

機関番号：12061

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591048

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームにおける多臓器障害発症メカニズムと治療法の研究

研究課題名(英文) Pathophysiological mechanisms and therapeutic targets in multiple organ damages in metabolic syndrome

研究代表者 下澤 達雄

(SHIMOSAWA TATSUO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90231365

研究成果の概要(和文):酸化ストレスが増大する食事負荷では酸化 LDL 受容体(LOX-1)を介し、さらに酸化ストレスが増加し、悪循環を形成する。この状況下で肝臓では線維化が進行し、脂肪性肝炎を引き起こす。また、腎動脈、大動脈において動脈硬化を発症させた。一方レニン阻害薬は肝臓において線維化を著明に抑制し、その効果は抗酸化薬とほぼ同程度であった。肝臓局所のレニンアンジオテンシン系の亢進が LOX-1 と酸化ストレスの悪循環に寄与することが示唆された。また、メタボリックシンドロームにおける多臓器障害の治療にレニンアンジオテンシン系の抑制は有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): Oxidized LDL receptor (LOX-1) further increased oxidative stress that was induced by dietary manipulations. Under this condition, liver developed fatty liver with fibrosis which resembles NASH in human and atherosclerosis developed in the kidney and aorta. Renin inhibitor or antioxidants reversed changes in the liver. It was suggested that local renin-angiotensin system in the liver may be an intermediate in the vicious cycle of oxidative stress and LOX-1. And targeting renin-angiotensin system may be a possible therapeutic target in metabolic syndrome.

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
年度			
年度			
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：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：レニンアンジオテンシン、肝障害、血管障害、酸化ストレス、

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの臓器障害の中でも血管障害には酸化 LDL が重要なトリガーとされる。血管内皮における酸化 LDL 特異的なレセプターとして LOX-1 が同定され、動

脈硬化の病態生理上の関与が強く示唆されている。すなわち、LOX-1 は動脈硬化巣や高血圧性腎症(Ando K et al. J Am Soc Nephrol. 2000)ではその発現が増強する。この LOX-1 の発現は酸化ストレスによって調節されて

いることが示された。たとえば培養血管内皮細胞において活性酸素種を作用させると LOX-1 の発現が増強した (Ando K et al. BBRC 2001)。また強力な酸化ストレスのメディエーターとして知られるアンジオテンシン II を投与したラットにおいて大動脈内皮での LOX-1 発現の亢進を認め、抗酸化薬投与で抑制された (Ando K et al. BBRC 2001)。これらの知見は、酸化ストレスが動脈硬化、臓器障害を引き起こす過程において、LOX-1 の発現亢進というメカニズムがかかわることを示唆する。

我々はすでに ApoE 欠損マウスにこの LOX-1 を強発現あるいはノックアウトしたマウスで腎臓、大動脈のリモデリング、動脈硬化に差があることを見出しており (Shimosawa T et al. Council for High Blood Pressure Research 2007)、さらに、LOX-1 強発現で血管障害、脂質代謝異常が強く発症することを見いだした。これらマウスのアンジオテンシン受容体を薬物的に阻害することで、血管病変を改善することも明らかにした。そのメカニズムとして、我々の検討では酸化ストレスが重要な働きをすることが明らかになった。

一方、メタボリックシンドロームでは心血管イベントのほかにも多臓器にわたる機能障害が生じ、患者の予後悪化にかかわる可能性が示唆されている。なかでもインスリン抵抗性、脂質代謝のみならず、治療のために投与される薬物の代謝にも重要な役割を果たす肝臓の障害は重要である (*Diabetes* 2005)。従来の動物実験では、脂肪負荷により脂肪肝にはなるが、肝がん発症あるいは肝線維化には至らず、脂肪負荷に加えて何らかの second hit が肝臓の繊維化あるいはガン化には必要であることは以前より指摘されている。そこで、我々は second hit として酸化ストレス、あるいは LOX-1 を介したシグナルが重

要ではないかと仮定した。さらに、肝臓はアンジオテンシノーゲンが豊富に存在することからレニンアンジオテンシン系が肝臓で酸化ストレスを亢進させる上で重要である可能性がある。すでにアンジオテンシン受容体拮抗薬は肝臓の線維化を抑制することが報告されているが、我々はアンジオテンシノーゲンに作用するレニンを直接阻害することがより肝臓保護の上では有用である可能性を考えた。本研究ではレニンを抑制すること、酸化ストレスを抑制することでメタボリックシンドロームにおける肝障害の改善効果と肝臓でのインスリン抵抗性の改善効果を検討する。

## 2. 研究の目的

本研究はメタボリックシンドロームにおける心血管イベントのみならず、全身の臓器障害とくに発ガンのリスクのある肝臓に焦点を当て、さらにメタボリックシンドローム発症に重要な代謝調節臓器である肝臓機能について検討し、その予防法を探る新しい研究である。

## 3. 研究の方法

すでにわれわれが確立した ApoE, LOX-1 double knockout mice と ApoE knockout, LOX-1 Transgenic mice (Council for High Blood Pressure Research, 2007) を用いて高食塩 (8%NaCl) および高脂肪食 (脂肪カロリー41%) あるいは正常食 (0.5%食塩, 脂肪カロリー13%) を8週間から24週間負荷する。薬物治療として、アンジオテンシン受容体拮抗薬、レニン阻害薬、ならびに TEMPOL を用いて全身の血管障害、腎障害、心障害、肝障害について検討する。各臓器での酸化ストレスの程度については我々既報の Lucigenin 発光法および免疫染色を用いて定量する (Shimosawa T et al. Circulation 2004)。また、肝臓における炎症に重要な役割を果た

す星細胞を肝臓の還流により採取し、星細胞での炎症マーカーの変化を検討する。

#### 1) 病理学的検討

肝障害の程度については Masson's Trichrome 染色を用いて肝臓の線維化を既報の方法に従い評価する (Brunt EM et al. Am J Gastroenterol 1999; 94:2467-2474)。すなわち、肝細胞内への脂肪沈着、細胞の膨大化および炎症細胞の浸潤をもって評価する。

また、酸化ストレスマーカーを 4HNE, 3-nitrotyrosine の免疫染色にて評価する。同時に Lucigenin 発光法にて NADPH oxidase 活性を測定する。

#### 2) 遺伝子発現の検討

各臓器の線維化のマーカー、細胞障害のマーカーを Collagen type I, TGF $\cdot$ , ANP, BNP などを指標に Real time PCR にて定量化する。

肝臓ではアンジオテンシノーゲンの mRNA および Angiotensin II の含有量を測定し、臓器内のレニンアンジオテンシン系について検討する。

また、病変発症直前に出現する遺伝子についてマイクロアレイを用いて解析し、病変に関連する細胞内情報伝達に関わる因子を遺伝子レベルで検索する。

#### 3) 生化学的プロファイルの検討

各臓器の障害の程度を蛋白レベルで解析し、定量化する。肝障害については ALT および線維化のマーカーとして血中ヒアルロン酸を測定し、あわせて肝臓の中性脂肪含有量を定量する。また、2) によって可能性の考えられる second hit となる細胞内情報伝達系について検討する。

#### 4. 研究成果

#### 1) 病理学的検討

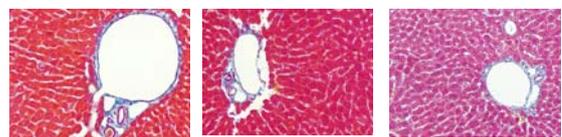
LOX-1 過剰発現マウスでは高脂肪、高食塩食により血圧の上昇が認められ、本モデルが食塩感受性であることが明らかになった。

LOX-1 の過剰発現マウスでは、高脂肪、高食塩食により肝細胞内への脂肪沈着、細胞の膨大化および炎症細胞の浸潤が著明で NASH を発症した。(図正常食、高脂肪食、高脂肪+高食塩食)



また、本マウスでは局所の酸化ストレスが亢進し、さらに、肝臓でのアンジオテンシノーゲン mRNA およびアンジオテンシン II 濃度が増加していた。これらの所見は高脂肪食のみでは認められなかった。

一方、局所のレニンアンジオテンシンが亢進していたこと、酸化ストレスが増大していたことから、それぞれの阻害剤を用いたところ、アンジオテンシン受容体拮抗薬(ロサルタン)、レニン阻害剤(アリスキレン)あるいは SOD 様物質の TEMPOL により酸化ストレスの軽減と NASH の改善が認められた。(図ロサルタン、アリスキレン、TEMPOL 処理)



また、腎臓においては腎動脈のリモデリングが著明であり、薬物による改善を認めた。

24 週の高脂肪、高食塩食負荷では ApoE

knockout mouse においても NASH が発症し、内因性の LOX-1 の増加が認められた。また、LOX-1 過剰発現マウスでは結節性病変が認められたが、癌化の証拠は得られていない。

## 2) 遺伝子発現の検討

各臓器の遺伝子発現を microarray により評価したところ、炎症、脂肪代謝、線維化にかかわる遺伝子群の変化を認めた。さらに、Collagen type I, TGF $\beta$ , ANP, BNP などを指標に Real time PCR にて定量化した結果、病理所見と合致し、これらのマーカーの上昇が確認され治療により改善することが確認された。

## 3) 生化学的プロファイルの検討

NASH 発症に伴い、肝臓中性脂肪含量の増大と ALT、ヒアルロン酸が増加した。また、fibronectin および酸化ストレスマーカーの 4HNE の増加が認められた。これらはアンジオテンシン受容体拮抗薬、レニン阻害薬や Tempol により改善した。

## 4) 肝臓星細胞での検討

モデルマウスの肝臓を還流し星細胞を採取した。細胞で TNF $\alpha$ 、fibronectin の増加が認められ、肝臓全体での炎症に星細胞が重要な役割を果たしていることが推察された。

## 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 11 件)

1. Mu, S. Y., Shimosawa, T., Ogura, S., Wang, H., Uetake, Y., Kawakami-Mori, F., Marumo, T., Yatomi, Y., Geller, D. S., Tanaka, H., Fujita, T. Epigenetic modulation of the renal  $\beta$ -adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. Nat Med (査読あり)2011; 17:573-80

2. Yamamoto C, Fukuda N, Jumabay M, Saito K, Matsumoto T, Ueno T, Soma M, Matsumoto K, Shimosawa T. Protective effects of statin on cardiac fibrosis and apoptosis in adrenomedullin-knockout mice treated with angiotensin II and high salt loading. Hypertens Res (査読あり)2011;34:348-353

3. Kato, Y., Araki, N., Ohkubo, T., Asano, Y., Furuya, D., Hattori, K., Simazu, T., Yamazato, M., Nagoya, H., Ito, Y., Shimosawa, T., Fujita, T., Shimazu, K. Effects of adrenoemullin on nitric oxide production during forebrain ischemia and reperfusion in mice. Cerebral Blood Flow and Metabolism (査読あり)2010;21:1-6

4. Unuma, K., Shintani-Ishida, K., Yahagi, N., Tsushima, K., Shimosawa, T., Ueyama, T., Yoshida, K. Restraint stress induces connexin-43 translocation via  $\beta$ -adrenoceptors in rat heart. Circ J (査読あり)2010;74: 2693-2701

5. Unuma, K., Shintani-Ishida, K., Tsushima, K., Shimosawa, T., Ueyama, T., Kuwahara, M., Yoshida, K. Connexin-43 Redistribution and Gap Junction Activation During Forced Restraint Protects Against Sudden Arrhythmic Death in Rats. Circ J (査読あり)2010; 74:1087-1095

6. Hirahashi, J., Hishikawa, K., Kaname, S., Tsuboi, N., Wang, Y., Simon, D. I., Stavrakis, G., Shimosawa, T., Xiao, L., Nagahama, Y., Suzuki, K., Fujita, T., Mayadas, T. N. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. Circulation. (査読あり)2009;120: 1255-1265.

7. Miyamoto, N., Tanaka, R., Shimosawa, T., Yatomi, Y., Fujita, T., Hattori, N., Urabe, T. PKA-dependent suppression of ROS in transient focal ischemia in adrenomedullin-deficient mice. J Cereb Blood Flow Metab. (査読あり) 2009;29 : 1769-1779.

8. Ikeda, H., Watanabe, N., Ishii, I., Shimosawa, T., Kume, Y., Tomiya, T., Inoue, Y., Nishikawa, T., Ohtomo, N., Tanoue, Y., Iitsuka, S., Fujita, R., Omata, M., Chun, J., and Yatomi, Y. Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2. J. Lipid Res. (査読あり)50: 556-564, 2009.

9. Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T.,

Okamura, M., Inagaki, T., Kita, K., Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T.T., Hammer, R.E., Kodama, T., Yanagisawa, M., and Sakai, J. Fasting-Induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2. *Cell Metabolism* (査読あり)2009; 9: 191-202.

10. Matsui H, Ando K, Kawarazaki H, Nagae A, Fujita M, Shimosawa T, Nagase M, Fujita T. Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. *Hypertension*(査読あり) 2008;52:287-94.

11. Wang H, Shimosawa T, Matsui H, Kaneko T, Ogura S, Uetake Y, Takenaka K, Yatomi Y, Fujita T. Paradoxical mineralocorticoid receptor activation and left ventricular diastolic dysfunction under high oxidative stress conditions. *J Hypertens*(査読あり) 2008;26:1453-62

[学会発表] (計 11 件)

1 下澤達雄、上竹勇三郎、森典子、穆勝宇、神保りか、史安男、王紅、松井宏光、小倉彩世子、池田均、矢富裕、藤田敏郎 肝臓とレニンアンジオテンシン系 メタボリックシンドロームにおける役割. 第 33 回日本高血圧学会総会, 福岡, 2010.10

2 上竹勇三郎, 下澤達雄, 森典子, 穆勝宇, 史安男, 藤田敏郎. LOX-1 の過剰発現と食餌性の酸化ストレスの亢進が血管障害を惹起する. 第 33 回日本高血圧学会総会, 福岡, 2010.10

3 Uetake Y, Shimosawa T, Mu S, Mori F, Fujita T. Lox-1 aggravate vascular injury by western diet. The 23<sup>RD</sup> Scientific meeting of the International Society of Hypertension, Vancouver, Canada 2010 Sept.

4 Uetake Y, Shimosawa T, Ikeda H, Yatomi Y, Fujita T. A role of the diet and LOX-1-induced oxidative stress in the onset of NASH. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology(ICE2010), Kyoto, 2010 Mar.

5 下澤達雄 心腎連関とRAAS. 第 39 回日本腎臓学会東部学術大会, 東京, 2009 年 10 月

6 上竹勇三郎, 下澤達雄, 松井宏光, 森典子, 小倉彩世子, 王紅, 穆勝宇, 藤田敏郎. 食餌性の酸化ストレスが血圧の上昇および LOX-1 を介して血管障害を惹起する. 第 32 回日本高血圧学会総会, 大津, 2009.10

7 上竹勇三郎, 下澤達雄, 松井宏光, 森典子, 小倉彩世子, 王紅, 穆勝宇, 藤田敏郎. 食餌性の酸化ストレスと血管障害に関する検

討. 第 52 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2009.6

8 上竹勇三郎, 下澤達雄, 松井宏光, 小倉彩世子, 王紅, 穆勝宇, 藤田敏郎. 食餌性の酸化ストレスと血管障害に関する検討. 第 31 回日本高血圧学会学術総会, 札幌, 2008.10

9 Uetake Y, Shimosawa T, Matsui H, Mori F, Ogura S, Wang H, Mu S, Fujita T. LOX-1 aggravate vascular injury by western diet. 22<sup>nd</sup> Scientific Meeting of International Society of Hypertension, Berlin, Germany, 2008 June

10 上竹勇三郎, 下澤達雄, 松井宏光, 森典子, 小倉彩世子, 王紅, 穆勝宇, 藤田敏郎. 食餌性の酸化ストレスと血管障害に関する検討. 第 51 回日本腎臓学会学術総会, 福岡, 2008.05

11 Uetake Y, Shimosawa T, Ikeda H, Yutaka Y, Fujita T. A Role of the diet-induced oxidative stress in the onset of NASH. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Milan, Italy, 2008 Apr

[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

<http://lab-tky.umin.jp/>

<http://plaza.umin.ac.jp/~kid-endo/a-3-14.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下澤 達雄 (SHIMOSAWA TATSUO)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90231365

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

池田 均 (IKEDA HITOSHI)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：80202422  
安東 克之 (ANDO KATSUYUKI)  
東京大学医学部附属病院 准教授  
研究者番号：60184313