

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790548

研究課題名（和文）脂肪酸触媒酵素 SCD-1 を標的とした心血管病予防に関する検討

研究課題名（英文）Analysis of a potential target at SCD-1, catalytic enzyme of fatty acid, for the prevention of cardiovascular disease.

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（和文）：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脂肪酸触媒酵素、および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。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the effect of high plasma levels of free fatty acid, which are observed in the patients with obesity or diabetes, and catalytic enzyme of fatty acid on the onset of cardiovascular disease, we examined several basic analyses. As a result, we identified that saturated-fatty acids adversely affect the cardiovascular disease, and stearoyl-coA desaturase-1 (SCD-1), a catalytic enzyme which converts saturated fatty acids to monounsaturated fatty acids, has a protective role against saturated-fatty acids-induced these effects. In conclusions, our results demonstrated that SCD-1 as the novel preventive and therapeutic target for cardiovascular disease in obese or diabetic patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、2008年度より特定健診が導入されるなど、発症予防に向けた対策が強く求められており、その対

策の中でも食生活や運動不足などの生活習慣の改善が最も重要とされている。食生活の中でも特に、動物性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をきたす。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、これら各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明らかにされていない部分が多い。

申請者らはその遊離脂肪酸分画に着目し、その中でも飽和脂肪酸が心血管病の悪玉因子である可能性を明らかにした。実際に、血中遊離脂肪酸分画がメタボリックシンドロームの進展あるいは心筋梗塞の発症の予測因子になることが報告されていることから、飽和脂肪酸：不飽和脂肪酸のバランスが心血管イベントのリスクに重要であると考えられる。

次に、申請者らは体内の脂肪酸分画を調節する因子として、SCD-1 という酵素に着目した。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]）に変換する作用を有しており、脂肪酸分画のバランスを保つ上で重要な役割を有している。したがって、SCD-1 活性の亢進または低下がこのバランスを変化させることで、心血管病の発症および抑制に強く影響していることが考えられる。

近年、肥満者と正常者の骨格筋を用いてマイクロアレイによって網羅的に遺伝子発現を比較検討したところ、SCD-1 は肥満者で最も発現上昇の見られた遺伝子であり、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。そこで、申請者らが心臓に着目して検討を行ったところ、内臓脂肪蓄積型の肥満となったラットの心臓において、対照群と比較してSCD-1 の発現が約3倍と著明に亢進していた。また、全身的にSCD-1 遺伝子を欠損させたマウスの研究では、過食による肥満、脂肪肝が抑制され、肝や骨格筋でのインスリン抵抗性が改善することから、SCD-1 の活性抑制が肥満の治療法として注目されている。ところが、動脈硬化マウスモデルにアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてSCD-1 の活性を抑制したところ、肥満は改善されたにも関わらず、動脈硬化は逆に増悪したことが報告された。さらに最近、パルミチン酸からステアリン酸へ脂肪酸鎖長を延長する酵素である Elovl-6 を欠損したマウスにおいて、肥満と脂肪肝を呈したにも関わ

らず、インスリン抵抗性をきたさず、生活習慣病になりにくいことが報告された。

これらの結果から、肥満の改善が必ずしも動脈硬化などの生活習慣病のリスクを低下させるのではないことを示唆する結果と言える。さらに、心血管病の発症予防においては、内臓肥満や動物性脂肪の過剰摂取などによる脂肪酸の「量的変化」のみならず、組成などの「質的变化」が極めて重要であることを示唆する結果と言える（図1）。

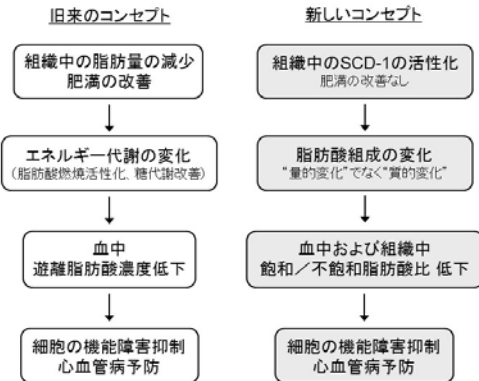


図1 脂肪酸組成の変化に基づいた新しい生活習慣病予防のコンセプト

しかし、これまで心血管系における脂肪酸分画およびその分画を調節する酵素としてのSCD-1の病態意義や役割、予防的意義づけ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

本研究は、血中および組織中の脂肪酸組成のバランスが生活習慣病の発症に重要であることを示し、さらにその調節因子としてのSCD-1の各組織における機能、様々なストレスにおける発現制御、疾患ごとの発現動態などを検討することで、SCD-1を標的とした生活習慣病予防のプログラムを考えることを目的とする。そこで、以下の4つの課題を主目的に研究を進める。

