

インスリン抵抗性における血管内皮障害に対する
肝臓 Extracellular Signal-Regulated Kinase の役割

くじら おか たけ ひこ
鯨 岡 武 彦

(循環器病学専攻)

防衛医科大学校

平成25年

目次

略語一覧	1
第 1 章 研究の背景と目的	4
第 1 節 背景	4
第 2 節 研究の目的	11
第 2 章 研究方法	13
第 1 節 肝癌細胞株 Huh-7 を用いた実験	13
第 2 節 実験動物と飼料	15
第 3 節 動物実験のプロトコール	16
第 4 節 血圧と脈拍数の測定	16
第 5 節 各組織のタンパク抽出とウェスタンブロット法	16
第 6 節 組織の採取、病理組織学的及び免疫組織化学的評価	18
第 7 節 血清パラメーターの測定	18
第 8 節 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT)、及び腹腔内インスリン負荷試験 (ITT)	19
第 9 節 肝臓における脂質抽出と測定	20
第 10 節 血清中の過酸化物質代謝物 (Reactive Oxygen Metabolites; ROM) と抗酸化力 (Biological Antioxidant Potential; BAP) の測定	20

第 11 節	Real-Time RT-PCR による評価.....	20
第 12 節	大動脈におけるスーパーオキシド産生の評価	21
第 13 節	大動脈における H ₂ O ₂ 産生量の測定	22
第 14 節	血管輪状切片の作成と血管弛緩反応測定	22
第 15 節	統計学的解析	23
第 3 章	実験結果	25
第 1 節	結果 ①	25
第 2 節	結果 ②	28
第 3 節	結果 ③	29
第 4 章	考察.....	34
第 5 章	結論.....	41
謝 辞		42
参考文献		43
図表		55

略語一覧

本論文において以下の略語を用いた。

ACh: acetylcholine

ADMA: asymmetric dimethylarginine

ALT: alanine aminotransferase

ASK1: apoptosis signal-regulating kinase-1

ATF-4: activating transcription factor-4

ATF-6: activating transcription factor-6

AUC: area under the glucose-time curve

BAP: biological antioxidant potential

BiP: immunoglobulin heavy-chain binding protein

BMI: body mass index

CHOP: C/EBP homologous protein

DHE: dihydroethidium

D-ROMs: derivatives of reactive oxygen metabolites

EGF: epidermal growth factor

eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2 α

eNOS: endothelial nitric oxide synthase

ER: sarco/endoplasmic reticulum

ERAD: ER-associated degradation

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FFA: free fatty acids

FoxO1: forkhead box O1

Grb2: growth factor receptor-bound protein-2

HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol

HFHSD: high-fat/high-sucrose diet

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance

IGF-1: insulin-like growth factor-1

IL-6: interleukin-6

IRE1 α : inositol-requiring enzyme 1 α

IRS: insulin receptor substrate

ITT: insulin tolerance test

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LE2KO: liver-specific ERK2 knockout mice

MAP kinase: mitogen-activated protein kinase

MetS: metabolic syndrome

NC: normal chow

NO: nitric oxide

OGTT: oral glucose tolerance test

ORD: obese-related disease

PDGF: platelet-derived growth factor

PERK: protein kinase RNA (PKR) -like ER kinase

PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase

ROS: reactive oxygen species

SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

Shc: src homology and collagen

SNP: sodium nitroprusside

SOS: son of sevenless

SREBP1: sterol regulatory element-binding protein 1

TC: total cholesterol

TG: triglyceride

T2DM: type 2 diabetes mellitus

UPR: unfolded protein response

XBP-1: X-box binding protein-1

第1章 研究の背景と目的

第1節 背景

(1) インスリンシグナルと extracellular signal-regulated kinase (ERK)

インスリンシグナルには2つの主要な経路があり、その一つが insulin receptor substrate (IRS) /phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) /Akt 経路である(図1)。代謝の中心である肝臓における IRS/PI3K/Akt 経路の役割はこれまでに多くの研究が行われており、報告されてきた。Akt は細胞生存や肥大、血管新生などを調節しており、さらには糖・アミノ酸輸送やグリコーゲン・脂質・タンパク質合成などの細胞内代謝においても重要な役割を担っている(1)。

Kahn らによれば、肝細胞特異的インスリン受容体欠損マウスは糖新生の増強と動脈硬化を惹起し得る脂質プロファイルを示した(2, 3)。肝臓の IRS/PI3K/Akt 経路は転写因子である forkhead box O1 (FoxO1) を抑制することにより糖新生を抑制しているが、一方で脂質合成に働く転写因子である sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) の発現を増加させる。2型糖尿病 (T2DM) や肥満関連疾患 (obese-related disease; ORD) においては耐糖能異常を伴う脂肪肝を呈するが、この現象は肝臓において、インスリンによる糖/脂質代謝調節のアンバランスが引き起こっている事が示唆される(4)。

インスリンシグナルのもう一つの主要経路が Ras/Raf/MEK/ERK 経路である

(図 1)。ERK1/2 は古典的 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) とも呼ばれ、酵母からヒトまで高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼである。Ras/Raf/MEK/ERK 経路は主にインスリン、1 型インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor-1; IGF-1)、上皮増殖因子 (epidermal growth factor; EGF)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor; FGF)、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) 等の増殖因子による刺激を核に伝え、細胞増殖・分化、細胞死に関わる(5)。インスリン受容体刺激によりインスリン受容体のチロシン残基がリン酸化され、src homology and collagen (Shc) が結合し、さらに growth factor receptor-bound protein-2 (Grb2)、GDP/GTP 交換因子 son of sevenless (SOS) が細胞膜近傍にリクルートされて Ras を活性化する(6)。活性化した Ras が Raf をリクルートして活性化し、さらにその下流の MEK1/2 をリン酸化し、MEK1/2 が ERK1/2 のスレオニン残基・チロシン残基をリン酸化することによりシグナルが伝達される(7)。

ERK1 と ERK2 のアミノ酸配列は 80%以上の相同性があり、上記の通り同じ刺激で活性化されることが知られている。しかしながら、ERK1 欠損マウスと異なり ERK2 欠損マウスは胎生致死であり(8)、ERK2 は ERK1 で補償できない生理機能があることが示唆される。現在では ERK1、ERK2 の、全身あるいは臓器特異的欠損マウスが作成されたことにより、特に神経系の分野における機

能分担が解明されつつある(9, 10)。

一方、インスリン抵抗性や T2DM 等の代謝性疾患や心血管疾患における、インスリンシグナルとしての Ras/Raf/MEK/ERK 経路の役割に関しての *in vivo* での研究はあまり進展していないのが現状である。インスリン抵抗性は炎症、高血糖・脂肪酸毒性、酸化ストレスと関連があることが知られており、これらはいずれも様々な細胞種において ERK を活性化し得ることが示されている(11-14)。このことから、ERK 経路はインスリン抵抗性状態で重要な働きを担う可能性が想定される。全身の ERK1 欠損マウスは高脂肪食負荷でインスリン抵抗性が悪化し、耐糖能異常が増悪する(15)。血管内皮細胞では酸化ストレスによる ERK の活性化が IRS1 のセリン残基 616 のリン酸化を介してインスリン抵抗性を悪化させる(16)。しかし、臓器特異性の ERK 経路、特に ERK2 の役割は未だ不明である。

(2) 脂肪肝と心血管疾患

高血圧、脂質異常症、耐糖能異常、内臓脂肪蓄積を特徴とするメタボリックシンドローム (metabolic syndrome; MetS) や T2DM などの ORD はインスリン抵抗性によって特徴づけられる。米国のみならず日本等の先進諸国において、これらの疾患の罹患率は食生活の欧米化等により増加の一途をたどっており、公衆衛生上の重大な懸念事項となっている(17)。インスリン抵抗性に関する最近

の研究では、インスリン抵抗性の一表現型である脂肪肝が心血管疾患と密接な関連があることが示唆されている。例えば非アルコール性脂肪肝を有する患者では有さない患者と比較し、血管内皮機能検査の一つである血流依存性血管拡張反応が有意に減弱しており(18)、また頸動脈の内膜中膜複合体厚の有意な増加を認めた(19-23)。さらに T2DM 患者において脂肪肝の存在は、高血圧、脂質異常症などの他の冠動脈危険因子とは独立して、心血管イベントの発生を予測し得る因子であることが示されている(24)。このようにインスリン抵抗性と関連した ORD において、脂肪肝は血管疾患の危険因子の一つと見なすことができる。インスリンの作用を考えるに当たっても、PI3K/Akt 経路が脂肪合成を介してむしろ脂肪肝増悪に働く可能性があり、肝臓におけるインスリンシグナルの特異性が考えられる。

(3) 小胞体 (sarco/endoplasmic reticulum; ER) ストレスと肥満・糖尿病

近年、インスリン抵抗性の原因として ER ストレスの関与が注目されており、本稿ではそれにつき論じる。真核生物において、ER は分泌タンパクや膜タンパクの合成に重要な働きを担う。これらのタンパクは ER 内で折りたたみ、糖鎖付加やジスルフィド結合の形成等の高次修飾を受けて、その後ゴルジ装置以降の各細胞小器官や細胞外に輸送される。様々な生理的、病的刺激はタンパク合成亢進、異常タンパク産生、あるいはタンパク処理機能低下を来とし、ER 内に

不完全に折りたたまれたタンパクが異常に蓄積する。この状態を ER ストレスと呼ぶ。細胞はこの ER ストレスを回避するため、新規タンパク合成を抑制することで ER への作業負荷を軽減するための翻訳停止、異常タンパクの分解機構増強のための小胞体関連分解 (ER-associated degradation; ERAD) に関与する因子の転写誘導、タンパクの折りたたみに関わる ER シャペロンの活性化が誘導される。これらを ER ストレス応答 (unfolded protein response; UPR) と呼ぶ。UPR は ER の恒常性を回復し、未然にアポトーシスを防ぐための防御反応であるが、それでも回復できないほどの強い障害を受けた場合、細胞はアポトーシスを起こし、異常な細胞を自身で排除することにより組織を保護しようとする。

UPR は ER 膜上の 3 つのストレスセンサー、すなわち①protein kinase RNA (PKR) -like ER kinase (PERK) (25)、②activating transcription factor (ATF) -6 (26)、③inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) (27, 28)から構成されている (図 2)。ER シャペロンである immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) はこれら 3 つの経路を遮断しているが、ER ストレス環境では、BiP は蓄積タンパクの折りたたみのため ER 内腔ドメインから遊離して、結果としてこれらのストレスセンサーが活性化される。活性化した PERK は翻訳開始因子である eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) をリン酸化し、翻訳抑制を来た

す一方、転写因子 ATF4 の翻訳を来たし、ATF4 標的遺伝子の転写を誘導する(29)。

BiP が外れた ATF6 はゴルジ装置へ移行し、活性型の転写因子 ATF6 となって核内へ移行し、ER シャペロンの遺伝子群の発現を促すと同時に前駆体 XBP-1 (X-box binding protein-1) の転写誘導を来たす(30)。IRE1 が活性化すると、XBP-1 mRNA のスプライシングが起こり、活性型 XBP-1 が産生される(31)。活性型 XBP-1 は ER シャペロン並びに ERAD の転写を誘導すると考えられている。

また IRE1 は apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1) を介して c-Jun N-terminal kinase (JNK) を活性化することによりアポトーシスを誘導することもできる(27, 32)。ATF4、ATF6、活性型 XBP-1 はいずれも C/EBP homologous protein (CHOP) の転写誘導を介して、アポトーシスを誘導し得る。

さて、肥満・糖尿病と ER ストレスとの関連についてはいくつかの研究報告がされている。ER ストレスが 1 型糖尿病を発症させることが Akita マウスで示された(33)。このマウスでは、異常インスリンの蓄積により ER ストレスが生じ、CHOP の誘導により膵 β 細胞のアポトーシスを引き起こし、1 型糖尿病を発症する事が明らかとなった。また Ozcan らは、肥満やインスリン抵抗性に関する従来の概念を変える報告として、ER ストレスがこれらの疾患の進展の主要な要因である事を示した。高脂肪食負荷マウス、あるいは *ob/ob* マウスにおいて ER ストレスが誘導されることが実証され、ER ストレス負荷状態では IRS のセ

リンをリン酸化することによるインスリンシグナル伝達の抑制、すなわちインスリン抵抗性をもたらすことが確認された(34)。このことから、MetS の基本病態である肥満が ER ストレスを介してインスリン抵抗性、T2DM 進展へ導くことが示された。

また近年、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; SERCA) と ER ストレスとの関連が報告された。Park らは、レプチン欠損マウスである *ob/ob* マウスの肝臓では脂肪肝と ER ストレスの亢進が生じ、それに随伴して SERCA2 の蛋白/遺伝子の発現量が著明に低下していることを確認し、さらに同マウスの肝臓において SERCA2 を過剰発現させると ER ストレスが改善されることを見出した(35)。これまでの基礎研究と合わせると、SERCA の機能維持は ER ストレスに抑制的に働き、一方で種々の病態で生じる SERCA の機能障害は ER ストレスを誘導することが示唆される。

さらに Liang らは、インスリン抵抗性マウスモデル由来のマクロファージにおいて MEK/ERK シグナルの減弱により SERCA2 の発現が低下し、ER ストレスが促進することを明らかにした(36)。以上より MEK/ERK シグナル、及び SERCA2 の活性と ER ストレスの間には何らかの関連があることが示唆される。

これらを踏まえ、本研究の予備実験としてヒト肝癌由来細胞株 Huh-7 を用いて、肝細胞における ERK シグナル、SERCA2、ER ストレスとの関連を評価し

た（図 3A）。パルミチン酸を添加しない条件では、MEK 阻害剤 PD98059 による MEK/ERK シグナル抑制による SERCA2 の蛋白発現、及び ER ストレスに対する影響は認めなかった（図 3B-F）。一方、パルミチン酸を添加した条件では、PD98059 により有意な SERCA2 蛋白発現の低下と、IRE1 α のリン酸化の増強、及び BiP の蛋白発現の増加が見られた（図 3B-E）。CHOP の蛋白発現については有意差を認めなかったが、発現増加の傾向が見られた（図 3F）。以上より *in vitro* において、肝細胞にパルミチン酸を添加し、MEK/ERK 活性を低下させると SERCA2 の蛋白発現が低下し、ER ストレスが誘導されることが示された。

第 2 節 研究の目的

第 1 節から、肝細胞を用いた *in vitro* の実験において、MEK/ERK シグナルの減弱は SERCA2 の蛋白発現を低下させ、ER ストレスを誘導することが明らかとなった。しかしながら *in vivo* における肝臓 ERK の役割については明らかではない。そこで本研究では Cre-loxP システムを用いて肝細胞特異的 ERK2 欠損マウス（liver-specific ERK2 knockout mice; LE2KO）を作成し、*in vivo* における肝臓 ERK2 の役割を検討した。具体的には、①肝臓 ERK2 を欠損させることにより脂肪肝とインスリン抵抗性が誘導されるか、②肝臓 ERK2 欠損時のインスリン抵抗性発症に対して ER ストレスが関与しているか、③肝臓 ERK2

欠損時の代謝変化が血管内皮障害を引き起こすかを検討し、肝臓インスリン抵抗性/脂肪肝が血管障害の早期指標である血管内皮機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

第2章 研究方法

第1節 肝癌細胞株 Huh-7 を用いた実験

肝癌細胞株である Huh-7 を 37 °C、5 % CO₂ の条件下で、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 5.6 mM glucose, 10 % fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, amphotericine B を含む) の培養液を用いて培養した。80-90 % confluence となった後、fetal bovine serum 無しの DMEM 培養液に交換し、MEK 阻害剤 PD98059 (20 μM) あるいは dimethylsulfoxide (DMSO) を添加した。その 30 分後、パルミチン酸 (250 μM) あるいは bovine serum albumin (BSA) を加え、24 時間培養した。24 時間培養後、培養液を捨て、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、タンパク質抽出緩衝液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) , 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Na₂EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 % NP-40, 2.5 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L β-glycerophosphate, 1 mmol/L Na₂VO₄, 1mmol/L PMSF, protease inhibitor cocktail) を加えて細胞を回収した。抽出したサンプルのタンパク量は Bradford 法を用いて定量し(37)、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。電気泳動後、転写装置を使用して polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写し、ブロッキング液 (Blocking One, ナカライテスク, 京都, 日本) で 30 分間ブロッキングした後、

4 °C、overnight で 1 次抗体反応を行った。使用した 1 次抗体は以下の通りで、
全て 1000 倍希釈で使用した。

- ・ 抗 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗リン酸化 ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 SERCA2 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 CHOP 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 BiP 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 IRE1α 抗体 (Novus Biologicals, USA)
- ・ 抗リン酸化 IRE1α (Ser 724) 抗体 (Novus Biologicals, USA)

Tween 20 含有リン酸緩衝液(T-PBS)で 10 分間、3 回洗浄した後、抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling) または抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling) を用いて室温で 2 時間、2 次抗体を反応させた。T-PBS で 10 分間、3 回洗浄した後、Supersignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) を加え化学発光させ、LAS 3000 IR (富士フイルム、東京、日本) でタンパクバンドの検出を行った。

第2節 実験動物と飼料

LE2KO を作製するために Cre-loxP システムを用いた。ERK2 flox マウスの作製は以前に報告された通りである(10)。肝臓特異的に組み換え酵素 Cre を発現して ERK2 を欠損させるために、肝臓特異的遺伝子であるアルブミンのプロモーター領域に Cre 発現ユニットを持つトランスジェニックマウス (Alb-Cre) を用意した。これらのマウスの交配により LE2KO を作製した。マウスは 10 世代以上 C57BL/6J と交配を繰り返して、遺伝的背景を揃えた。LE2KO に対する littermate の Control として 3 つの遺伝子型が存在し、Alb-Cre^(-/-); ERK2^(+/+) [wild-type (WT)], Alb-Cre^(+/-); ERK2^(+/+) (Alb-Cre)、Alb-Cre^(-/-); ERK2^(lox/lox) [ERK2^(lox/lox)]と記載した。

実験に使用するマウスは Specific Pathogen Free 環境下で、12 時間毎の明暗の照明の調節が行われている部屋で適切な温度、湿度の下、飼育管理された。通常食 (normal chow; NC) の固形飼料と飲料水は自由摂取とした。高脂肪・高ショ糖食 (high-fat/high-sucrose diet; HFHSD) は脂肪含量 30 % (v/v)、ショ糖含量 20 % (v/v) のものを実験に使用した (F2HFHSD; オリエンタル酵母, 日本, 表 1)。

本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の指針に基づいて施行した。

第3節 動物実験のプロトコール

雄の LE2KO と対照である littermate の Control (ERK2^{lox/lox}) を Control とした) を 8 週齢より 20 週間の NC 及び HFHSD による食事負荷を行い、①NC 摂取の Control、②NC 摂取の LE2KO、③HFHSD 摂取の Control、④HFHSD 摂取の LE2KO の 4 つのグループを作成した。食事負荷終了後、ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下で解剖を行い、血清を採取し、肝臓、大動脈等種々の臓器を摘出し、各種検討を行った。

第4節 血圧と脈拍数の測定

収縮期血圧と脈拍数の測定は食事負荷 19~20 週の時点で、tail-cuff 法 (MK-2000; 室町機械, 東京, 日本) により意識下マウスの尾動脈で非観血的に測定した(38)。

第5節 各組織のタンパク抽出とウエスタンブロット法

摘出後、-80 °C で保存していた各組織にタンパク質抽出緩衝液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Na₂EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 % NP-40, 2.5 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L β-glycerophosphate, 1 mmol/L Na₂VO₄, 1mmol/L PMSF, protease inhibitor cocktail) を加えホモジナイザーにより粉碎した。細胞破碎液を 13000 g、20 分間、4°C の条件で遠心を行い、タンパク質抽出液を採取した。抽出したサンプルのタンパク量は Bradford

法を用いて定量し(37)、SDS-PAGE を行った。電気泳動後、転写装置を使用して PVDF メンブレンに転写し、ブロッキング液 (Blocking One, ナカライテスク, 京都, 日本) で 30 分間ブロッキングした後、4 °C、overnight で 1 次抗体反応を行った。使用した 1 次抗体は以下の通りで、全て 1000 倍希釈で使用した。

- ・ 抗 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 SERCA2 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 CHOP 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗リン酸化 eIF2 α (Ser 51) 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 BiP 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 PERK 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗リン酸化 PERK (Thr 980) 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 JNK 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗リン酸化 JNK (Thr183/Tyr 185) 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 β アクチン抗体 (Cell Signaling Technology, USA)
- ・ 抗 IRE1 α 抗体 (Novus Biologicals, USA)
- ・ 抗リン酸化 IRE1 α (Ser 724) 抗体 (Novus Biologicals, USA)

- ・ 抗 endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 抗体 (BD Transduction Laboratories, NJ, USA)
- ・ 抗リン酸化 eNOS (Ser 1177) 抗体 (Upstate Biotechnology, USA)

T-PBS で 10 分間、3 回洗浄した後、抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling) または抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling) を用いて室温で 2 時間、2 次抗体を反応させた。T-PBS で 10 分間、3 回洗浄した後、Supersignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) を加え化学発光させ、LAS 3000 IR (富士フイルム、東京、日本) でタンパクバンドの検出を行った。

第 6 節 組織の採取、病理組織学的及び免疫組織化学的評価

ペントバルビタール麻酔下に開胸、開腹を行い、左心室より 0.9 %生理食塩水及び 4%パラホルムアルデヒドにより還流固定を行った。還流後、肝臓、心臓、大動脈、精巣上体周囲脂肪を採取し、10 %ホルマリン固定の後パラフィンで包埋し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin eosin; HE) 染色を行った。肝臓についてはパラフィン切片を用いて ERK2 (anti-ERK2 antibody; Abcam, Cambridge, UK) の免疫組織化学染色も行った。

第 7 節 血清パラメーターの測定

マウスを 14 時間の絶食後、血液を採取した。血糖値、血清総コレステロール (total cholesterol; TC)、中性脂肪 (triglyceride; TG)、高比重リポタンパク

(high-density lipoprotein cholesterol; HDL-C)、遊離脂肪酸 (free fatty acids; FFA)、alanine aminotransferase (ALT) は酵素法 (和光純薬, 大阪, 日本) を用いて測定した。血中インスリン値 (Mercodia, Sweden)、血清アディポネクチン値 (大塚製薬, 日本)、血清 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 値 (シバヤギ, 日本)、血清 interleukin-6 (IL-6) 値 (Invitrogen, CA, USA) は ELISA 法を用いて測定した。血清ホモシステイン値、asymmetric dimethylarginine (ADMA) は高速液体クロマトグラフィーにより測定した。また以下の式により、空腹時血糖値と空腹時血中インスリン値から homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) を算出した。HOMA-IR = 空腹時血糖値 (mg/dL) $\times$ 空腹時血中インスリン値 (μ U/mL) /405。

第 8 節 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT)、及び腹腔内インスリン負荷試験 (ITT)

OGTT はマウスを 14 時間の絶食後に D-グルコース (1.5 g/体重 kg) を、ゾンデを用いて経口投与した。血糖測定のために、糖負荷前と負荷後 15、30、60、120 分時に静脈より血液サンプルを採取した。

ITT は自由摂食中、随時にヒトレギュラーインスリン (Humulin R, Eli Lilly, USA; 0.75 U/体重 kg) をマウス腹腔内に投与した。血糖測定のために、インスリン負荷前と負荷後 20、40、60、120 分時に静脈血液サンプルを採取した。OGTT、ITT いずれにおいても area under the glucose-time curve (AUC) が計算され

た。

第 9 節 肝臓における脂質抽出と測定

肝臓内脂質は以前の報告された通り抽出した(39)。すなわち採取した肝臓を、3 mL/g 肝臓重量となるように生理食塩水を加えてホモジナイザーを用いて破碎した。PBS で 5 倍希釈後、中性脂肪では 1 %デオキシコール酸、コレステロールでは 0.25 %デオキシコール酸を加え、37 °C、5 分間可溶化した。中性脂肪、コレステロールは酵素法（和光純薬，大阪，日本）を用いて測定した。

第 10 節 血清中の過酸化物代謝物（Reactive Oxygen Metabolites; ROM）と抗酸化力（Biological Antioxidant Potential; BAP）の測定

採取した血液を遠心分離し、血清サンプルを得た。Free carpe diem (Wismerll, 東京, 日本) を使用して、derivatives of reactive oxygen metabolites (D-ROMs) テスト及び BAP テスト (Diacron, Grosseto, Italy) により血清 ROM 値、BAP 値を測定した(40)。ROM の測定単位は、1 CARR U が 0.8 mg/L H₂O₂ に相当する。

第 11 節 Real-Time RT-PCR による評価

採取した大動脈、肝臓から TRI Reagent (Sigma, St. Louis, USA) を用いて総 RNA を抽出して濃度測定を行った。SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA) を用いて相補的 DNA を生成し、これを鋳型として

Real-time RT-PCR を行い、肝臓 SERCA2、大動脈、NADPH oxidase (Nox) 1、Nox2、Nox4 の発現を評価した。装置は ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, CA, USA) を使用し、SYBR Green 法 (Power SYBR Green PCR Master Mix; Applied Biosystems, CA, USA) で行った。使用したプライマーの塩基配列は以下の通りである。内部標準としてのハウスキーピング遺伝子は 18S rRNA を使用した。

SERCA2b; forward, 5'-ATGAGCAAGATGTTTGTGAAGG-3';

reverse, 5'-CAGTGGGTTGTCATGAGTGG-3'.

Nox1; forward, 5'-CTACAGTAGAAGCCAACAGGCCAT-3';

reverse, 5'-ACTGTCACGTTTGGAGACTGGATG -3'.

Nox2; forward, 5'-CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT-3';

reverse, 5'-CAATCCCAGCTCCCCTAACATCA-3'.

Nox4; forward, 5'-GGATCACAGAAGGTCCCTAGCAG-3';

reverse, 5'-GCAGCTACATGCACACCTGAGAA-3'.

18S rRNA; forward, 5'-TTCCGATAACGAACGAGACTCT-3';

reverse, 5'-TGGCTGAACGCCACTTGTC-3'.

第 12 節 大動脈におけるスーパーオキシド産生の評価

摘出した肝臓は Tissue-Tek OCT に包埋し急速凍結した。新鮮凍結切片 (10

μm) を作製し、乾燥後、固定をせずに dihydroethidium (DHE: 2 μmol/L; Molecular Probes, USA) で遮光下、30 分間 incubation を行い、即座にスーパーオキシドの定量を行った(41)。画像は BZ-8000 (Keyence, 大阪, 日本) を用いて吸収波長 605 nm、励起波長 540 nm で描出した。

第 13 節 大動脈における H₂O₂ 産生量の測定

胸部大動脈を採取し、動脈周囲組織を十分に除去した。大動脈からの細胞外 H₂O₂ 放出は Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes) を用いて測定した(42)。5 mm 長の大動脈を Amplex red (50 μmol/L) 及び horseradish peroxidase (0.1 U/ml) を含む Krebs Ringer phosphate buffer (KRPB buffer; NaCl 145 mmol/L, Na₂HPO₄ 5.7 mmol/L, KCl 4.86 mmol/L, CaCl₂ 0.54 mmol/L, MgSO₄ 1.22 mmol/L, D-glucose 5.5 mmol/L, pH 7.35) で 37°C、30 分間 incubation した。incubation した大動脈を取り出し、excitation 530 nm、emission detection 590 nm で蛍光測定し、乾燥した大動脈組織重量比 (pmol/mg tissue) を算出した。

第 14 節 血管輪状切片の作成と血管弛緩反応測定

等張性張力実験による血管弛緩反応測定は以前に報告された方法で行った(43)。マウスから摘出した胸部大動脈を、血管内皮を保持するよう細心の注意を払いながら 3 mm の輪状標本にカットし、Krebs バッファー (NaCl 118.3

mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, D-glucose 5.5 mmol/L) の入っているチャンバー内の張力測定用のフックに吊るした。バッファーは 95 %O₂、5 %CO₂ の混合ガスを溶存させ、37 °Cを保った。

初期張力は 1.0 g とし、測定張力はトランスデューサーにて増幅し、ポリグラフ上に常に記録した。血管標本は、まず KCl (30 mmol/L) で刺激した後、L-フェニレフリン (10^{-6.5} mol/L) で前収縮させた。その後、測定張力が一定になってからアセチルコリン (ACh) (10⁻⁹ mol/L から 10⁻⁵ mol/L まで) を、濃度を漸増させながらチャンバー内に添加し、ACh による血管弛緩反応を濃度依存性曲線で表し、血管内皮依存性弛緩反応を評価した。また、血管平滑筋機能を評価するために、L-フェニレフリン (10^{-6.5} mol/L) で前収縮後、一酸化窒素 (nitric oxide; NO) ドナーである sodium nitroprusside (SNP) (10⁻⁹ mol/L から 10⁻⁵ mol/L まで) を使用し、NO に対する血管平滑筋弛緩反応 (内皮非依存性血管弛緩反応) を評価した。

第 15 節 統計学的解析

データは全て、平均 ± 標準誤差 (mean ± SE) で表記した。経時的データを有する体重、OGTT、ITT 及び血管弛緩反応の群間比較は two-way ANOVA 後、Bonferroni 法で post hoc を行った。多群間の統計値の比較は、one-way ANOVA

後に Bonferroni 法で post hoc を行った。全ての統計解析は GraphPad Prism Software Ver. 5.02 (San Diego, USA)を使用し、全ての検定において P 値 0.05 未満を統計学的有意と判定した。表記は* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、## $P < 0.01$ とした。

第3章 実験結果

第1節 結果 ①

肝臓 ERK2 を欠損させることにより脂肪肝とインスリン抵抗性が誘導されるか否かを検討した。

(1) 各 genotype における ERK2 タンパクの発現

最初に LE2KO において肝臓の ERK2 が欠損しているかを確認するため、8週齢時点の3つの Control と LE2KO において、肝臓、大動脈、心臓、腎臓、骨格筋、脳、精巣上体周囲脂肪の ERK2 のタンパク発現をウエスタンブロット法により評価した。図 4A に示すように、WT、Alb-Cre、ERK2^(lox/lox)の肝臓では ERK2 の発現に差を認めなかった。このことは loxP や Alb-Cre recombinase 遺伝子が ERK2 の発現に影響を与えないことを示している。一方、LE2KO の肝臓においては、ERK2 タンパクの発現の著名な減少を認めた (図 4A)。ERK2 タンパクがわずかに残存しているが、これは LE2KO が肝細胞特異的に ERK2 を欠損させているからであり、すなわち肝臓の肝細胞以外の細胞では ERK2 の発現は欠損されていないためタンパクバンドがわずかに残っていると考えられる。大動脈、心臓、腎臓、骨格筋、脳、脂肪組織においてはいずれの genotype においても ERK2 の発現量は同等であった (図 4A)。

また免疫組織化学染色でも肝臓の ERK2 タンパク発現量を確認したが、

LE2KO においてのみ発現の低下を認めた (図 4B)。

(2) 体重、body mass index (BMI)、血圧、心拍数に対する影響

20 週間の食事負荷を行った時の体重の経時的変化については、NC 群と比較し、HFHSD 群で有意な体重増加を示したが、各群においては Control と LE2KO の間で有意な差は認めなかった (図 5A)。また BMI、収縮期血圧、心拍数についても各群において Control と LE2KO の間に有意な差は認めなかった (図 5B-D)。

(3) 各臓器重量への影響

20 週間の食事負荷後、肝臓、腎臓、心臓、精巣上体周囲脂肪、腎周囲脂肪、脾臓の重量を測定し、比較した。前述の通り体重は各群において Control と LE2KO で同等の経時的推移を示したが、肝臓重量については HFHSD 負荷の Control と比較し LE2KO で有意な増加を示した (表 2)。その他の臓器については各群において有意な変化は見られなかった (表 2)。

(4) 脂肪肝進展に与える影響と肝臓内脂質含量の比較

20 週間の食事負荷終了後のマウスより摘出した肝臓の肉眼所見では、NC 群では Control と LE2KO に有意な変化は認めないが、HFHSD 群では Control と比較し LE2KO で有意な増大を認めた (図 6A)。

脂肪肝の組織学的評価を行うため肝臓の HE 染色を行った。NC 群では

Control、LE2KO ともに明らかな脂肪滴は確認できなかった (図 6B)。一方、HFHSD 負荷の Control では脂肪滴が散在しており、LE2KO ではさらなる脂肪滴の増加を認め、巨大な脂肪滴が多数みられた (図 6B)。

血清 ALT 値は HFHSD 負荷の Control と比較し LE2KO において、脂肪肝の進展の程度に一致して上昇を認めた (図 6C, NC 負荷 Control: 6.9 ± 0.5 IU/L [n = 11], HFHSD 負荷 Control: 20.3 ± 2.8 IU/L [n = 12], NC 負荷 LE2KO: 6.6 ± 0.4 IU/L [n = 11], HFHSD 負荷 LE2KO: 43.0 ± 6.1 IU/L [n = 12], $P < 0.001$ vs. HFHSD 負荷 Control)。

脂肪肝の定量評価のため、肝臓内脂質抽出を行い、肝臓内中性脂肪及び総コレステロールを測定し比較した。肝臓内中性脂肪は NC 群では差は見られないものの、HFHSD 群では Control と比較し LE2KO において有意に高値であった (図 6D, NC 負荷 Control: 51.9 ± 5.1 mg/g liver [n = 8], HFHSD 負荷 Control: 94.3 ± 2.8 mg/g liver [n = 8], NC 負荷 LE2KO: 63.1 ± 3.9 mg/g liver [n = 8], HFHSD 負荷 LE2KO: 129.8 ± 3.1 mg/g liver [n = 8], $P < 0.001$ vs. HFHSD 負荷 Control)。一方、肝臓内コレステロールは NC 群、HFHSD 群ともに Control と LE2KO の間に有意な変化は認めなかった (図 6E)。

(5) 耐糖能及びインスリン感受性への影響

耐糖能及びインスリン感受性を評価するため、OGTT と ITT を行った。OGTT

については、NC 群で Control と LE2KO で有意な変化は見られなかった。一方、HFHSD 群においては Control と比較し LE2KO で、糖負荷後 15 分、30 分、60 分値で有意な血糖値の上昇を認めた (図 7A)。さらに ITT ではインスリン負荷後 40 分、60 分、120 分値で有意なインスリンに対する血糖低下反応の減弱を認めた (図 7B)。また空腹時血中インスリン値、及び HOMA-IR についても、HFHSD 負荷 LE2KO で有意な上昇を認めた (図 7C, D)。このように肝臓 ERK2 の欠損により、通常の栄養状態においてではなく、肥満誘発性の高脂肪栄養状態においてのみ糖代謝変化が惹起されることが示された。

第 2 節 結果 ②

肝臓 ERK2 欠損時のインスリン抵抗性発症への ER ストレスの関与を検討した。

(1) 肝臓 SERCA2 のタンパク及び遺伝子発現への影響

肝臓 SERCA の発現低下は ER ストレスを引き起こし、代謝変化をもたらすことが以前に報告されていることから、本研究においても肝臓における SERCA2 のタンパク及び mRNA の発現を評価した。NC 群においては Control と LE2KO の間に有意な変化は認めなかったが、HFHSD 群においては Control と比較し LE2KO で有意な SERCA2 のタンパク発現の低下を認めた (図 8A)。SERCA2 の mRNA の発現についても、HFHSD 負荷 LE2KO で有意に低下し

ていた (図 8B)。

(2) 肝臓における ER ストレスへの影響

次に、HFHSD 負荷の LE2KO において肝臓の ER ストレスが亢進しているかを検証するために、ER 膜タンパクである PERK、IRE1 α のリン酸とそのシグナルの下流にある eIF2 α のリン酸化をウエスタンブロット法で評価した (図 9A)。NC 群では明らかな変化は見られなかったが、HFHSD 群においては Control と比較し LE2KO で有意に PERK、IRE1 α 、eIF2 α のリン酸化が亢進していた (図 9B-D)。また ER ストレス誘発性転写因子である CHOP と ER の分子シャペロンの一つである BiP の発現についても評価したが (図 9F)、HFHSD 負荷の Control と比較し LE2KO で有意な増加を認めた (図 9G, H)。JNK のリン酸化も同様に、HFHSD 負荷の LE2KO において有意な増加を認めた (図 9E)。これらの結果から HFHSD 負荷 LE2KO の肝臓では ER ストレスが亢進していることが示された。

第 3 節 結果 ③

肝臓 ERK2 欠損時の代謝変化が血管内皮障害を引き起こすか否かを検討した。

(1) 血清代謝パラメーターへの影響

肝臓 ERK2 欠損により生じる代謝変化を評価するため、血糖値、血清脂質、アミノ酸代謝物等の血清代謝パラメーターを測定し、比較した。空腹時血糖値、

随時血糖値は HFHSD 群において、Control と比較し LE2KO で有意な増加を認めた（表 3）。血清脂質については、各飼料群において TC、TG 及び HDL-C 値に有意な変化は認めなかったが、血清 FFA 値については HFHSD 群において Control に対し LE2KO で有意な上昇を認めた（表 3）。血管障害の危険因子である血清ホモシステイン及び ADMA については、同様に HFHSD 群において Control と比較し LE2KO で有意な上昇を示した（表 3）。

（2）血清 D-ROMs、BAP 値とサイトカインへの影響

血清中の全身酸化ストレス指標と炎症性サイトカインを検証した。酸化ストレスの指標である血清 D-ROMs 値は NC 群では有意な変化は見られなかったが、HFHSD 群では LE2KO において有意な増加を認め（図 10A）、抗酸化力の指標となる血清 BAP 値は減少を示した（図 10B）。炎症性サイトカインである血清 TNF- α と血清 IL-6 については、各飼料群において Control と LE2KO の間に有意な変化は認めなかった（図 10C, D）。

（3）脂肪細胞肥大への影響

精巣上体周囲脂肪の HE 染色を行い、脂肪細胞面積を測定し肥大化を評価した。NC 群では脂肪細胞の大きさに有意な変化は見られなかったが、HFHSD 群では Control と比較し LE2KO で有意な脂肪細胞の肥大化を認めた（図 11A, B）。それに伴い、アディポサイトカインの一つである血清アディポネクチンは

HFHSD 群において、Control と比較し LE2KO で有意な減少を認めた (図 11C)。

(4) 大動脈及び心臓の組織学的検討

HFHSD 負荷 LE2KO はインスリン抵抗性、耐糖能異常、高 FFA 血症、高ホモシステイン血症、全身酸化ストレスマーカーの上昇、低アディポネクチン血症等の血管障害性に働く危険因子を保有していることが明らかとなった。そこで血管に着目し、大動脈の形態、及び機能について評価を行った。

まず初めに大動脈、及び心臓の HE 染色により形態学的評価を行ったが、大動脈壁肥厚やプラークの形成等は見られず (図 12A)、心臓についても肥大等の変化は認めなかった (図 12A, B)。

(5) 大動脈におけるスーパーオキシド産生及び H_2O_2 産生の評価

マウスの胸部大動脈を用いて、DHE 染色による血管スーパーオキシド産生と Amplex Red Assay による血管 H_2O_2 産生を評価した。血管スーパーオキシド産生については、NC 群では Control と LE2KO の間で有意な変化は認めなかったが、HFHSD 群においては Control と比較し LE2KO で約 1.8 倍のスーパーオキシドの産生亢進を認めた (図 13A,B, NC 負荷 Control: 2.1 ± 0.1 a.u. [n = 5], HFHSD 負荷 Controls: 2.2 ± 0.2 a.u. [n = 6], NC 負荷 LE2KO: 2.1 ± 0.1 a.u. [n = 5], HFHSD 負荷 LE2KO: 4.0 ± 0.3 a.u. [n = 6], $P < 0.001$ vs. HFHSD 負荷 Control)。Amplex Red Assay では、同様に HFHSD 負荷 LE2KO で大動脈 H_2O_2

産生の亢進がみられ、スーパーオキシド産生が亢進していることを反映していると考えられた (図 13C, NC 負荷 Control: 86.95 ± 3.44 pmol/mg aorta [n = 8], HFHSD 負荷 Controls: 95.09 ± 5.52 pmol/mg aorta [n = 8], NC 負荷 LE2KO: 87.31 ± 6.42 pmol/mg aorta [n = 8], HFHSD 負荷 LE2KO: 134.7 ± 3.54 pmol/mg aorta [n = 8], $P < 0.001$ vs. HFHSD 負荷 Control)。

(6) 大動脈における Nox の isoform 別の遺伝子発現の検討

HFHSD 負荷 LE2KO の大動脈ではスーパーオキシドの産生が亢進していることが示されたが、ここではスーパーオキシドの産生源である Nox の各 isoform の遺伝子発現について Real-Time PCR 法により検証を行った。Nox1、Nox4 の遺伝子発現に関しては、NC 群では有意な変化は見られなかったが、HFHSD 群においては Control と比較し LE2KO で有意な発現の増加を認めた (図 14A, C)。一方、Nox2 の遺伝子発現については各飼料群において Control と LE2KO の間で有意な変化は見られなかった (図 14B)。

(7) 血管内皮機能の評価と eNOS のリン酸化の検討

摘出マウス大動脈で作成した輪状切片を用いて、オーガンチャンバーによる血管内皮機能の評価した。ACh による内皮依存性血管弛緩反応は、NC 群では Control と LE2KO の間に有意な変化は認めなかったが、HFHSD 群では Control と比較し LE2KO において有意な内皮依存性血管弛緩反応の減弱を認めた (図

15A, NC 負荷 Control: 67.5 ± 5.2 % [n = 10], HFHSD 負荷 Control: 59.3 ± 5.2 % [n = 10], NC 負荷 LE2KO: 68.7 ± 4.4 % [n = 9], HFHSD 負荷 LE2KO: 33.2 ± 8.4 % [n = 9], ACh 10^{-6} M, $P < 0.01$ vs. HFHSD 負荷 Control)。一方、SNP による内皮非依存性血管弛緩反応は、NC 群、HFHSD 群いずれにおいても Control と LE2KO の間で有意な変化は見られなかった (図 15B)。

次にマウス胸部大動脈における eNOS のリン酸化 (セリン 1177) をウエスタンブロット法で検証した (図 15C)。eNOS のセリン 1177 のリン酸化はその酵素触媒活性に非常に重要な役割を担っているが、HFHSD 負荷の LE2KO において eNOS セリン 1177 のリン酸化の著名な減少を認めた (図 15C)。これらの結果から、HFHSD 負荷 LE2KO の内皮依存性血管弛緩反応の減弱は eNOS 機能の低下と関連していることが示唆された。

第4章 考察

本研究は ORD モデルマウスにおいて肝臓 ERK2 の脂肪肝の進展や代謝変化に対する役割を初めて *in vivo* で検証したものである。HFHSD 負荷の条件において肝臓 ERK2 が欠損することにより、脂肪肝の進展と耐糖能・インスリン感受性の低下が惹起され、血清 FFA、ホモシステイン、ADMA の上昇と血清アディポネクチンの低下が誘導されることが示された。肝臓の代謝変化の分子機序を解明するため、インスリン抵抗性との関連が注目されている ER ストレスを誘導する主要分子の一つである肝臓 SERCA2 のタンパク発現及び遺伝子発現をウェスタンブロットと Real-Time PCR で評価したところ、HFHSD 負荷の下、Control と比較し LE2KO において有意な発現の低下を認めた。また、ER ストレスマーカーである肝臓の BiP や CHOP のタンパク発現は有意に増加しており、これらの結果から肝臓において ER ストレスが誘導されたことが示唆された。さらに脂肪肝に随伴する代謝変化が血管機能に与える影響を評価するために、NO/reactive oxygen species (ROS) のバランスについて検討した。DHE 染色により評価した大動脈スーパーオキシド産生は HFHSD 負荷 Control と比較し LE2KO において有意に増加しており、大動脈における eNOS のセリン 1177 のリン酸化は HFHSD 負荷の LE2KO において有意に減弱していた。また血管内皮機能を反映する内皮依存性血管弛緩反応は HFHSD 負荷の Control では維持

されていたが、LE2KO では有意に低下していた。これらの結果から、肝臓 ERK2 は ER ストレス起因性の脂肪肝の進展、及び代謝の増悪、さらには血管内皮機能障害に対して保護的な役割を果たしていることが示された (図 16)。Jager らは肥満モデルである *ob/ob* マウスの遺伝子を基盤にした全身 ERK1 欠損マウスを作成し、ERK1 の肥満関連インスリン抵抗性に対する影響を検討したところ、コントロールに比べ ERK1 欠損マウスでは耐糖能障害、インスリン抵抗性、脂肪肝の程度は軽度であったと報告している(15)。その機序は末梢脂肪組織における炎症の抑制と骨格筋での糖取り込みの増加によるものであった。本研究では反対の結果が得られ、肝臓 ERK2 欠損が脂肪肝、糖代謝を増悪させたが、前述の実験と異なる点は標的が ERK1 か ERK2 かの違いと、欠損が全身なのか臓器特異的なのかということである。ERK1 欠損マウスでは、病態の根源において ERK1 が欠損し、それにより影響をうける種々の臓器においても ERK1 が欠損しており、マウスの表現型に対しどの ERK1 欠損が最も影響を与えているのが不明である。前述の検討では、末梢の脂肪組織、骨格筋、血管内皮等の ERK1 欠損が表現型に大きく影響した事が想定される。本研究では肝臓特異的な ERK2 の欠損であり、影響を受け得る種々の臓器では ERK2 は正常に発現しているため、因果関係がより明白であり、その結果の意義は大きい。

今回の実験では、HFHSD 負荷 LE2KO において ERK2 欠損により ER スト

レスが強く誘導されたことが明らかとなった。ER は細胞小器官の一つであり、 Ca^{2+} のホメオスターシスやタンパクの折りたたみに関わっているだけでなく、脂質合成やタンパク合成の調節を行っている。SERCA2 は ER 内の Ca^{2+} 濃度を維持しており、SERCA2 活性が遺伝子レベルまたはタンパク質レベルで消失あるいは低下した場合に ER ストレスが惹起される。細胞はそのストレスから回避するために UPR が誘導される(44-46)。Liang らは以前に、インスリン抵抗性マウスモデル由来のマクロファージにおいて MEK/ERK シグナルの減弱により SERCA の発現が低下し、ER ストレスが促進することを報告したが(36)、この結果は、ERK2 欠損が SERCA2 発現を低下させ及び ER ストレスを誘導するという本研究の実験結果と矛盾しない。Park らは、*ob/ob* マウスの肝臓は脂肪肝と ER ストレスを呈して、それに随伴して SERCA2 の発現量が著明に低下していることを確認し、さらに同マウスで SERCA2 を過剰発現すると ER ストレスと脂肪肝が改善することを実証した(35)。また Ozcan らは、肥満は ER ストレスを誘導し、インスリン抵抗性や T2DM への進展において中心的な役割を果たしていることを示した(34)。さらに UPR の主要な経路の一つである IRE1 α は JNK を活性化することが知られているが(47)、本研究の実験結果もこれに一致するように HFHSD 負荷 LE2KO の肝臓で、IRE1 α と JNK のリン酸化が増強していた。JNK はインスリン抵抗性誘発の主要因子であり、その機序の一つと

して IRS のセリン残基のリン酸化による抑制とそれに伴う蛋白分解が広く知られている。以上のことから、HFHSD 負荷 LE2KO において肝臓 SERCA2 の発現低下が IRE1 α 、そして JNK を活性化して、結果としてインスリン抵抗性へ進展したと結論付けた。

脂肪肝と心血管系の臓器連関を研究するために HFHSD 負荷 LE2KO は理想的なモデルになり得ると考えられる。すなわち肥満・脂肪肝から生じるインスリン抵抗性の下、血糖値、血清 FFA 値の上昇は酸化ストレスを惹起し、二次的に血管内皮機能が低下する事が考えられる。さらに HFHSD 負荷 LE2KO では Control と比較し、軽度ではあるが血清ホモシステイン値、及び血清 ADMA 値の上昇が見られたが、これらも血管内皮機能障害に寄与する可能性が考えられた(48-50)。また、血管病を惹起しうる肝臓由来の他のメディエーターが関与した可能性もある。ER ストレスを伴っている脂肪肝からは炎症性サイトカインやアディポサイトカインの放出に変化が生じている可能性や、肝臓からの microparticle(51)やそれに含まれる micro-RNA(52-56)も血管機能不全のメディエーターとなった可能性がある。今回の実験では炎症性サイトカインである血清 TNF- α と血清 IL-6、及びアディポサイトカインの一つである血清アディポネクチンを測定したが、前 2 者には増加する傾向は有るが有意な変化は見られなかったが、後者では有意な減少が認められ、これらが血管内皮機能障害を惹

起する一つの原因となった可能性が考えられた。HFHSD 負荷の LE2KO に関してさらなる検討がなされれば、ORD における肝・血管連関に関わる新しいメディエーターが解明されるかもしれない。

上述したように、HFHSD 負荷 LE2KO は血管障害を引き起こす複数の危険因子を保有していることが分かった。今回、本研究で観察し得た大動脈スーパーオキシド産生の増加と血管内皮機能障害には密接な関係がある。酸化ストレスは血管において複数の機序により NO bioavailability を妨げる(57)。また、多くの血管病においてスーパーオキシドあるいは ROS による NO の不活化が生じている（図 17）(58, 59)。本研究では大動脈の ROS の産生源について、ROS 産生源の一つである Nox に着目し、isoform 別の遺伝子の発現量を検討した。HFHSD 負荷 LE2KO では大動脈 Nox1 及び Nox4 の発現が増加しており、このことは以前に報告された結果と矛盾しない所見であった(60)。その他に、高血糖や血清 FFA 値の上昇がミトコンドリアの電子伝達系においてスーパーオキシドを産生させることが知られており、それに伴う酸化物質が代謝や血管における病態形成に関与した可能性も示唆される(61, 62)。Brownlee らによれば、代謝ストレスにより生じるミトコンドリアのスーパーオキシドはいくつかの代謝経路に影響を与えることを報告している。その一つが eNOS のセリン 1177 のグルコサミンによる修飾である(63, 64)。また、血管内皮での eNOS uncoupling は

高血糖や種々の代謝性疾患においてテトラヒドロbiopterinが酸化されることにより生じるが、スーパーオキシド産生や血管内皮機能障害の原因になることが報告されている(65)。当検討でも、内皮機能の低下やeNOSのセリン1177のリン酸化の減弱が観察され、これらの機序がHFHSD負荷LE2KOのスーパーオキシド産生増加と血管内皮機能障害に関連したと考えられた。

本研究ではORDマウスモデルにおける肝臓ERK2の役割を検証するためにLE2KOを用いて実験を行ったが、LE2KOの表現型はヒトのORDとの共通点が多いことが分かった。例えばMetSの患者は、内臓脂肪蓄積とインスリン抵抗性を基盤として高血圧、高血糖、脂質異常症などの複数の代謝異常を保有しており、これらはやがて血管機能障害や動脈硬化を惹起し、最終的には心血管疾患や心血管死に至るわけである。HFHSD負荷LE2KOは血中インスリン値の上昇と脂肪肝を伴うインスリン抵抗性や糖尿病を発病し、血管内皮機能障害に至ることが明らかとなり、MetSと同様の時間経過をたどることが示された。しかしながら本研究では、血管障害に至る細かい機序についてまでは十分に解明することができなかったが、このモデルを使用してさらに研究が進められれば、糖尿病あるいは脂肪肝から血管内皮機能障害が生じる分子機序や病態が解明される可能性があると考えられた。

LE2KOにおいて肝臓SERCA2の発現低下に関連してERストレスが誘導さ

れたが、この現象が脂肪肝とそれに続発する血管合併症の病態形成に関与したことを説明し得ると考えられる。足立らは以前に、血管平滑筋において **SERCA2** の不活性化により **NO** の生理活性が低下し、動脈硬化性疾患や糖尿病における血管合併症の原因となることを示した。**SERCA2** が抑制されることは心不全、血栓症、血管リモデリングの促進、血管新生の低下に関し重要な要因であることが知られている(66, 67)。本研究では、肝臓 **ERK2** により肝臓 **SERCA2** の発現が維持され、それにより代謝及び血管内皮機能が保護されることが示された。このように肝臓 **ERK2/SERCA2** を維持することが **ORD** における脂肪肝、酸化ストレス、代謝変化、ひいては血管合併症に対しての新しい治療戦略となり得ることが示唆された。

第5章 結論

肝臓 ERK2 は HFHSD 負荷の条件において、脂肪肝の進展とインスリン抵抗性を抑制し、糖・脂質代謝調節によって代謝リモデリングと酸化ストレスを抑制し、さらには血管内皮機能を維持することが示された。肝臓 ERK2 による代謝リモデリング抑制機序として、肝臓 SERCA2 発現の維持による ER ストレスの抑制が関与していることが考えられた。これらのことから、肝臓 ERK と SERCA 活性を維持することは ORD 患者における心血管疾患に対しての治療戦略となり得ることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、直接御指導を頂きました防衛医科大学校内科学講座教授 足立健先生に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に御支援頂いた防衛医科大学校麻酔学講師 佐藤泰司先生を初め、多くの先生方に深く御礼申し上げます。また、本研究の遂行に御協力頂いた研究室の教官、研究科生、実験技官、秘書の皆様方にも深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2052-9.
2. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell.* 2000;6:87-97.
3. Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Aleman JO, Suzuki R, et al. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab.* 2008;7:125-34.
4. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* 2008;7:95-6.
5. Pouyssegur J, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem.* 2003;270:3291-9.
6. Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, et al. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling

pathways. *Science*. 1993;260:1953-5.

7. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2004;14:311-7.

8. Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12759-64.

9. Satoh Y, Endo S, Ikeda T, Yamada K, Ito M, Kuroki M, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory. *J Neurosci*. 2007;27:10765-76.

10. Satoh Y, Endo S, Nakata T, Kobayashi Y, Yamada K, Ikeda T, et al. ERK2 contributes to the control of social behaviors in mice. *J Neurosci*. 2011;31:11953-67.

11. Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9:753-62.

12. Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F, Riou JP, et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and

increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. Diabetes. 2003;52:1319-25.

13. Carlson CJ, Koterski S, Sciotti RJ, Poccard GB, Rondinone CM. Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. Diabetes. 2003;52:634-41.

14. Bashan N, Dorfman K, Tarnowski T, Harman-Boehm I, Liberty IF, Bluher M, et al. Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity. Endocrinology. 2007;148:2955-62.

15. Jager J, Corcelle V, Gremeaux T, Laurent K, Waget A, Pages G, et al. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. Diabetologia. 2011;54:180-9.

16. Clavreul N, Bachschmid MM, Hou X, Shi C, Idrizovic A, Ido Y, et al. S-glutathiolation of p21ras by peroxynitrite mediates endothelial insulin resistance caused by oxidized low-density lipoprotein. Arterioscler Thromb

Vasc Biol. 2006;26:2454-61.

17. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-7.

18. Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;42:473-80.

19. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Zoppini G, Falezza G. Relation of nonalcoholic hepatic steatosis to early carotid atherosclerosis in healthy men: role of visceral fat accumulation. *Diabetes Care*. 2004;27:2498-500.

20. Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1045-50.

21. Kim HC, Kim DJ, Huh KB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and carotid intima-media thickness according to the presence of metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2009;204:521-5.

22. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in

subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*. 2006;29:1325-30.

23. Fracanzani AL, Burdick L, Raselli S, Pedotti P, Grigore L, Santorelli G, et al. Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Med*. 2008;121:72-8.

24. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2005;54:3541-6.

25. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999;397:271-4.

26. Li M, Baumeister P, Roy B, Phan T, Foti D, Luo S, et al. ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol*. 2000;20:5096-106.

27. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 2000;287:664-6.

28. Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, Welihinda A, Kaufman RJ. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2000;14:2725-36.
29. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 2000;6:1099-108.
30. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J.* 2002;366:585-94.
31. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107:881-91.
32. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 2002;16:1345-55.

33. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest*. 2002;109:525-32.
34. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306:457-61.
35. Park SW, Zhou Y, Lee J, Ozcan U. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:19320-5.
36. Liang CP, Han S, Li G, Tabas I, Tall AR. Impaired MEK Signaling and SERCA Expression Promote ER Stress and Apoptosis in Insulin-Resistant Macrophages and Are Reversed by Exenatide Treatment. *Diabetes*. 2012;61:2609-20.
37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
38. Niida T, Isoda K, Kitagaki M, Ishigami N, Adachi T, Matsubara O, et al. IkappaBNS regulates interleukin-6 production and inhibits neointimal

formation after vascular injury in mice. *Cardiovasc Res.* 2012;93:371-9.

39. Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT, Briand F, Delerive P, Huet S, et al. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:781-6.

40. Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Hamaoka K. Dynamics of reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in the acute stage of Kawasaki disease. *Circ J.* 2011;75:2453-9.

41. Miller FJ, Jr., Guttermann DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res.* 1998;82:1298-305.

42. Weber DS, Rocic P, Mellis AM, Laude K, Lyle AN, Harrison DG, et al. Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H37-42.

43. Dong YF, Liu L, Kataoka K, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, et al. Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2010;53:180-91.

44. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:519-29.
45. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:739-89.
46. Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:399-425.
47. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;420:333-6.
48. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trollet M, et al. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 2000;106:483-91.
49. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev.* 2010;6:82-90.
50. Yamagishi S, Ueda S, Nakamura K, Matsui T, Okuda S. Role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in diabetic vascular complications. *Curr Pharm Des.* 2008;14:2613-8.

51. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol.* 2008;173:1210-9.
52. Norata GD, Pinna C, Zappella F, Elia L, Sala A, Condorelli G, et al. MicroRNA 143-145 deficiency impairs vascular function. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;25:467-74.
53. Lorenzen J, Kumarswamy R, Dangwal S, Thum T. MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications. *RNA Biol.* 2012;9:820-7.
54. Chen K, Fan W, Wang X, Ke X, Wu G, Hu C. MicroRNA-101 mediates the suppressive effect of laminar shear stress on mTOR expression in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427:138-42.
55. Qin B, Xiao B, Liang D, Li Y, Jiang T, Yang H. MicroRNA let-7c inhibits Bcl-xl expression and regulates ox-LDL-induced endothelial apoptosis. *BMB Rep.* 2012;45:464-9.
56. Iaconetti C, Polimeni A, Sorrentino S, Sabatino J, Pironti G, Esposito G, et al. Inhibition of miR-92a increases endothelial proliferation and migration in vitro as well as reduces neointimal proliferation in vivo after

vascular injury. *Basic Res Cardiol*. 2012;107:296.

57. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840-4.

58. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84:1381-478.

59. Sugamura K, Keaney JF, Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*. 2011;51:978-92.

60. San Martin A, Du P, Dikalova A, Lassegue B, Aleman M, Gongora MC, et al. Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H2073-82.

61. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-20.

62. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107:1058-70.

63. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*.

2001;108:1341-8.

64. Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic RD, Daumerie G, Fulton D, et al. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *J Clin Invest*. 2000;106:493-9.

65. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001;88:E14-22.

66. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C, et al. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*. 2004;10:1200-7.

67. Adachi T. Modulation of vascular sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in cardiovascular pathophysiology. *Adv Pharmacol*. 2010;59:165-95.

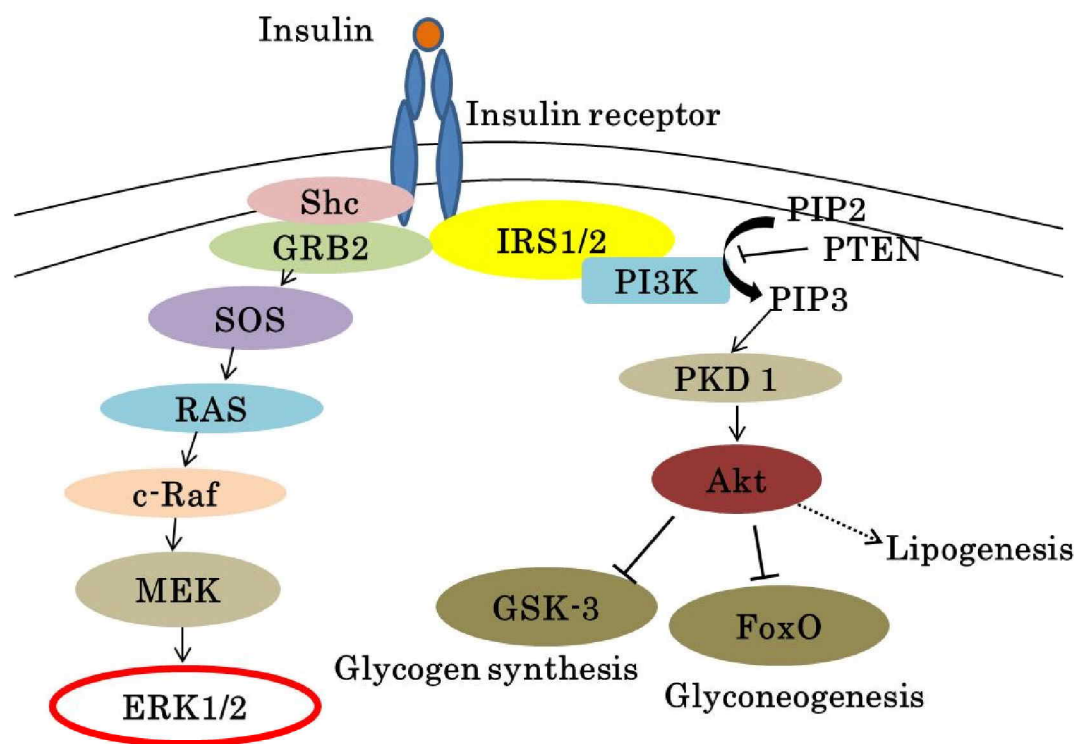


図1. 肝臓インスリンシグナルのRAS/Raf/MEK/ERK経路とIRS/PI3K/Akt経路

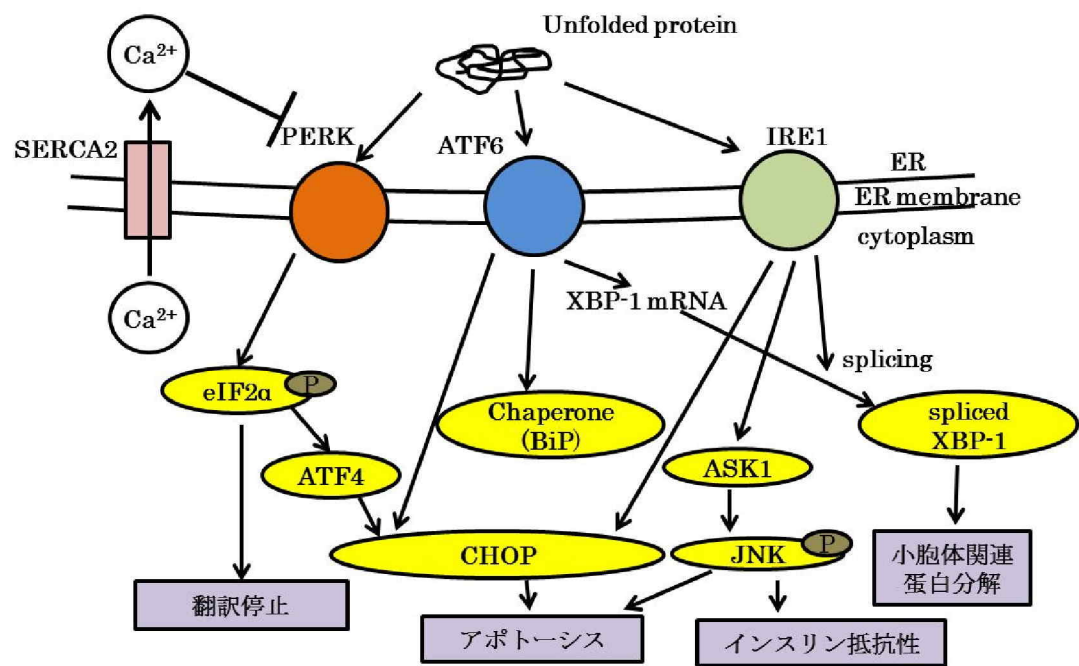


図2. ERストレス応答経路

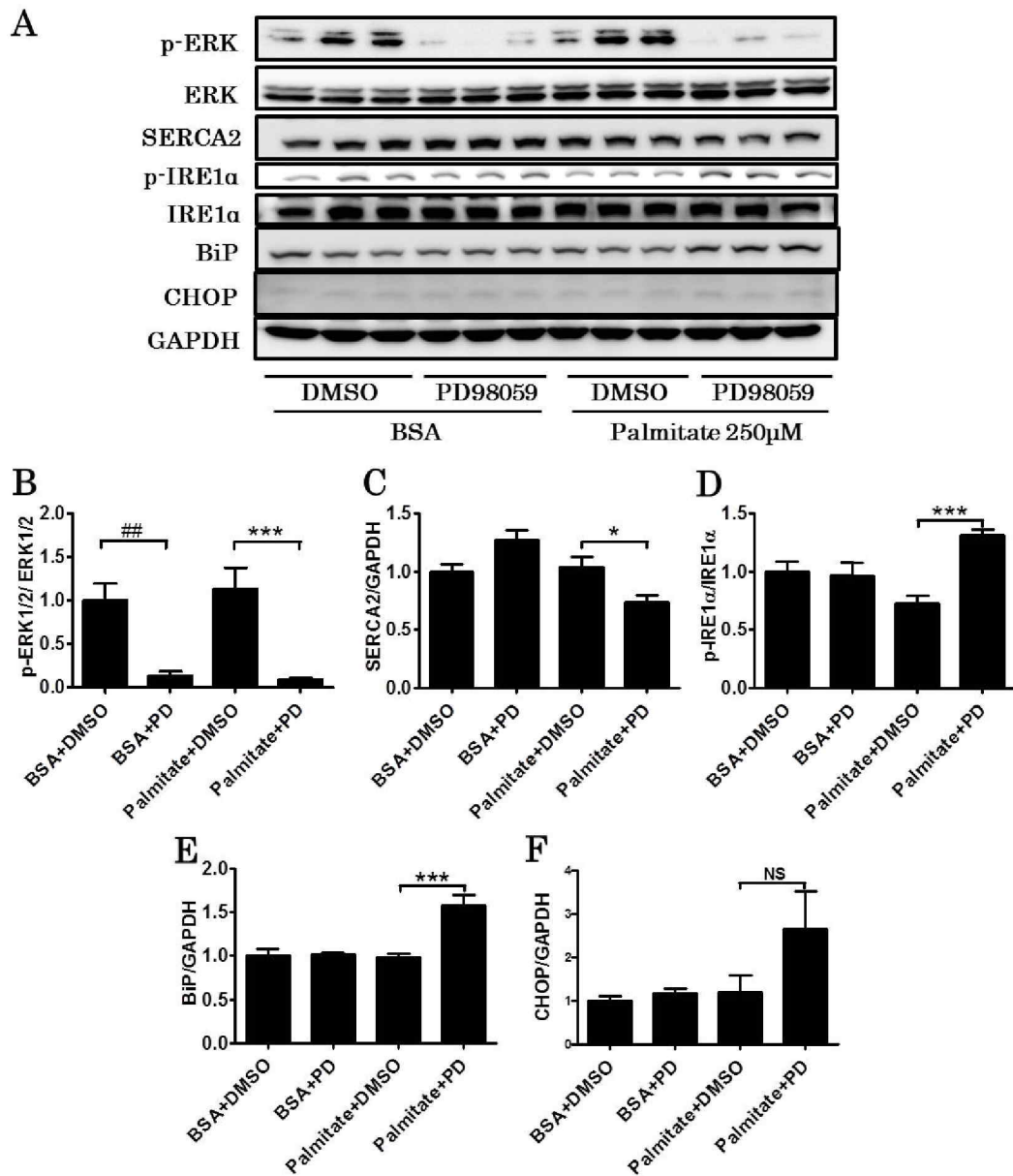


図3. *In vitro*における肝臓ERKとERストレスの関連

A : ウェスタンブロット法によるリン酸化ERK1/2、SERCA2、リン酸化IRE1α、BiP、CHOPの検出
B-F : ERK1/2、IRE1αのリン酸化及びSERCA2、BiP、CHOPの定量評価 (n=6)

パルミチン酸負荷下においてMEK阻害剤投与群は非投与群と比較し、SERCA2蛋白発現の低下を来し、ERストレスを亢進させる。

A

CE-7	g/100g	kcal %
Total Calories	343 kcal	
Protein	17.7 g	20.6
Fat	3.8 g	10.0
Carbohydrate	59.4 g	69.4

B

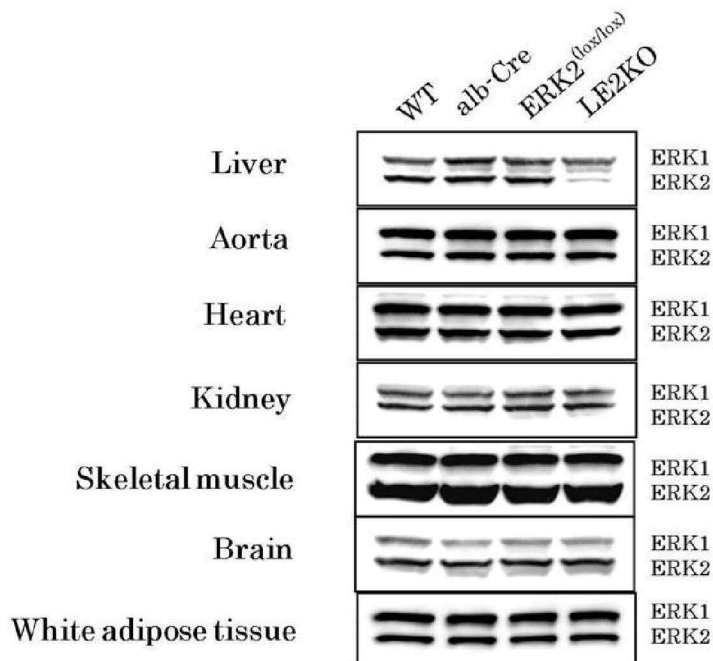
F2HFHSD	g/100g	kcal %	
Total Calories	481kcal		
Protein	20.7g	17.2	
Fat	29.1g	54.5	
Carbohydrate	34.0g	28.3	
Ingredient			
Casein	25.0%	Cellulose	5.0%
α -Corn Starch	14.869%	Vitamin Mix(AIN-93)	1.0%
Sucrose	20.0%	Mineral Mix(AIN-93G)	3.5%
Beef Tallow	14.0%	Choline Bitartrate	0.25%
Lard	14.0%	tert-Butylhydroquinone	0.006%
Soybean Oil	2.0%	L-Cystine	0.375%

表1. NC及びHFHSDの組成

A : NCの組成

B : HFHSDの組成

A



B

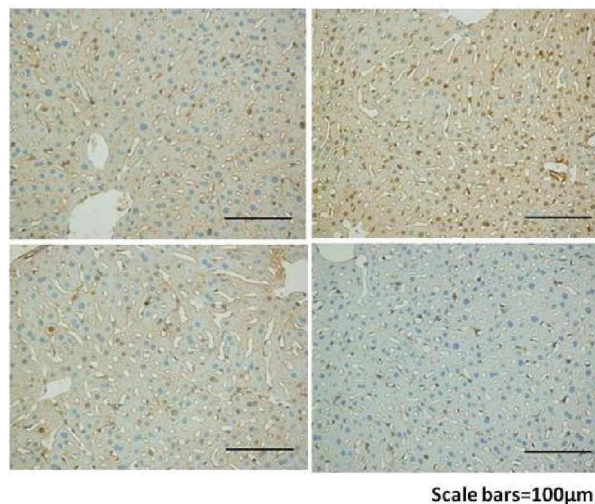


図4. 各genotypeにおけるERK2タンパクの発現

A : ウェスタンブロット法による、8週齢の各genotypeにおける 肝臓、大動脈、心臓、腎臓、骨格筋、脳、精巣上体周囲脂肪でのERK2タンパク発現の検討

B : 各genotypeの肝臓におけるERK2の免疫組織化学染色

左上 : WT、右上 : Alb-Cre、左下 : ERK2^(lox/lox)、右下 : LE2KO

Scale bars: 100 μm

ウェスタンブロット法、免疫組織化学染色において、LE2KOの肝臓におけるERK2タンパクの発現は、3つのControlと比較し著名な減少を認めた。

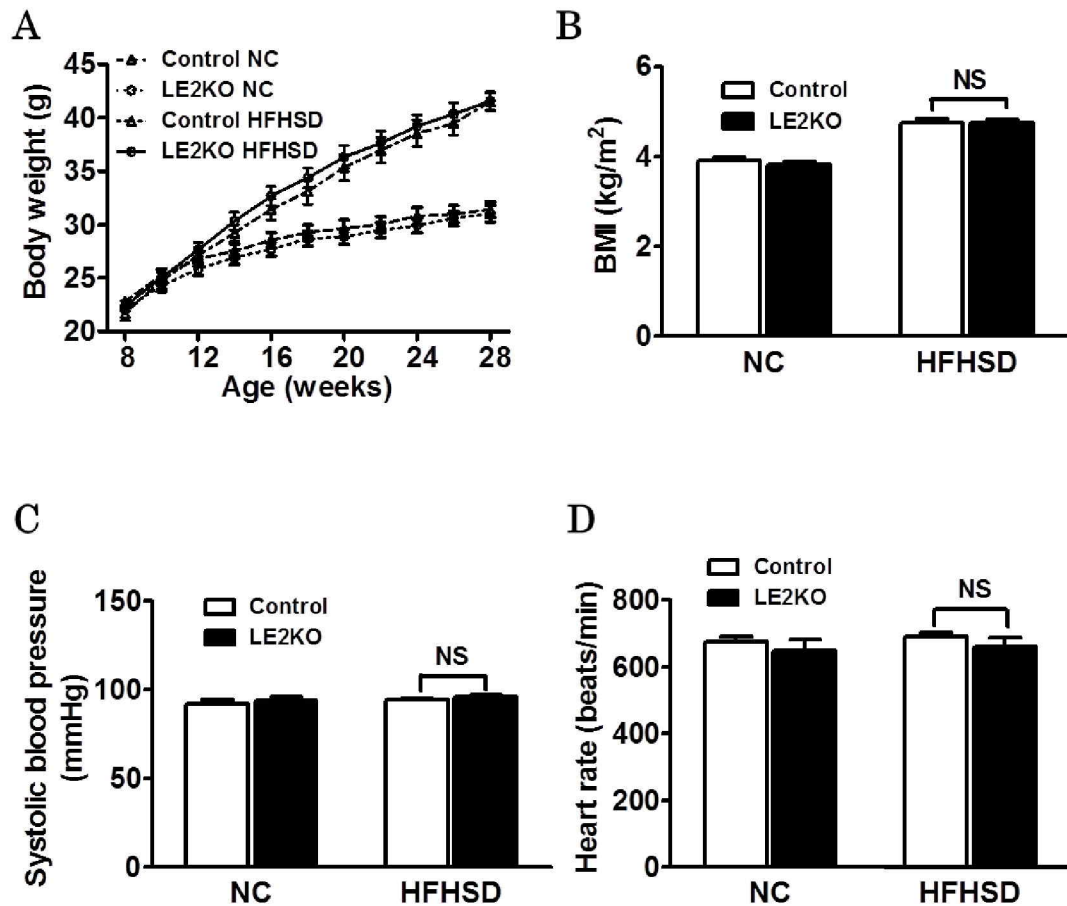


図5. 体重、BMI、血圧、心拍数に対する影響

A: 20週間のNC及びHFHSD負荷を行っている時の体重の経時的変化 (n = 13)

B: 20週間の食事負荷終了時点でのBMI値 (n = 13)

C: 20週間の食事負荷終了時点での収縮期血圧値 (n = 5-6)

D: 20週間の食事負荷終了時点での心拍数 (n = 5-6)

体重、BMI、血圧、心拍数に関して、NC群とHFHSD群において、ControlとLE2KOの間に有意な変化は認めなかった。

	NC		HFHSD	
	Control	LE2KO	Control	LE2KO
Liver (mg)	1045.6 ± 14.3	1039.3 ± 14.1	1272.9 ± 53.1	1692.7 ± 111.1 ^{***}
Kidney (mg)				
Right	182.9 ± 5.9	188.0 ± 4.6	204.6 ± 7.3	197.3 ± 4.9
Left	177.5 ± 4.9	176.6 ± 5.1	194.2 ± 6.2	199.6 ± 4.8
Heart (mg)	136.8 ± 4.3	135.3 ± 3.3	143.0 ± 3.4	148.9 ± 3.4
Epidydimal fat (mg)	389.3 ± 101.1	415.8 ± 47.7	1305.6 ± 83.6	1257.7 ± 31.6
Perirenal fat (mg)	222.7 ± 20.8	239.3 ± 15.8	660.5 ± 22.4	645.7 ± 3.7
Spleen (mg)	77.0 ± 3.6	73.1 ± 3.2	102.7 ± 4.8	120.1 ± 6.9

(n = 9-12)

表2. 肝臓、腎臓、心臓、精巣上体周囲脂肪、腎周囲脂肪、脾臓の臓器重量への影響

HFHSD群において、Controlと比較しLE2KOで肝臓重量の有意な増加を認めた。
その他の臓器重量には有意な変化は認めなかった。

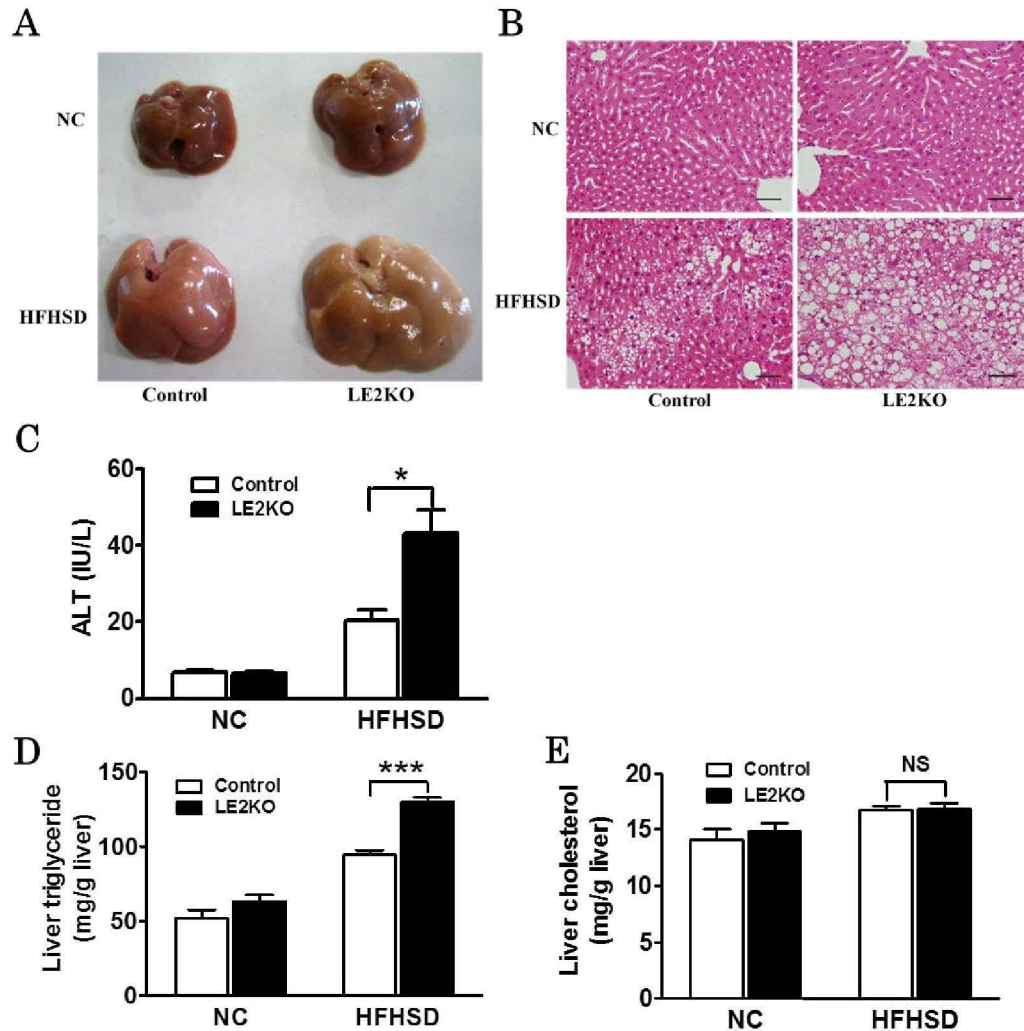


図6. 脂肪肝進展への影響と肝臓内脂質含量の比較

A : 20週間の食事負荷終了時点での肝臓の肉眼所見
 B : 20週間の食事負荷終了時点での肝臓のHE染色
 C : 20週間の食事負荷終了時点での血清ALT値 (n=11-12)
 D : 肝臓内中性脂肪含量の定量 (n=8)
 E : 肝臓内総コレステロール含量の定量 (n=8)

HFHSD負荷LE2KOではControlと比較し、有意な肝臓の増大、肝臓内脂肪滴の増加、血清ALT値の上昇を認めた。肝臓内脂質定量では中性脂肪優位に増加していた。

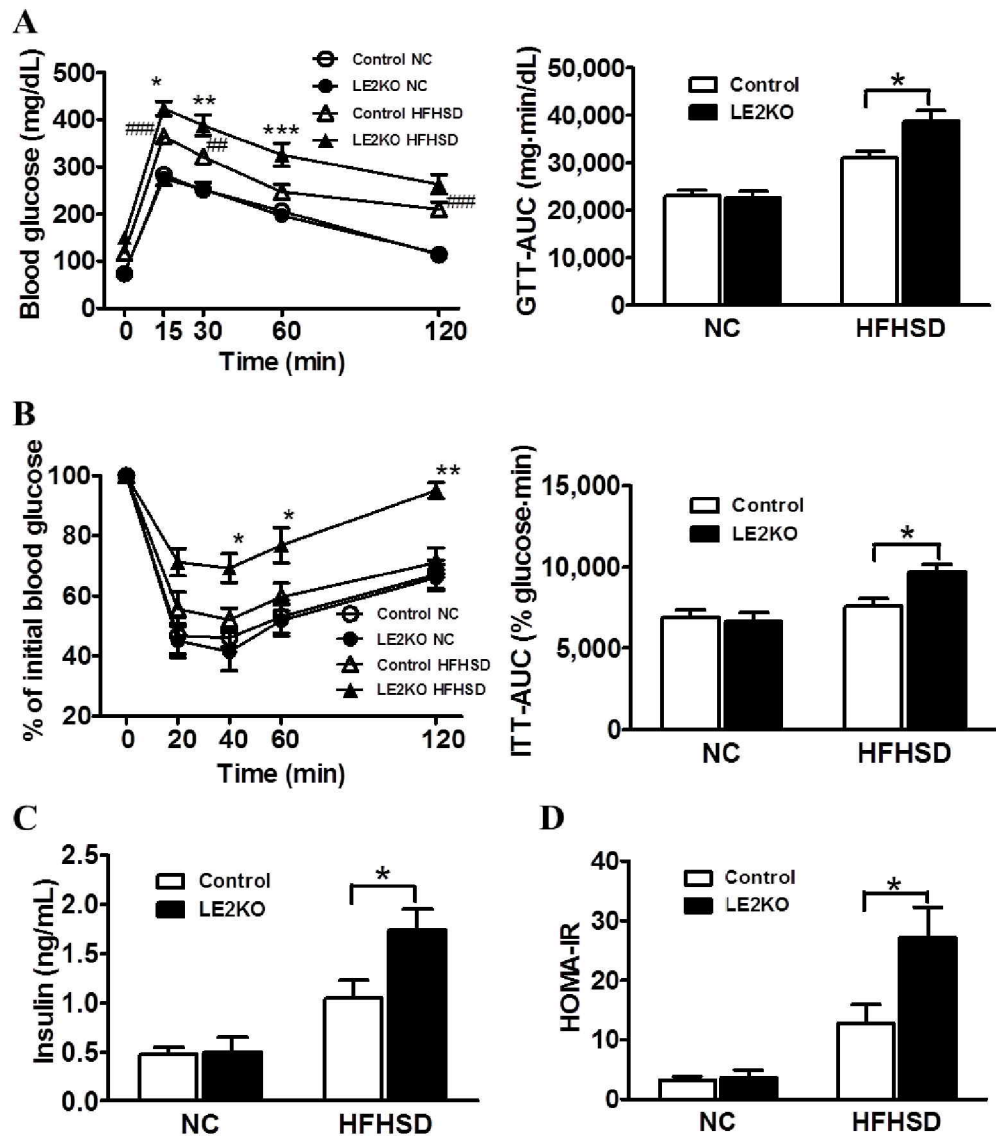


図7. 耐糖能及びインスリン感受性への影響

A : OGTTによる耐糖能の評価とAUCの比較 (n=9-10)

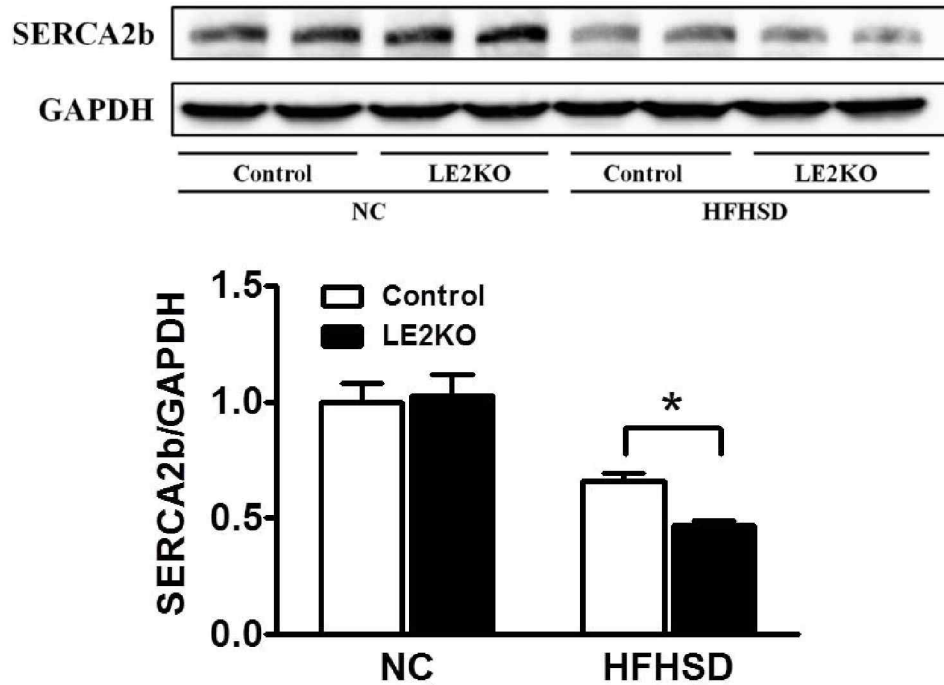
B : ITTによるインスリン感受性の評価とAUCの比較 (n=9)

C : 空腹時血中インスリン値の比較 (n=9-12)

D : HOMA-IR値の比較 (n=8-10)

HFHSD負荷LE2KOではControlと比較し、耐糖能異常及びインスリン感受性の低下を示した。

A



B

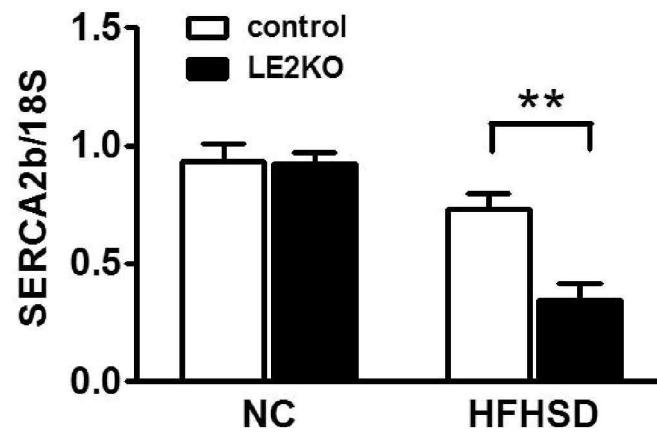


図8. 肝臓におけるSERCA2のタンパク及び遺伝子発現への影響

A : ウェスタンブロット法による肝臓SERCA2タンパク発現の検討 (n = 10)

B : Real-Time PCR法による肝臓SERCA2遺伝子発現の検討 (n = 6)

HFHSD負荷LE2KOでは肝臓SERCA2のタンパク及び遺伝子発現の有意な低下を認めた。

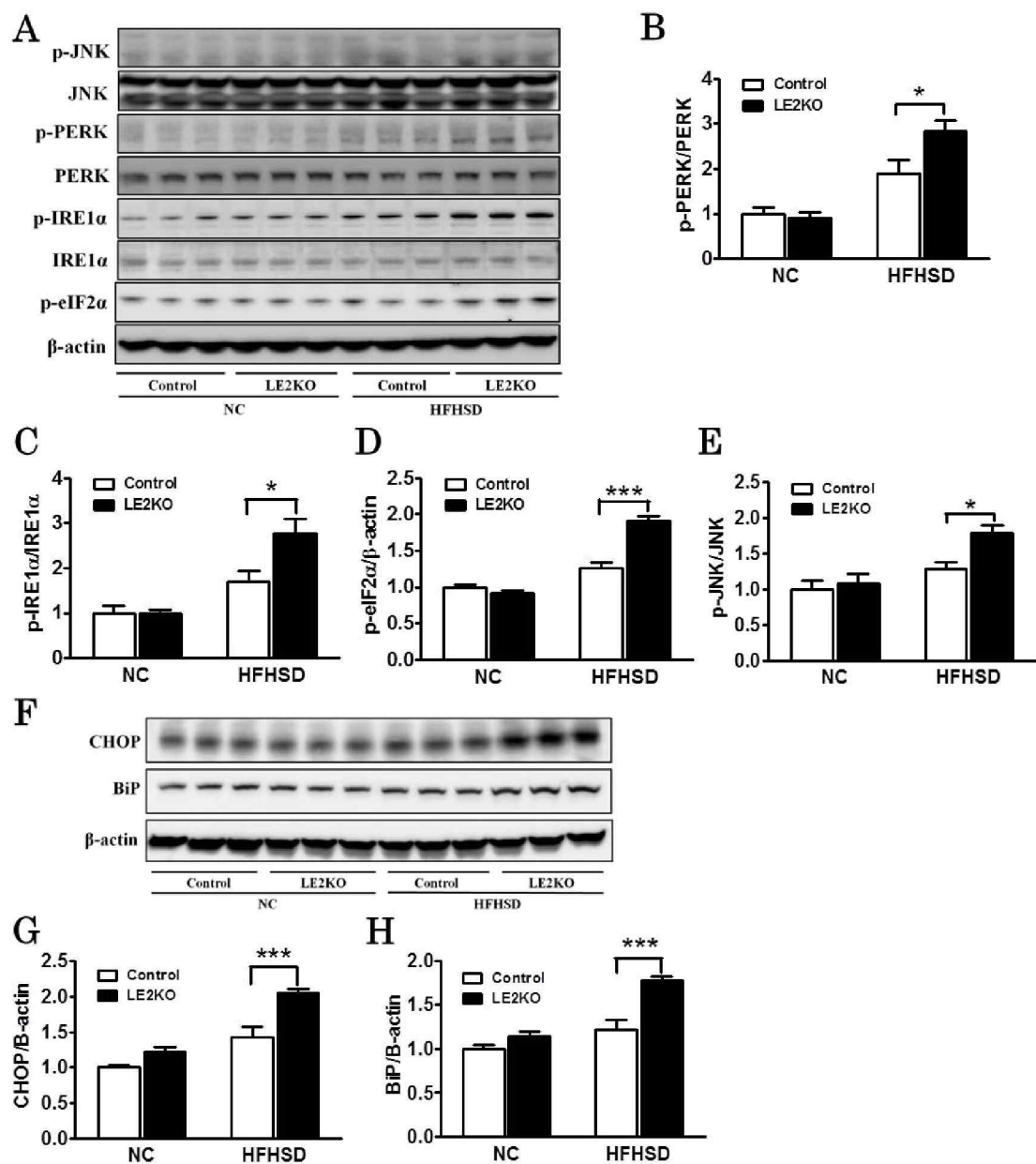


図9. 肝臓におけるERストレスへの影響

A: ウェスタンブロット法による肝臓PERK、IRE1α、eIF2α、JNKとそのリン酸化の検出

B-E: PERK、IRE1α、eIF2α、JNKのリン酸化の定量評価 (n=6)

F: ウェスタンブロット法による肝臓におけるCHOP、BiPの検出

G-H: CHOP、BiPのタンパク発現の定量評価 (n=6)

HFHSD負荷LE2KOでは肝臓におけるERストレスの亢進を認めた。

	NC		HFHSD	
	Control	LE2KO	Control	LE2KO
Blood glucose (mg/dL)				
Fasted	73.3 ± 7.0	76.0 ± 6.4	117.2 ± 6.3	149.7 ± 10.3 *
Fed	138.4 ± 12.4	147.8 ± 8.6	190.1 ± 5.5	230.0 ± 10.5 *
Serum total cholesterol (mg/dL)	88.5 ± 5.2	73.3 ± 6.3	145.1 ± 7.0	159.4 ± 11.6
Serum triglycerides (mg/dL)	44.0 ± 4.2	35.9 ± 2.6	48.5 ± 3.8	49.9 ± 5.8
Serum HDL cholesterol (mg/dL)	57.1 ± 3.0	54.0 ± 4.1	93.9 ± 3.5	101.3 ± 5.7
Serum free fatty acids (mEq/L)	0.66 ± 0.03	0.67 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.84 ± 0.03 *
Serum homocysteine (μmol/L)	1.12 ± 0.10	1.29 ± 0.12	1.30 ± 0.10	1.80 ± 0.16 *
Serum ADMA (μmol/L)	not determined	not determined	0.23 ± 0.01	0.49 ± 0.02 ***

(n = 9-14)

表3. 血清代謝パラメーターへの影響

HFHSD負荷LE2KOではControlと比較し、空腹時血糖値、随時血糖値、血清FFA、血清ホモシステイン及びADMAの有意な増加を認めた。

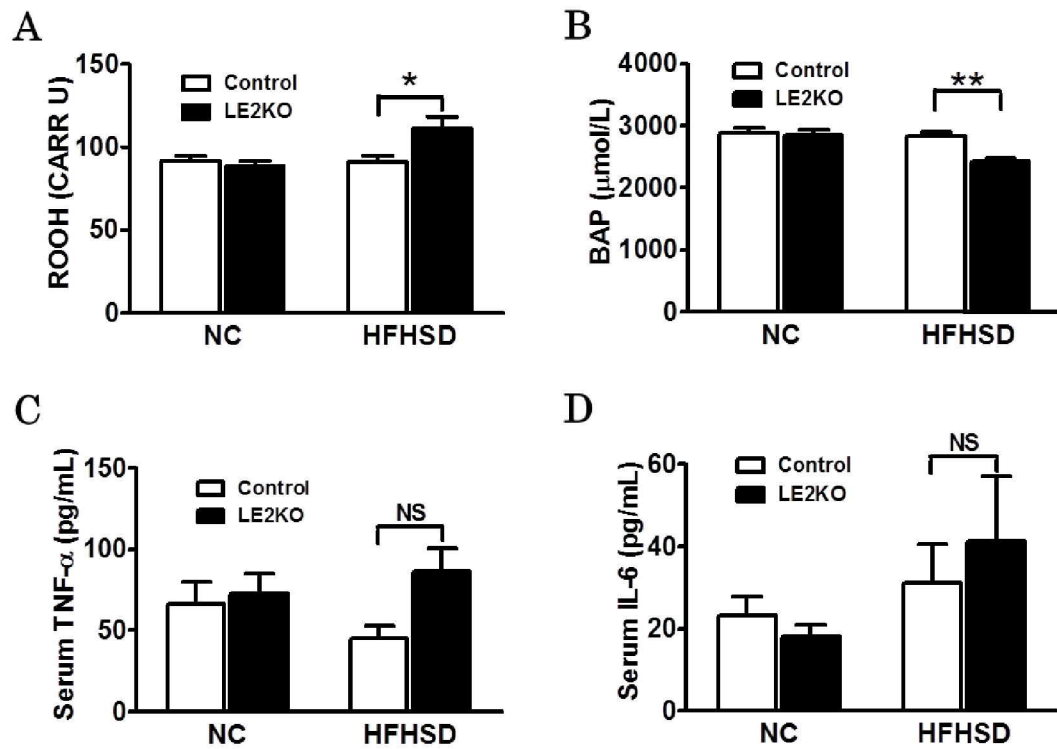


図10. 血清D-ROMs、BAP値と炎症性サイトカインへの影響

A：酸化ストレスの指標である血清D-ROMs値の比較（n=10）

B：抗酸化力の指標である血清BAP値の比較（n=8-10）

C：血清TNF-α値の比較（n=10）

D：血清IL-6値の比較（n=10）

HFHSD負荷LE2KOではControlと比較し、全身酸化ストレス指標の増加、抗酸化力の減少、及び血清アディポネクチン値の低下を認めた。

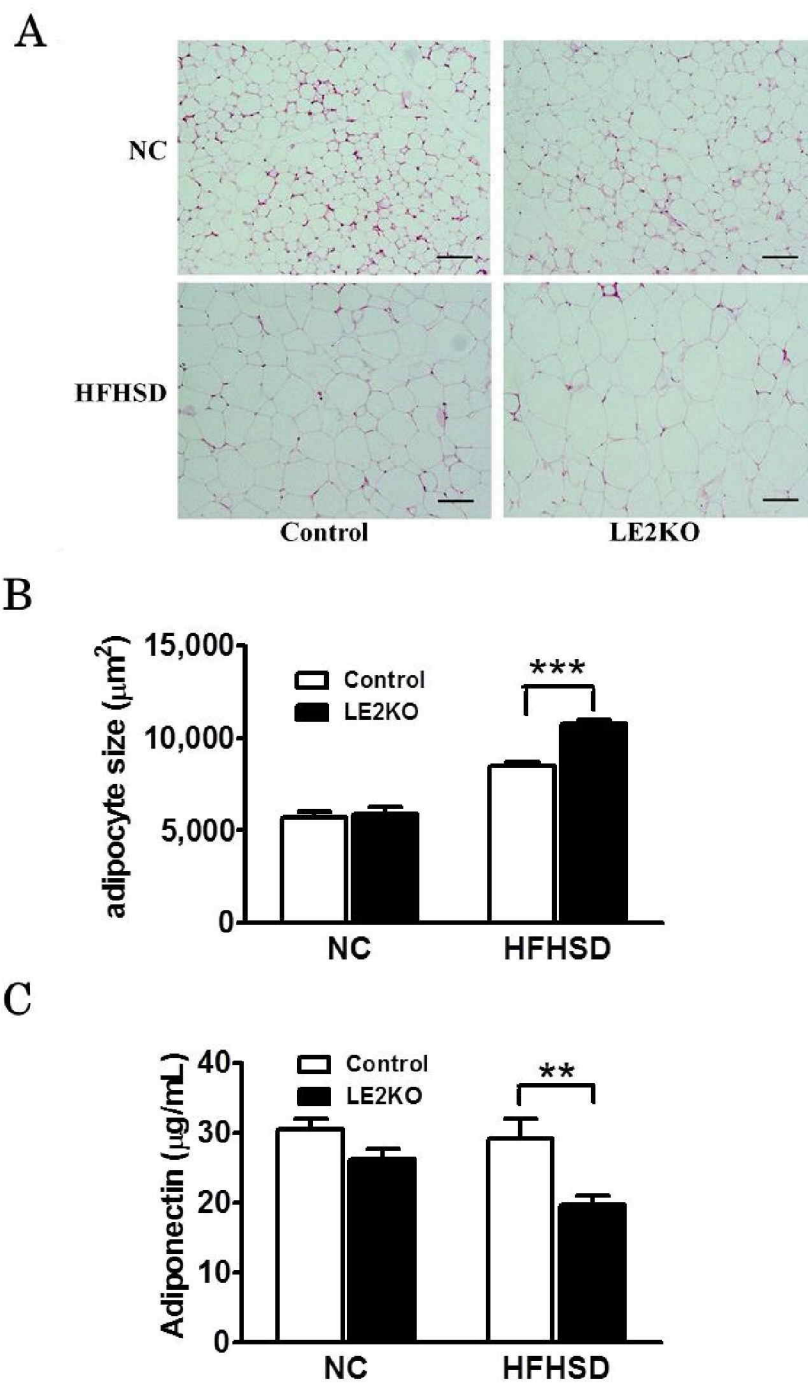


図11. 脂肪細胞肥大及びアディポサイトカインに対する影響

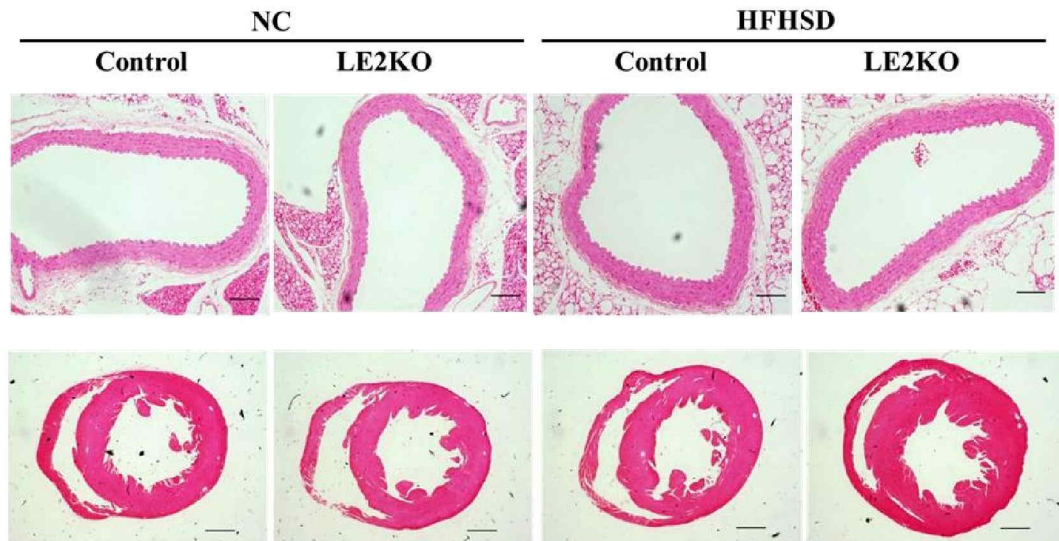
A : 精巣上体周囲脂肪のHE染色の比較

B : 脂肪細胞面積の定量評価 (n = 5)

C : 血清アディポネクチン値の比較 (n = 10)

HFHSD負荷LE2KOではControlと比較し、有意な脂肪細胞肥大と血清アディポネクチンの低下を認めた。

A



B

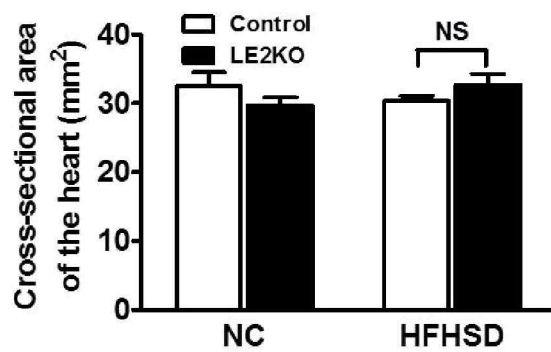


図12. 大動脈及び心臓の組織学的検討

A: 大動脈及び心臓のHE染色

B: 左室断面積の定量評価 (n=6-7)

NC群、HFHSD群のいずれにおいても、ControlとLE2KOの間に有意な変化は認めなかった。

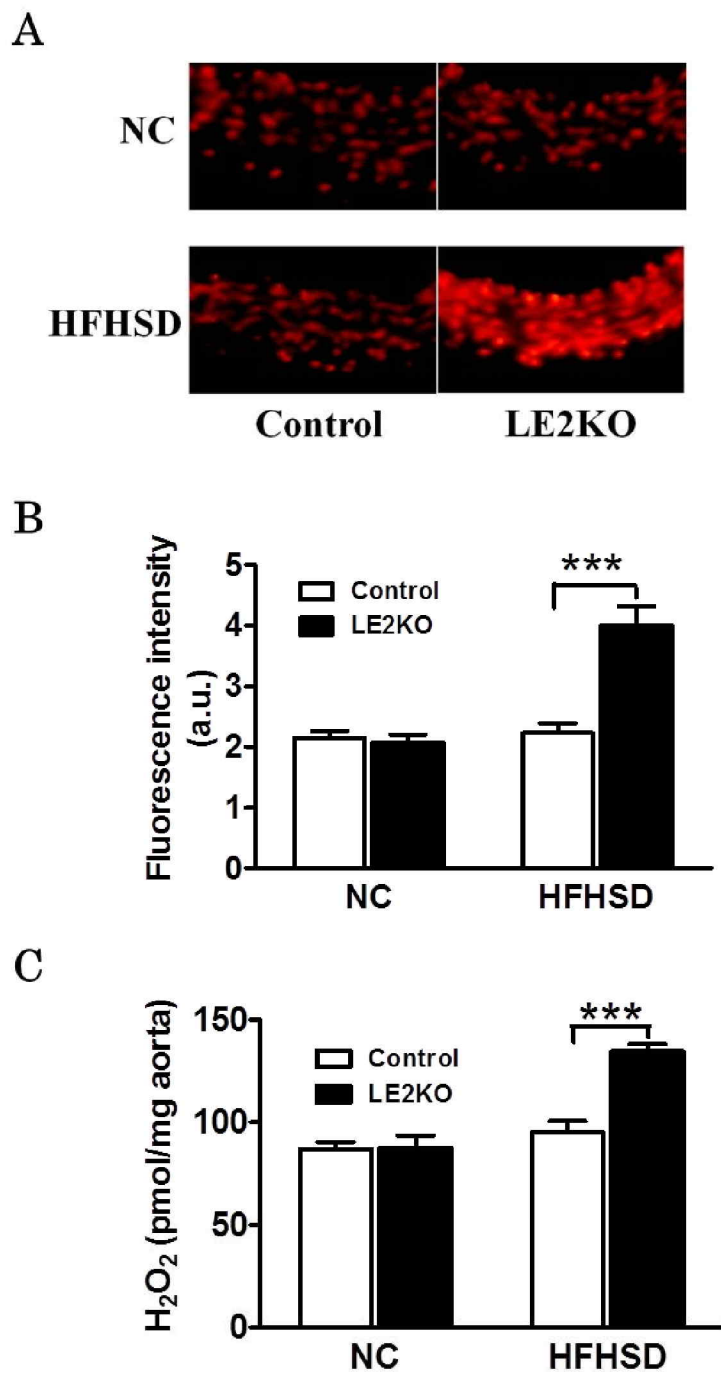


図13. 大動脈におけるスーパーオキシド産生及び H_2O_2 産生の評価

A : 大動脈におけるDHE染色

B : DHE染色の蛍光強度の定量 (n = 5-6)

C : Amplex Red Assayによる血管 H_2O_2 産生 (n = 8)

HFHSD負荷LE2KOではControlと比較し、大動脈におけるスーパーオキシド及び H_2O_2 産生の亢進を認めた。

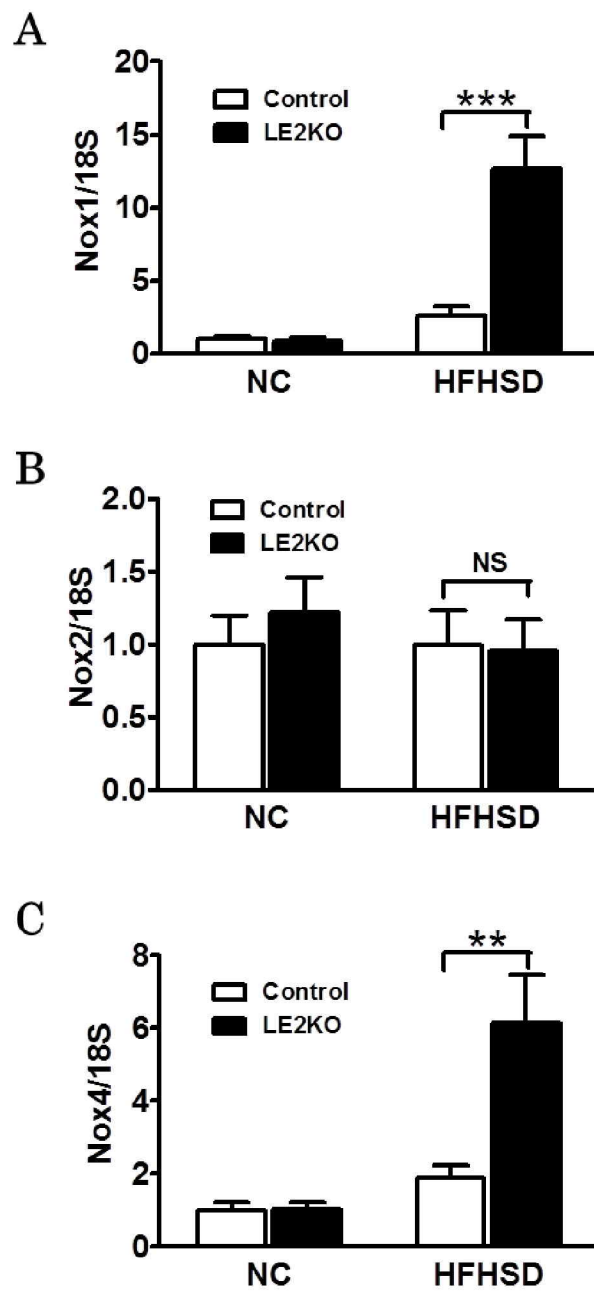


図14. 大動脈におけるNoxのisoform別の遺伝子発現の検討

A : Real-Time PCRによる大動脈Nox1遺伝子の発現 (n = 5)

B : Real-Time PCRによる大動脈Nox2遺伝子の発現 (n = 5)

C : Real-Time PCRによる大動脈Nox4遺伝子の発現 (n = 5)

HFHSD負荷LE2KOではControlと比較し、Nox1及びNox4のisoformの増加を認めた。

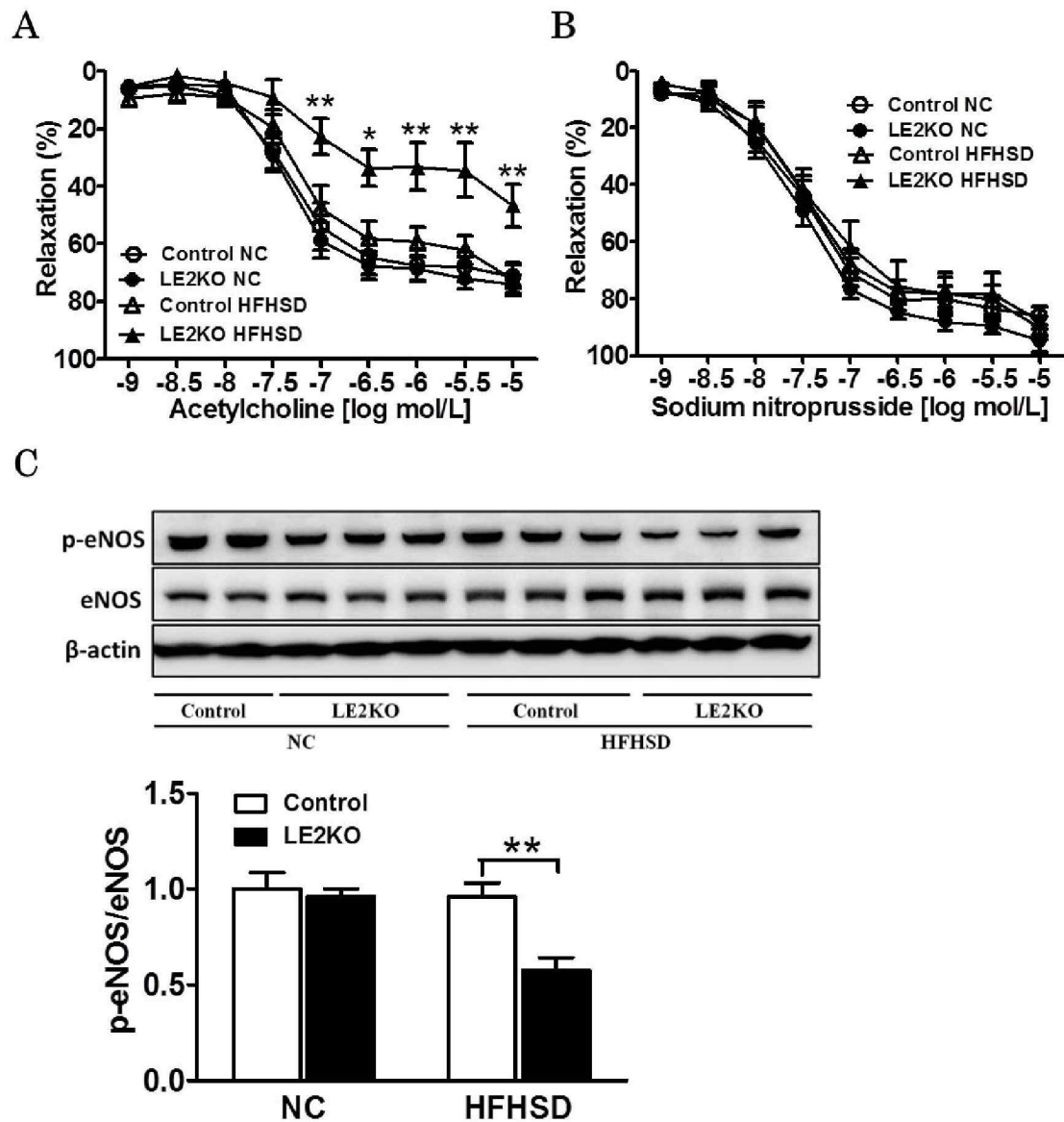


図15. 血管内皮機能の評価とeNOSのリン酸化の検討

A : AChによる内皮依存性血管弛緩反応 (n=9-10)
 B : SNPによる内皮非依存性血管弛緩反応 (n=8-10)
 C : ウェスタンブロット法による大動脈eNOSのリン酸化の検出 (n=6)

HFHSD負荷LE2KOではControlと比較し、血管内皮機能の低下とeNOSのセリン1177のリン酸化の減弱を認めた。

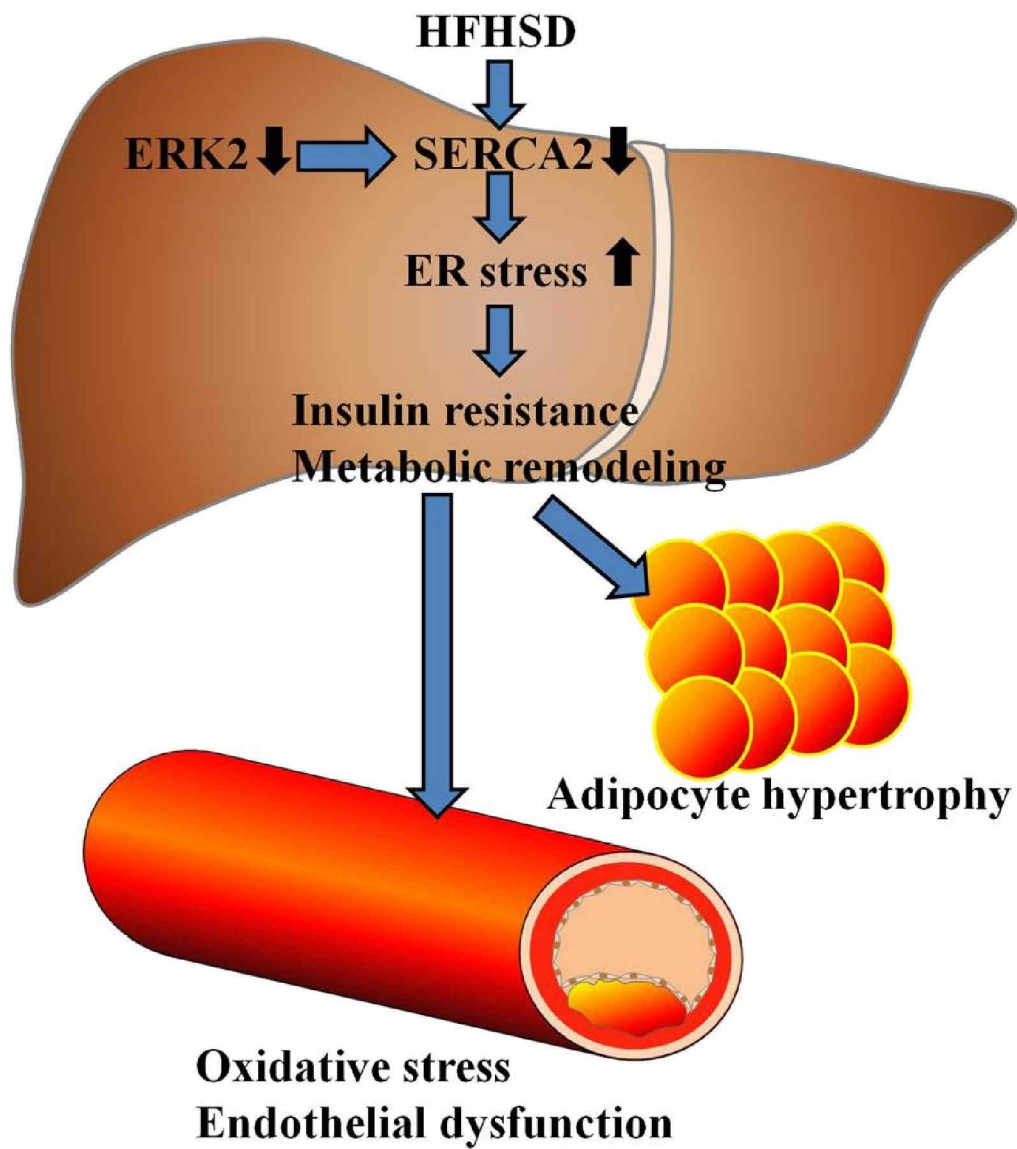
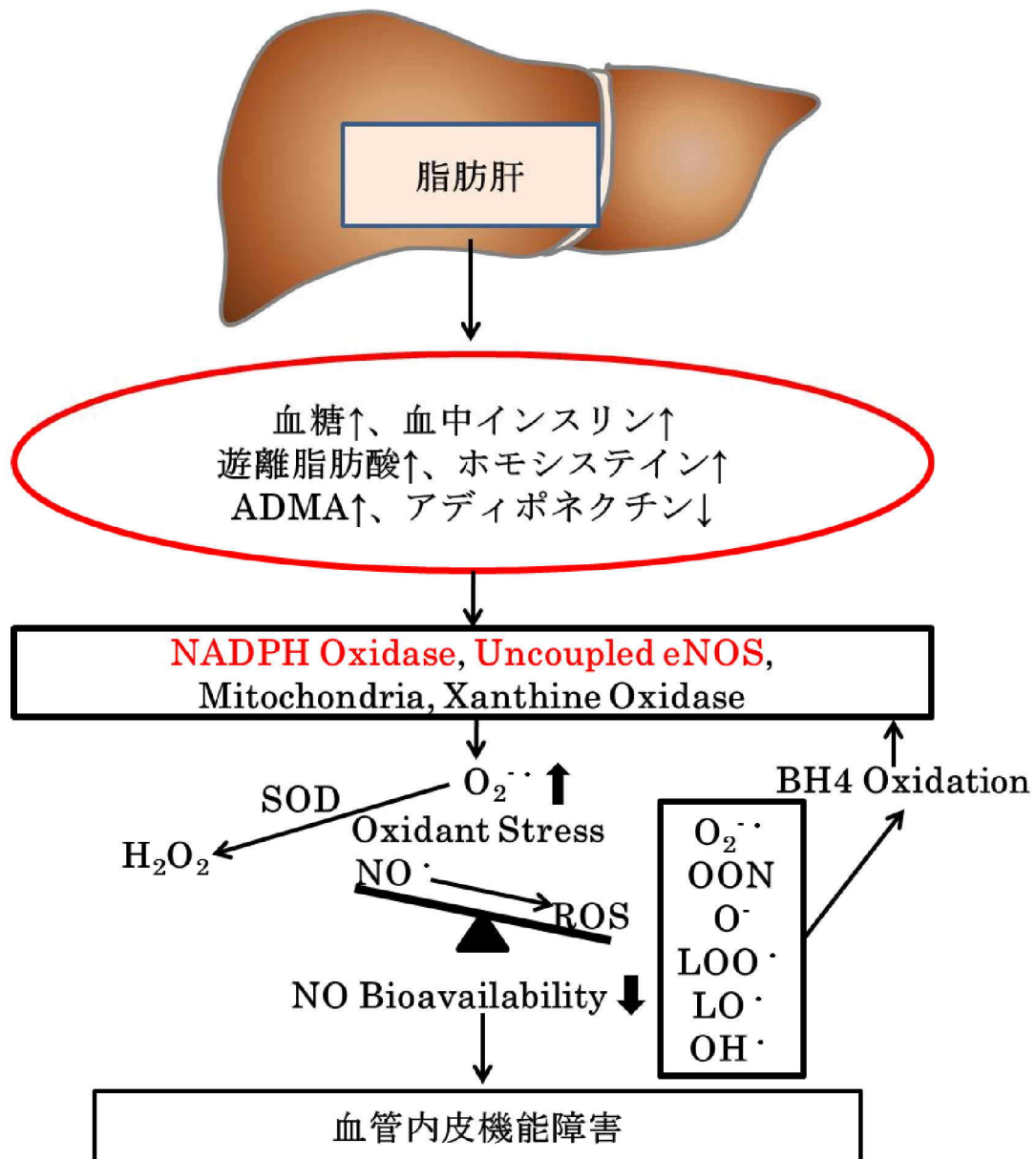


図16. HFHSD負荷時に肝臓ERK2欠損が血管、骨格筋、脂肪組織に与える影響



Cai H, Harrison DG. Circ Res. 2000;87;840-844. より改変引用

図17. 酸化ストレスによる血管内皮機能障害の発生機序

参 考 論 文

1. Hepatic Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 Suppresses Endoplasmic Reticulum Stress and Protects From Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction.
J Am Heart Assoc.2013;2(4):e000361

(基礎論文1)

くじら おか たけ ひこ
鯨 岡 武 彦

(循環器病学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成 25 年度