

論文内容の要旨

論文題目

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

指導教員 大内 尉義教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 山田 容子

背景：

本研究では、脂肪細胞に発現する eNOS (endothelial nitric oxide synthase)の脂肪分解における作用を *in vitro* と *in vivo* の両方の観点から検討した。従来、単なるエネルギーの備蓄細胞であると考えられてきた脂肪細胞から、アディポネクチンやレプチンをはじめとする様々な生理活性物質をもつアディポサイトカインが分泌され、生体内のホメオスターシス維持において重要な役割を果たしていることが近年分かってきている。その中でも、メタボリックシンドロームのような内臓脂肪蓄積型肥満から過剰に分泌されることによって各臓器でのインスリン抵抗性、ひいては全身のインスリン抵抗性を惹起あるいは増悪させる FFA に注目した。内臓脂肪より分泌される過剰な FFA は、門脈を介して大量に肝臓に流入し、肝臓での脂肪酸合成を亢進する。過剰なトリグリセライドの貯蓄は NAFLD (Non Alcohol Fatty Liver Disease)をきたし、肝臓でのインスリン抵抗性を誘導する。また、近年 eNOS KO (knockout)マウスのフェノタイプが明らかになったが、予想されるような高血圧変化のみならず、驚くべきことに肥満や脂質異常症、高血糖などのメタボリックシンドローム様のフェノタイプを示すことが分かった。さらに、eNOS がその名の由来通りの内皮細胞だけではなく、腎臓や血球などにも異所性に発現していることも分かってきた。前述の eNOS KO マウスのメタボリックシンドローム様のフェノタイプが異所性の eNOS、とりわけメタボリックシンドロームとつながりの深い脂肪細胞に発現している eNOS の作用と関連しているのではないかと仮説を立て、脂肪細胞内 eNOS と脂肪分解との関係について研究を進めた。

方法と結果：

3T3-L1 前駆脂肪細胞では eNOS 蛋白の発現は認められないが、分化誘導因子の添加による成熟脂肪細胞への分化に伴い、eNOS 蛋白発現が著明に上昇し(8-10 日目)、NO (nitric oxide)の分泌が認められた。この eNOS の発現は、ciglitazone や troglitazone (PPAR γ アゴニスト)の添加や、siRNA による KLF2 (Krüppel-like factor2)のノックダウンで抑制されることから、脂肪細胞内 eNOS の発現制御に PPAR γ /KLF2 が関与していることが推察された。次に、この脂肪細胞内 eNOS の作用について検討した。eNOS の特異的な阻害薬 L-NIO の添加や、siRNA による eNOS のノックダウンでは分化への影響は認められなかった。成熟脂肪細胞へのイソプロテレノールの刺激で、hormone sensitive lipase (HSL)のリン酸化と培養上清中の glycerol 濃度が有意に増加した。同時に Akt や eNOS のリン酸化が増大(30-60 分)した。L-NIO や eNOS siRNA の前処理でイソプロテレノールによる glycerol 分泌は有意に増強した (270% vs control, n=6, P<0.01, 400% vs control, n=6, P<0.01)ため、脂肪細胞内 eNOS は脂肪分解を抑制的に作用することが確認された。N-ethylmaleimide や auranofin の前処理は脂肪分解を有意に抑制し、脂肪分解における NO の作用メカニズムは S-ニトロシル化経路を介していると推察された。

次に、3T3L1 細胞の長期間培養 (30 日間)を行った。3T3L1 脂肪細胞の肥大化と脂肪滴の貯蓄量の増加を認め、それとともに eNOS の発現低下を認めた。長期培養した 3T3L1 細胞は肥満における大型脂肪細胞の *in vitro* モデルといわれているため、肥満モデルマウスを用いて、肥満における eNOS の発現を *in vivo* で検討した。c57Bl6J マウスを 4-16 週まで NC (Normal Chow)を投与した群と、HFD (High Fat Diet)を投与した群、4-12 週まで HFD を投与し 12-16 週まで NC を投与した群の 3 群に分けた。HFD 群では NC 群に比較して有意な体重増加 (29.92 ± 1.74 vs 37.06 ± 3.41 , n=5, p<0.05)、総脂肪量の増加 (0.47 ± 0.16 vs 6.51 ± 0.53 , n=5, p<0.05)、高 TCH 症 (81.09 ± 9.07 vs 152.09 ± 27.79 , n=5, p<0.05)、高血糖 (101.50 ± 19.97 vs 232.30 ± 58.74 , n=5, p<0.05)を認めた。また、HFD 群では内臓脂肪における eNOS 発現量の有意な低下を認めた。ヒトにおける食事療法と同様に、4 週間 HFD を NC に戻すことで、HFD による eNOS の発現量の低下を回復させた。また、HFD 群では NC 群に比較して肝臓の TG 貯蓄量が増加しており、食事療法群では HFD 群に比較して肝臓の貯蓄 TG 量の改善を認めた。これは、内臓脂肪における eNOS の発現量と逆の関係を示しており、eNOS の低下による脂肪分解の亢進と NAFLD の程度が関連している可能性が推察された。

脂肪組織における eNOS と脂肪分解の関係を明確にするため、eNOS KO マウスを用いてこれを検討した。c57Bl6J マウス(WT)と eNOS KO マウスを 4-16 週まで NC を投与した群と、HFD を投与した群の 2 群に分けた。HFD の投与で、eNOS

KO マウスでは WT に比較して脂肪細胞のサイズ、体重 (37.06 ± 3.41 vs 41.22 ± 4.31 , $n=5$, $p<0.05$)、皮下脂肪量 (2.49 ± 0.45 vs 3.07 ± 0.27 , $n=5$, $p<0.05$)において著明に増加した状態が認められた。内臓脂肪量 (4.92 ± 1.11 vs 3.38 ± 0.26 , $n=5$, $p<0.05$)については eNOS KO マウスでは WT より有意に減少していた。また、eNOS KO マウスでは WT に比較して有意な高血糖 (232.30 ± 58.74 vs 272.00 ± 166.81 , $n=5$, $p<0.05$)、高トリグリセライド血症 (50.29 ± 10.70 vs 80.50 ± 45.38 , $n=5$, $p<0.05$)、高コレステロール血症 (152.09 ± 27.79 vs 209.60 ± 33.33 , $n=5$, $p<0.05$)を認めた。

次に、*in vivo* においても eNOS の欠如が脂肪分解を増加させるか否かについて検討した。HFD を投与した WT と eNOS KO マウスの腹腔内にイソプロテレノールを注入 (10mg/kg)し脂肪分解を促進させたところ、投与後 6 時間の血清 FFA 値が eNOS KO マウスでは有意に増加した。また、投与前と 6 時間後の血清 FFA の値の変化量、すなわち、脂肪分解によって放出された FFA の絶対値が eNOS KO マウスでは有意に (115.80 ± 35.94 vs 502.60 ± 218.87 , $n=5$, $p<0.05$)大きかった。以上から、*in vitro* で確認された eNOS の脂肪分解抑制作用が *in vivo* においても確認された。

eNOS KO マウスは HFD の投与により、WT に比較して肝臓内脂肪組織の増加や約 1.5 倍の肝重量の増加 (1.28 ± 0.20 vs 1.90 ± 0.56 , $n=5$, $p<0.05$)など、著明な NAFLD への変化を認めた。また、eNOS KO マウスでは血中の AST の上昇 (141.60 ± 16.01 vs 440.60 ± 174.50 , $n=5$, $p<0.05$)と肝臓内貯蓄 TG の約 2 倍もの増加 (59.14 ± 38.20 vs 121.80 ± 36.41 , $n=5$, $p<0.05$)が認められた。さらに、eNOS KO マウスでは著明な高インスリン血症 (3.08 ± 1.63 vs 14.86 ± 12.69 , $n=5$, $p<0.05$)も認めた。以上から、eNOS の欠如により脂肪分解が亢進し、その結果として NAFLD が誘導され、高インスリン血症を来すことが考えられた。

結論：

脂肪細胞に発現する eNOS は S-ニトロシル化を介して脂肪分解を負に制御していることを明らかにした。また、肥満による脂肪細胞における eNOS の発現低下が脂肪分解を亢進させる結果、NAFLD を引き起こしてインスリン抵抗性を増悪させることが推察される。

したがって、脂肪内 eNOS の発現増強または活性化がメタボリックシンドロームや心血管疾患の治療戦略となりうると考えられた。