

平成21年 4 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790403
 研究課題名（和文）メタボリックシンドローム予防における遊離脂肪酸分画および触媒酵素の病態意義
 研究課題名（英文）Pathophysiological significance of composition of free fatty acids and catalytic enzyme for prevention of the metabolic syndrome
 研究代表者
 松井 弘樹（MATSUI HIROKI）
 群馬大学・医学部・助教
 研究者番号：20431710

研究成果の概要：我々は肥満や糖尿病の際に見られる高遊離脂肪酸血症と心血管系イベントの発症リスクへの影響を調べるため、種々の基礎的検討を行った。その結果、飽和脂肪酸が心血管系に対して悪影響を及ぼし、さらに脂肪酸触媒酵素である Stearoyl-coA desaturase-1 (SCD-1)が飽和脂肪酸の作用に対して保護的に作用することを明らかにした。以上の結果から、高遊離脂肪酸血症の心血管系に対する病態意義と、それに対して SCD-1 が予防および治療の重要なターゲットとなることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：循環器・高血圧、脂質、メタボリックシンドローム、予防医学

1. 研究開始当初の背景

飽食と運動不足の欧米型の現代社会において、過食を基盤とする心血管病の急速な増加はメタボリックシンドロームとして世界的に話題となっている。我が国でも、2005年にメタボリックシンドロームの診断基準が作成され、肥満（内臓脂肪蓄積）、インスリン抵抗性、動脈硬化惹起性リポタンパク異常、血圧高値が重要な因子として挙げられている。これらの危険因子の重積により、動脈硬化、虚血性心疾患、心肥大、さらには心不全が発症し、生命予後にも関わることは疫学的研究からも明らかであり、食生活や運動不足などの生活習慣の改善がメタボリックシ

ンドローム発症予防に極めて重要である。食生活の中でも特に、脂質の過剰な摂取は、構成成分である遊離脂肪酸の血中濃度を増大させ、運動不足も伴って過剰な供給と利用低下が続くと、遊離脂肪酸が内臓脂肪へ蓄積し、内臓肥満を呈することが知られている。さらに内臓脂肪が過剰に蓄積すると、遊離脂肪酸の脂肪細胞への取り込みも低下し、血中に滞留することで高遊離脂肪酸血症きたす。過剰な遊離脂肪酸は、肝臓、筋肉、膵β細胞といった非脂肪組織に流入し、インスリン作用の阻害をはじめとする細胞の機能障害を起こすことが知られており（脂肪毒性）、メタボリックシンドロームおよび心血管イベン

トの発症に密接に関与していることが示唆されている。遊離脂肪酸は、構成成分として飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸とに分けられるが、飽和脂肪酸の摂取がコレステロール増加作用、一価不飽和脂肪酸のオレイン酸および多価不飽和脂肪酸のリノール酸に LDL コレステロール低下作用が認められている。しかし、これら脂肪酸分画の心・血管系における直接的な影響についてはほとんど明らかになっていない。

また、これまでに申請者らはレプチンが高血圧性心肥大や心臓線維化など、肥満患者における心肥大や心不全の発症、進展に関わっていることを明らかにしてきた(文献1)。レプチンは脂肪細胞から分泌されて、体脂肪率の上昇に伴って血中濃度が増加することが知られている。さらに、内臓脂肪蓄積型の肥満となったラットの心臓では、正常ラットと比して、Stearoyl-coA desaturase-1 (SCD-1)の発現が高度に亢進していることを発見した。SCD-1は細胞内に取り込まれた飽和脂肪酸(パルミチン酸[16:0]およびステアリン酸[18:0])を単価不飽和脂肪酸(パルミトレン酸[16:1n-7]とオレイン酸[18:1n-9])に変換する酵素で、レプチン刺激によって発現・活性とともに著明に減少することが知られている。また、SCD-1は細胞内のエネルギー代謝を抑え、細胞内に脂肪を蓄積させる働きを有している。最近、肥満者と正常者の骨格筋で様々な遺伝子発現をマイクロアレイによって網羅的に比較検討したところ、SCD-1は肥満者で最も高度に発現しており、肥満に伴うインスリン抵抗性に深く関与していることが報告された(Hulver MW, et al. Cell Metab. 2005)。しかし、SCD-1の心血管系に及ぼす影響、および飽和脂肪酸・不飽和脂肪酸の心血管系の直接的影響を修飾するか否かに関してはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

食餌性的内臓肥満モデル動物を作成し、そのラットの心臓・血管におけるSCD-1の発現動態について検討する。さらに、ヒトの心肥大や心不全、動脈硬化およびメタボリックシンドロームの患者サンプルを用いて、SCD-1の発現動態がどのように変化しているか、併せて検討していく。