- (1) メタボリックシンドロームモデル動物を用いて、SCD-1の発現動態および血液・組織中遊離脂肪酸分画と病理組織学的変化の関係を検討する
- (2) 心血管系の培養細胞を用いて、飽和脂肪酸に対するSCD-1の作用機序を解明する
- (3) メタボリックシンドローム患者、心血管病患者におけるSCD-1の発現動態や活性と、心血管系の機能的、病理組織学的変化との関係を検討する
- (4) SCD-1を標的とした心血管病予防プログラムを検討する

## 3. 研究の方法

①. 培養心筋細胞、培養血管平滑筋細胞を用いて、各種脂肪酸分画の心筋傷害や血管石灰化に対する作用機序を解明する

培養ラット新生児心筋細胞に、飽和脂肪酸（パルミチン酸およびステアリン酸）、不飽和脂肪酸（オレイン酸、リノレン酸）を添加して、心臓におけるエネルギー代謝（脂肪酸代謝、グルコース代謝）や、アポトーシス（caspase3 活性、cleaved-caspase3 タンパク発現、TUNEL 染色）について、それぞれ検討する。

培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞も同様に、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸を添加して、石灰化に關与する遺伝子発現（BMP2、Msx2、cbfa1、OPN）やアルカリフォスフォターゼ（ALP）活性、Ca 沈着量、アポトーシス（caspase3 活性、cleaved-caspase3 タンパク発現、TUNEL 染色）について、それぞれ検討する。

#### ②. 正常心臓・血管標本と肥満や糖尿病における心臓・血管標本における SCD-1 の発現および活性を比較検討する

群馬大学医学部附属病院および関連病院の患者から採取した正常標本と患者標本を用いて、SCD-1 の免疫組織化学染色を行い、SCD-1 の発現部位と病理組織形態を比較検討する。また、組織内の脂肪酸分画比を測定して SCD-1 活性を求め、発現動態と比較検討する。

#### ③. 培養細胞を用いて、SCD-1 の発現の有無による飽和脂肪酸の作用動態および機序を解明する

SCD-1 のアデノウイルス発現ベクターや siRNA を用いて、SCD-1 発現の増減によって飽和脂肪酸の心臓・血管に対する作用が変化するかどうか、遺伝子発現や代謝の変化、アポトーシス活性などを同様に検討する。さらに、SCD-1 がどのような機序で飽和脂肪酸の作用を調節しているか、細胞内セラミド・ジアシルグリセロール含量、NF- $\kappa$ B シグナル伝達系を中心に検討する。また、どのようなストレスが SCD-1 の発現を制御しているか、種々の刺激を培養細胞に添加して検討する。

#### ④. SCD-1 を標的とした心血管病予防戦略を検討する

①～④の結果より得られた SCD-1 の発現動態と心血管系における作用との関連性から、適切な組織内脂肪酸分画比を検討する。SCD-1 の発現や活性が組織内の脂肪酸分画比を調節し、病態の発症や進展において重要な因子であることを見出せたら、SCD-1 の発現制御をもとにした予防プログラムを検討する。

### 4. 研究成果

#### ① 心臓における検討

我々はこれまでに、高シヨ糖食飼育による内臓肥満モデルラットの心臓において、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見出だした。このモデルラットにおいては、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学的変化も認められなかった。また、この SCD-1 の発現増加においては、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。さらに、ヒトの心臓における剖検標本を用いて、SCD-1 の発現を免疫染色にて調べたところ、肥満・糖尿病患者の心臓において、正常標本と比較して著明な発現増加を確認した。

肥満者や糖尿病患者の心臓においては、心筋細胞への脂肪蓄積が認められることが報告されている。また、こうした脂肪蓄積が見られる心臓においては、心機能の低下やアポトーシスの亢進などの傷害が認められることが知られており、こうした病的な状態は「脂肪毒性心筋症」と呼ばれている。脂肪毒性心筋症については、2つの代表的なメカニズムが知られており、①脂肪酸 $\beta$ 酸化で利用できる許容量以上に、過剰に心臓へ脂肪酸が流入することによって脂肪蓄積が引き起こされ、さらに、代謝しきれない脂肪酸はミトコンドリアにおいて酸化ストレスの増大をきたす、②脂肪酸の過剰な流入は中間代謝産物であるセラミドやジアシルグリセロール（DAG）の増加からアポトーシスを引き起こす、といった理由から心機能低下に至ることが示唆されている。

そこで我々は、培養心筋細胞に SCD-1 を過剰発現させたところ、オイル赤染色の結果から心筋細胞質内に著明な脂肪蓄積を認めた。さらに、心臓のエネルギー代謝を検討したところ、飽和脂肪酸を過剰に添加することで脂肪酸代謝の亢進、糖代謝の低下を招くが、SCD-1 の過剰発現により、その代謝変化がキャンセルされることが明らかとなった。したがって、SCD-1 は細胞内に流入してきた飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸に変換することで中性脂肪の基質を産生するとともに、脂肪酸の代謝自体を抑制させる作用を有していると考えられた。この代謝抑制のメカニズムとして、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝を調節する重要な因子である AMPK、ACC のリン酸化レベルが、SCD-1 の過剰発現により低下することが明らかとなった。

さらに、我々はアポトーシスに関わる caspase3 活性、cleaved-caspase3 タンパク発現、TUNEL 染色を調べたところ、飽和脂肪酸を心筋細胞へ添加することで、これらの項目の著明な増加を示し、アポトーシスに促進的に作用することが明らかとなった。しかし、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アポトーシス作用に対して抑制的に働くことを認めた。このメカニズムとして、SCD-1 を過剰発現させることで、細胞内のセラミドおよび DAG 含量が著明

に低下することが明らかとなった。

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、特に飽和脂肪酸が脂肪酸酸化の亢進やアポトーシスの亢進を引き起こすことで、脂肪毒性心筋症を引き起こす。しかし、グルコースやインスリンの血中濃度の増加に伴い、SCD-1 の発現が増加すると、飽和脂肪酸の作用に対して保護的に働くことで、発症に至らないと考えられる（発症前段階、図 2 左）しかし、局所的な炎症や液性因子の増加により、酸化ストレスが増大すると、SCD-1 の発現低下を引き起こし、過剰な脂肪酸が直接的に心臓に作用することで、脂肪毒性心筋症の発症・進展につながることを示唆された（進行期、図 2 右）。

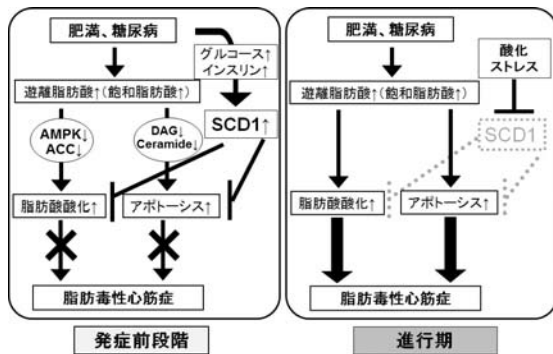


図2 脂肪毒性心筋症におけるSCD1の保護的役割と病態発症メカニズム(作業仮説)

## ② 血管における検討

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、心血管病リスクの増加に重要な要因となっている。我々はこれまで、糖尿病患者の動脈硬化病変には Msx2, Cbfa1/Runx2, Osterix など骨形成に必須な転写制御因子や Notch シグナル分子 (Notch 受容体, Jagged1) が発現し、これらの分子が能動的に血管平滑筋細胞を骨芽細胞に分化誘導することを報告した。しかし、糖尿病におけるどのような代謝異常が、血管平滑筋細胞を骨芽細胞に分化させるシグナルとして重要であるかについては不明である。一方、糖尿病患者では血中遊離脂肪酸濃度が増加することが知られている。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 (HSMC) 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り、骨形成因子である BMP2 や骨形成に必須な転写制御因子 Cbfa-1, OPN, Msx2 などの遺伝子発現が著明に増加することを見出した。一方、不飽和脂肪酸添加ではほとんど変化は認められなかった。また、飽和脂肪酸刺激により、ALP 活性や Ca 沈着量の増加など、

石灰化に伴う表現型を認めた。さらに、石灰化においてはアポトーシスによる細胞死と、そのアポトーシス細胞を中心としたマイクロシヤパタイトの沈着が病態の形成に重要である。そこで、血管平滑筋細胞におけるアポトーシスを調べたところ、飽和脂肪酸添加により、caspase3 活性の著明な亢進を認めた。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比較検討したところ、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、HSMC 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 caspase3 活性が増強した。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 caspase3 活性が抑制された。

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、HSMC に動脈硬化に関与するとされる TGF- $\beta$  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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を振りかけ、SCD-1 mRNA の発現を Q-PCR 法によって調べた。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激のみ、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、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 3)。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 3)。

## ③ SCD-1 を標的とした予防プログラム

これまでの結果から、SCD-1 は心血管病の発症に対して保護的に働く一方、SCD-1 の発

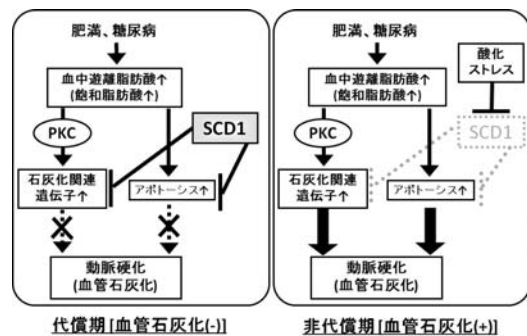


図3 血管石灰化におけるSCD1の保護的役割と病態発症メカニズム(作業仮説)

現弱が弱することで、病態の進行につながることを示唆された。

そこで、SCD-1の発現を調節する因子について、様々な因子を用いて比較検討してみたところ、グルコースやインスリン、ビタミンA、D、エストロゲン、さらには温度変化でSCD-1の発現が増加する一方、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン、レプチンなどによって減少することを明らかにした。脂肪酸に関しては、飽和脂肪酸によってSCD-1の発現が増加する一方、不飽和脂肪酸によって減少するという結果が得られた。さらに、肥満モデルマウスで認められた飽和・不飽和脂肪酸の分画比から、総脂肪酸を調整し、濃度を振って刺激したところ、いずれの濃度においてもSCD-1の発現を減少させるという結果が得られた。飽和脂肪酸の増加が心血管系に対して悪影響に作用する一方、SCD-1の発現に関しては増加の方向に作用するということが、最適な飽和・不飽和脂肪酸の分画バランスや、どの程度、飽和・不飽和脂肪酸を摂取すれば良いかという点に関しては、今後さらなる検討課題である。

しかし、少なくとも運動習慣による基礎体温の上昇や内臓肥満の改善による総脂肪酸濃度の低下、ビタミンや植物性エストロゲンである大豆イソフラボンの摂取によって、SCD-1の発現を増加させる効果があることから、こうした生活習慣の改善がSCD-1を標的とした心血管病予防に有効であると推察された。

## 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 4 件)

- ① Ueno M, Matsui H (他 9 名、7 番目). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mediates TGF $\beta$ 1-induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.* 2011, In press. 査読有
- ② Aoyagi-Ikeda K, Matsui H (他 11 名、8 番目). Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2010, In press. 査読有
- ③ Nakahara T, Matsui H, (他 8 名、5 番目) Fibroblast Growth Factor 2 Induces Osteogenic Differentiation through a Runx2 Activation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 394(2):243-8. 査読有
- ④ Tokuda F, Matsui H, (他 2 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.* 2009, 338(2):127-33. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 須永 浩章、松井 弘樹. 遊離脂肪酸触媒酵素 Elovl6 は脱分化平滑筋細胞において細胞増殖に抑制的に働く 第 17 回日本未病システム学会 2010/11/13, 沖縄
- ② 松井 弘樹. 血管石灰化の予防における遊離脂肪酸触媒酵素 Elovl6 の病態意義の解明 第 17 回日本未病システム学会 2010/11/13, 沖縄
- ③ Matsui H. Elevated Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression In Obese and Diabetic Heart Plays A Protective Role Against Fatty Acid-Induced Cardiac dysfunction. 第 10 回国際心臓研究学会 2010/5/16. 京都
- ④ Matsui H. Stearoyl-CoA desaturase-1 has a protective effect against saturated fatty acids-induced osteogenic differentiation and apoptosis in vascular smooth muscle cells. 第 10 回国際心臓研究学会 2010/5/16. 京都
- ⑤ 品川 雄士、松井 弘樹. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha regulates transendothelial fatty acid transport in Capillary Endothelial Cells in Heart. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会, 2010/3/6, 京都
- ⑥ 影山 藍子、松井 弘樹. Palmitic Acid Induces Osteogenic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会, 2010/3/5, 京都
- ⑦ 徳田 史恵、松井 弘樹. A New Oxidative Stress Marker, N epsilon-(hexanoyl) lysine (HEL) is Increased in Metabolic Syndrome, but not in Obstructive Sleep Apnea 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会, 2010/3/5, 京都
- ⑧ Matsui H. Increased Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression in Obese and Diabetic Heart Plays A Protective Role Against Fatty Acid-Induced Cardiac Dysfunction. 第 82 回アメリカ心臓学会・学術集会 2009/11/16, アメリカ (ニューオーリンズ)

## 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