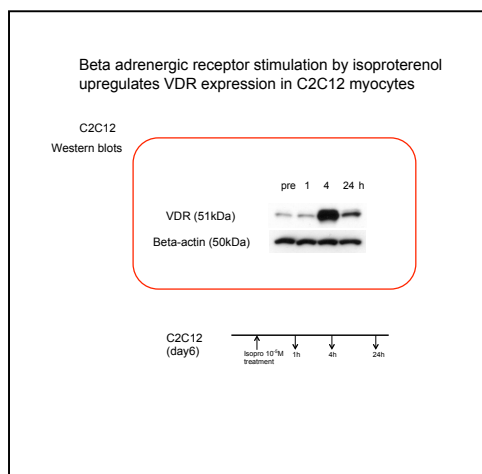


さらにパルミチン酸添加による遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法にて検討し、2 倍以上増減している遺伝子をそれぞれ複数同定した。なかでも骨格筋機能、サルコペニア

との関連が報告されている PGC-1alpha や細胞老化との負の制御因子である TERT の遺伝子発現がパルミチン酸投与により低下していることを見いだした。

続いて骨格筋細胞における Sirt-1 発現について検討した。C2C12 に対するパルミチン酸添加は、Sirt-1 発現レベルには影響を及ぼさなかった。そこで、Sirt-1 の発現レベルを上昇させる因子を探索的に検討したところ、イソプロテレノールによる交感神経ベータ受容体刺激では、効果が認められなかったが、骨格筋に対する効果が知られているビタミン D3 の添加により Sirt-1 発現レベルが増加した。ビタミン D3 添加により、パルミチン酸による細胞レベルでのインスリン抵抗性は改善が認められた。

また、C2C12 細胞において、ビタミン D 受容体が発現していること、またイソプロテレノール刺激によりビタミン D 受容体の発現が上昇することも明らかになった。



選択的ベータ 2 受容体刺激薬や受容体拮抗薬をもちいた検討により、ビタミン D 受容体の発現制御には、交感神経ベータ 2 受容体が発現していることも明らかになった。

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 5 件)

① Yu J, Akishita M, Eto M, Koizumi H, Hashimoto R, Ogawa S, Tanaka K, Ouchi Y, Okabe T. Src kinase-mediated non-genomic activation of signaling cascade leading to

endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424:538-543.

② 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

③ Son BK, Akishita M, Iijima K, Ogawa S, Arai T, Ishii H, Maemura K, Aburatani H, Eto M, Ouchi Y. Thrombomodulin, a novel molecule regulating inorganic phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;56:72-80

④ Ota H, Akishita M, Tani H, Tatefuji T, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Shirasawa T, Ouchi Y. trans-Resveratrol in Gnetum gnemon protects against oxidative-stress-induced endothelial senescence. *J Nat Prod.* 2013;76:1242-1247.

⑤ Shibasaki K, Ogawa S, Yamada S, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Toba K, Akishita M, Ouchi Y. Association of decreased sympathetic nervous activity with mortality of older adults in long-term care. *Geriatr Gerontol Int.* 2014;14:159-166.

[学会発表] (計 0 件)

[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：
出願年月日：
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・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

()

研究者番号: