

論文の内容の要旨

1 目的

インスリンシグナルはinsulin receptor substrate (IRS) /phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) /Akt経路とRaf/MEK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路の2つの主要な経路から成る。各組織におけるIRS/PI3K/Akt経路の役割に関してはこれまで多くの研究成果が報告されているが、Raf/MEK/ERK経路については、特に肥満関連疾患 (ORD) における役割はほとんど知られていない。

そこで我々はORDにおける肝臓ERKの役割を検討するために、肝臓特異的ERK2欠損マウス (LE2KO) を用いて、高脂肪・高シヨ糖食 (HFHSD)投与により肥満・インスリン抵抗性モデルを作成し、肝臓ERK2のインスリン抵抗性、代謝及び脂肪肝の進展に対する影響を評価し、さらには血管障害の最も鋭敏な指標である血管内皮機能に及ぼす影響を解析した。また2型糖尿病を含めた肥満関連疾患におけるインスリン抵抗性との関連が報告されている肝臓sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺-ATPase (SERCA) の発現と肝臓ERストレスについても検証した。

2 対象並びに方法

Cre-loxPシステムを用いてLE2KOを作製した。雄のLE2KOとERK2 floxマウス (Control) を8週齢から20週間の食事負荷を行い、通常食 (NC) 群とHFHSD群を作成し、肝臓の組織学的変化、肝臓内脂質の定量的評価、糖/インスリン負荷試験 (OGTT/ITT) , 血清代謝パラメーター、血清酸化ストレスマーカー (d-ROM) /抗酸化力指標 (BAP) を測定した。またジヒドロエチジウム染色による大動脈壁活性酸素産生、Amplex Red Assay Kitを用いた大動脈におけるH₂O₂産生を測定した。さらには大動脈リングを作成し、オーガニチャンバーを用いてアセチルコリン (ACh) 添加による内皮依存性血管弛緩反応及びニトロプルシド (SNP) 添加による血管平滑筋機能を評価した。

また肝臓ERストレスの重要な分子である肝臓SERCA2の蛋白及び遺伝子の発現と、PKR-like kinase (PERK) , inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) , eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) , C/EBP homologous protein (CHOP) , BiP等のERストレスマーカーとそれに関連するc-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化を定量した。

3 成績

HFHSD負荷によりLE2KOではControlと同等の体重推移を示したが、肝臓重量は有意に増加し、血清ALT値の上昇を認めた。組織学的にはNC群ではLE2KOとControlの間に有意な変化は見られなかったが、HFHSD負荷ではLE2KOにおいて有意な脂肪滴の増加を認め、肝臓内脂質の定量評価では主に中性脂肪含量の増加を認めた。HFHSD負荷時のLE2KOではControlと比較し、肝臓SERCA2の遺伝子及び蛋白発現は有意に低下し、ERストレスマーカーであるPERK, IRE1 α , eIF2 α のリン酸化は増加し、分子シャペロンBiPと転写因子CHOPの増加を認めた。

代謝面ではHFHSD負荷時のLE2KOはControlと比較し空腹時/随時血糖値，空腹時血中インスリン値，HOMA-IRが有意に上昇し，血清遊離脂肪酸，ホモシステイン，ADMA，d-ROMの上昇とBAP，アディポネクチンの低下を認めた。OGTT/ITTでは糖負荷後の有意な血糖上昇とインスリンによる血糖降下反応の減弱を認めた。末梢組織においては精巣上体脂肪細胞の肥大化を認めた。

血管においてはHFHSD負荷のLE2KOでは大動脈壁活性酸素産生の有意な亢進を認め，大動脈H₂O₂産生量も増加していた。内皮依存性血管弛緩反応はNC群では有意な変化を認めなかったが，HFHSD負荷ではLE2KOで有意に減弱していた。

4 考察

LE2KOはHFHSD負荷の条件において，同等の体重変化の下で，耐糖能障害，インスリン抵抗性，代謝変化を伴う脂肪肝の増悪を認めた。その機序として肝臓のSERCA2発現低下と続発するERストレスが関与していることが示唆された。肝臓ERK2とSERCA2の関連については，インスリン抵抗マウスからのマクロファージにおいてMEK/ERKシグナルの減弱がSERCA2の発現低下とERストレスを誘導するとの既報があり，これに一致している。しかし，これはERK2のSERCAに対する直接作用なのか，間接作用なのかは不明であり，今後さらなる検証が必要と考えられた。

肝臓ERK2の血管内皮機能に対する影響に関しては，HFHSD負荷LE2KOで内皮機能は有意に障害されたが，その機序としては血糖値，血清遊離脂肪酸，血清ホモシステイン，ADMAの上昇と血清アディポネクチンの低下の関与が示唆された。その他にも肝臓からの未知のメディエーターやサイトカイン，micro-RNAの可能性が考えられ，その解明が期待される。

5 結論

本研究では，肝臓ERK2がERストレスの抑制を介して，脂肪肝進展と糖・脂質代謝変化，酸化ストレスに対し保護的に働き，さらには血管内皮機能を維持することを初めて明らかにした。その研究の意義は深く，肝臓ERKとSERCA活性を保護することはORD患者における心血管疾患の治療標的となり得ることが示唆された。