また、In vitroの実験として、培養心筋細胞、培養血管平滑筋細胞を用いて、それぞれの遊離脂肪酸が心血管系に与える影響について、遺伝子発現、細胞内情報伝達系、生理作用などの点から明らかにしていく。また、SCD-1が飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸に変換する酵素として重要な役割を果たすことから、飽和脂肪酸に対する影響をSCD-1が修飾するか否か検討する。

3. 研究の方法

(1) 心臓における検討

ウィスターラットに50%ショ糖食(ショ糖:標準飼料=1:1)を食餌として摂取させて、1~6ヶ月飼育した。対照群には標準飼料を摂取させた。内臓肥満の定量はCTスキャンにより計測し、心機能や血圧への影響は心エコーおよびカテーテル血圧計によって調べた。飼育期間経過後にそれぞれのラットから心臓を摘出し、SCD-1の発現量をReal-time PCR法や免疫組織化学染色法によって調べた。また、併せて血液サンプルも採取し、全遊離脂肪酸濃度や遊離脂肪酸分画、血糖、インスリン、コレステロールなどの代謝に関わる項目を測定した。

ラット新生児から初代心筋細胞を無菌的に取り出して、培養を行った。その培養心筋細胞に飽和脂肪酸(パルミチン酸、ステアリン酸)、一価不飽和脂肪酸(オレイン酸)、多価不飽和脂肪酸(リノレン酸)を添加して、心筋細胞の肥大・障害マーカーであるBrain Natriuretic peptide (BNP)の遺伝子発現の変化をReal-time PCR法にて調べた。心筋細胞の肥大の程度については、 ^3H -フェニルアラニンの取り込みの程度により検討した。さらに、細胞傷害の評価として、caspase3/7 glo assayによるアポトーシスアッセイや、活性型Caspase3のウェスタンブロッティングおよびTUNEL染色を行った。

また、心筋細胞におけるSCD-1の病態意義を調べるため、SCD-1のアデノウイルス発現ベクターを作成して、心筋細胞に過剰発現させた。SCD-1は骨格筋や脂肪細胞の代謝に影響することが知られていることから、心臓においてもエネルギー代謝に影響するか、検討した。さらに、飽和脂肪酸が心筋細胞へ与える影響をSCD-1が修飾するかどうか検討した。また、SCD-1のsiRNAを用いて、過剰発現のときと逆の作用が見られるかどうかについても検討した。

(2) 血管における検討

血管の病態におけるSCD-1の発現動態を調べるため、剖検例のヒト動脈硬化標本を用いて、免疫組織化学染色により病変局所でのSCD-1の発現動態を調べた。

さらに、培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞を用いて、心筋細胞のときと同様に飽和脂肪酸(パルミチン酸、ステアリン酸)、一価不飽和脂肪酸(オレイン酸)、多価不飽和脂肪酸(リノレン酸)を添加して、血管の石灰化マーカーであるBone Morphologic protein-2 (BMP2)や、core binding factor α -1 (Cbfal/Runx2)、Osteopontin (OPN)、Msx2、Osterixなどの遺伝子発現の変化をReal-time PCR法にて調べた。さらに、細胞傷害の評価として、caspase3/7 glo assayに

よるアポトーシスアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 心臓における検討

まず我々は、高シヨ糖食飼育による内臓肥満モデルラットを作成し、このラットの機能変化や血液成分の変化などを調べた。その結果、高シヨ糖食ラット群は腹腔内脂肪量が著明に増加しており、血清中グルコース、遊離脂肪酸、インスリンの有意な増加を認めた。一方、心機能や血圧などの機能的変化は認められず、組織染色の結果から心肥大や線維化などの形態的变化も認められなかった。そこで、Real-time PCR法を用いて、両群の心臓における SCD-1 の発現量を比較したところ、高シヨ糖食群の心臓において、標準飼料群と比較して、SCD-1 の発現が約 3 倍と著明に亢進していることを発見した (図 1)

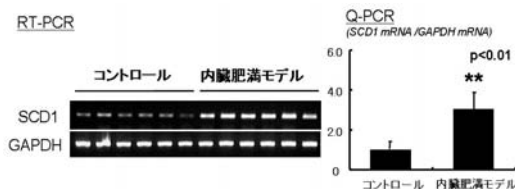


図1 内臓肥満モデルラットの心臓におけるSCD1遺伝子発現

さらに、SCD-1 はこの内臓肥満モデルラットで見られた高血糖、高インスリン血症、高遊離脂肪酸血症などの代謝ストレスで発現が誘導されることが明らかとなった。

遊離脂肪酸は心臓の主要なエネルギー源であることはよく知られているが、過剰な血中遊離脂肪酸は心臓に対して、脂肪酸代謝の亢進による酸化ストレス (ROS) の産生、および代謝時の中間産物であるセラミドの蓄積からアポトーシスを引き起こし、心機能の低下を招くとされている。そこで我々は、培養心筋細胞に SCD-1 を過剰発現させて心臓のエネルギー代謝を検討したところ、脂肪酸代謝の低下と糖代謝の亢進を引き起こし、エネルギー代謝における基質を SCD-1 がシフトさせることを見出した。さらに、飽和脂肪酸を心筋細胞へ添加すると、アポトーシスが誘導され著明な心筋傷害を呈するが、SCD-1 を心筋細胞に過剰発現させておくと、この飽和脂肪酸による心筋傷害に対して抑制的に働くことを認めた (図 2)。

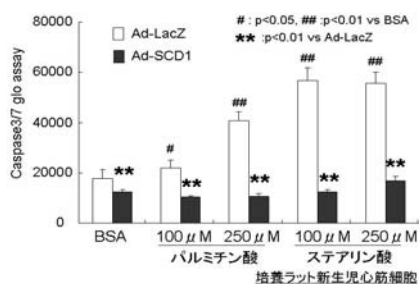


図2 飽和脂肪酸刺激に対するSCD1の病態意義 (アポトーシスアッセイ)

以上の結果から、肥満、糖尿病の際に見られる高遊離脂肪酸血症に対し、SCD-1 は心臓において保護的に作用していることが示唆された。

我々はさらなる検討として、血管系への遊離脂肪酸および SCD-1 の病態意義について着目した。糖尿病患者においては、冠動脈、頸動脈、あるいは大動脈の石灰化が非常に高率に認められる。また、糖尿病患者では血中遊離脂肪酸濃度の増加が知られている。しかし、遊離脂肪酸が血管石灰化に関与するという報告や、SCD-1 が血管系に関与するという報告はほとんどない。

そこで我々はまず、培養血管平滑筋細胞 (HASMC) に飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸を直接添加して、血管石灰化への関与について検討した。その結果、飽和脂肪酸刺激によって、血管石灰化マーカーである BMP2 や Cbfa-1、OPN、Mx2、Osterix などの遺伝子発現が著明に増加することを発見した。一方、不飽和脂肪酸添加ではほとんど変化が認められなかった。また、飽和脂肪酸刺激により、血管石灰化の際に重要な因子となるアポトーシスの誘導が認められた。以上の結果から、飽和脂肪酸は血管石灰化に対して促進的に作用することが示唆された。

次に、SCD-1 の血管系における発現動態および病態意義について検討した。まず、ヒト腹部大動脈の正常血管標本と動脈硬化標本において、SCD-1 の発現を免疫染色によって検討したところ、動脈硬化標本において正常血管と比較して、内膜、中膜ともに SCD-1 の発現が著明に減少していることを認めた。そこで、HASMC に siRNA を遺伝子導入して SCD-1 の遺伝子発現をノックダウンすると、飽和脂肪酸添加による BMP2 の mRNA の発現量、およびアポトーシスの程度が増強した (図 3)。

また、逆にアデノウイルス発現ベクターを用いて SCD-1 を過剰発現させると、飽和脂肪酸による BMP2 の遺伝子発現やアポトーシス

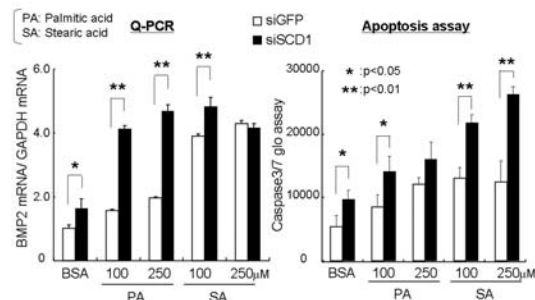


図3 SCD1遺伝子のノックダウンによる飽和脂肪酸の作用の変化

の誘導が抑制された。さらに我々はこの SCD-1 の発現を調節している因子を模索するため、HASMC に動脈硬化に関与するとされる TGF- β や PDGF-BB、高血糖、高インスリン、酸化ストレスのアナログである H₂O₂ を振りか

け、それぞれの細胞からRNAを抽出して、SCD-1 mRNAの発現をQ-PCR法によって調べた。その結果、 H_2O_2 が濃度・時間依存的にSCD-1 mRNAの発現を減少させることが明らかとなった。

以上の結果から、肥満や糖尿病で見られる高遊離脂肪酸血症の状態においても、血管平滑筋にSCD-1の発現が認められるときは、飽和脂肪酸の石灰化促進作用をSCD-1が抑制し、病態の発症を食い止めていることが示唆された[代償期](図4)。一方、炎症や内皮障害などで局所的に酸化ストレスが亢進するときは、血管平滑筋におけるSCD-1の発現量が減少し、飽和脂肪酸による石灰化促進作用が亢進して、病態の発症・進展につながることが示唆された(図4)。

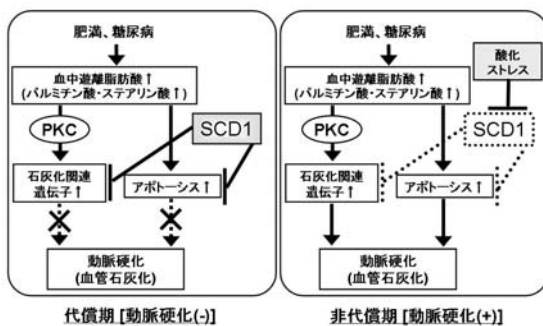


図4 遊離脂肪酸とSCD1が動脈硬化に及ぼす影響について(仮説)

以上までの我々の検討により、心血管病の予防・治療に対してSCD-1は重要なターゲットとなることが考えられた。今後、SCD-1の各組織や細胞における機能、疾患ごとの発現動態、さらにはSCD-1の発現を制御する因子(薬剤など)の検討が重要であると考えられる。

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6件)

- ① Tokuda F, Matsui H. (他3名、3番目) A new oxidative stress marker, N epsilon-(hexanoyl) lysine (HEL) is increased in metabolic syndrome, but not in obstructive sleep apnea. *Am J Med Sci.*

In press. 査読有

- ② Kawai-Kowase K, Matsui H. (他3名、3番目) PIAS1 mediates TGF β -induced SM α -actin gene expression through inhibition of KLF4 function-expression by protein sumoylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29(1)

: 99-106, 2009, 査読有

- ③ Tokuda F, Matsui H. (他3名、3番目) The serum levels of adipocytokines, Adiponectin and Leptin, in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Internal Med.* 48, 1843-49, 2008, 査読有
- ④ Tanaka T, Matsui H. (他11名、6番目) Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 28(3):1147-60, 2008, 査読有
- ⑤ Matsui H., Yokoyama T. (他6名、1番目) Ischemia/reperfusion in rat heart induces leptin and leptin receptor gene expression. *Life Science.* 80, 672-80, 2007, 査読有
- ⑥ 本岡 正彦, 松井 弘樹 (他3名、3番目) 自律神経系から見たペットの効果 ヒトと動物の関係学会誌, 19号, 2007, 査読無

[学会発表] (計10件)

- ① 後藤 陽輔, 松井 弘樹. Stearoyl-CoA desaturase-1 has a protective effect against saturated fatty acids-induced osteogenic differentiation and apoptosis in vascular smooth muscle cells. 第73回日本循環器学会総会・学術集会, 2009/03/20, 大阪
- ② 摩庭 萌乃, 松井 弘樹. Obesity-Induced Stearoyl-coa Desaturase-1 Plays a Protective Role Against Lipotoxicity in Rat Heart. 第73回日本循環器学会総会・学術集会, 2009/03/20, 大阪
- ③ 松井 弘樹. 血管石灰化における遊離脂肪酸および触媒酵素 SCD-1 の病態意義について. 群馬動脈硬化研究会, 2008/12/22, 群馬
- ④ Matsui H. Stearoyl-CoA desaturase-1 protects against saturated fatty acids-induced osteogenic differentiation and apoptosis of vascular smooth muscle cells. 第81回アメリカ心臓学会・学術集会 2008/11/09, アメリカ (ニューオーリンズ)
- ⑤ 松井 弘樹. 内臓肥満モデルラットの心臓において遊離脂肪酸触媒酵素SCD-1は保護的に作用している. 第15回日本未病システム学会 2008/11/01, 東京
- ⑥ 松井 弘樹. 動脈硬化の予防における遊離脂肪酸分画および触媒酵素SCD-1の病態意義の解明. 第15回日本未病システム学会 2008/11/01, 東京
- ⑦ 松井 弘樹. 内臓脂肪型肥満ラットの心

臓における脂肪酸触媒酵素SCD-1 の病態意義の解明. 第 5 回 Life Science Frontier 2008/07/21, 東京

- ⑧ 松井 弘樹. 心血管系疾患に対する遊離脂肪酸分画および触媒酵素の病態意義の解明. 群馬大学・秋田大学連携グローバルCOE 第 2 回若手研究者シンポジウム 2008/07/18, 群馬
- ⑨ 松井 弘樹. A novel hypoxia-inducible gene, DEPP, contributes to shift of energetic metabolism from fatty acids to glucose in cardiac myocytes. 第 72 回日本循環器学会総会・学術集会, 2008/03/29, 福岡
- ⑩ 松井 弘樹. 遊離脂肪酸および脂肪酸触媒酵素SCD-1 の心臓における病態意義の解明. 第 1 回FANTASY, 2008/2/2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 弘樹 (MATSUI HIROKI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号 : 20431710