

マウス肥満モデルにおける血管内皮のExtracellular  
Signal-Regulated Kinase 2 (ERK2) が血管内皮障害、  
インスリン抵抗性及び脂肪肝炎に及ぼす影響に関する検討

さとう

あつし

佐藤 篤志

(循環器病学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度

## 目 次

第1章 緒言	1 頁
第2章 研究方法	5 頁
第1節 実験動物	5 頁
第2節 組織のタンパク質抽出及びウエスタンブロット法	6 頁
第3節 組織学的評価	7 頁
第4節 食事と投与スケジュール	7 頁
第5節 糖代謝の評価	7 頁
第6節 NAFLD 活動スコア及び線維化の評価	8 頁
第7節 肝酵素、肝臓内の中性脂肪及び総コレステロールの評価	9 頁
第8節 収縮期血圧と心拍数の測定及び血清硝酸塩及び 亜硝酸塩 ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) の評価	9 頁
第9節 血管拡張反応試験	10 頁
第10節 血管におけるスーパーオキシド産生の評価	11 頁
第11節 Raf/MEK/ERK 経路の上流及び下流の検討	11 頁
第12節 S18886 の経口投与による血管内皮機能、糖代謝及び NAFLD の評価	12 頁
第13節 統計学的解析	12 頁

第3章 実験結果	13 頁
第1節 EE2KO マウスの特徴	13 頁
第2節 血清グルコースとインスリン濃度及びHOMA-IR	13 頁
第3節 耐糖能とインスリン感受性	13 頁
第4節 肝臓の病理組織的評価	14 頁
第5節 収縮期血圧と一酸化窒素 (NO) の評価	15 頁
第6節 血管内皮機能の評価	16 頁
第7節 血管における酸化ストレスの評価	17 頁
第8節 Raf/MEK/ERK 経路の上流及び下流の検討	17 頁
第9節 S18886 の経口投与による血管内皮機能、糖代謝及び NAFLD の評価	19 頁
第4章 考察	20 頁
第5章 結論	28 頁
謝辞	29 頁
略語一覧	30 頁
参考文献	32 頁
図表	41 頁

## 第1章 緒言

肥満が心血管疾患の原因になることは経験的に想像でき、指摘もされていたが、1981年に Rudermann らにより正常体重でも肥満者と同等に心血管疾患になりやすい人がいることが初めて報告され、原因の一つとして高インスリン血症の影響が考案された (1)。1988年に Reaven らはインスリンが組織に効果的に作用できない状態であるインスリン抵抗性のために、生活習慣病の要素である高血圧、糖代謝異常、脂質代謝異常を発症し心血管疾患を起こすと報告し、この疾患を「Syndrome X」と命名した (2)。そして、1998年には世界保健機関 (WHO)により正式に「メタボリックシンドローム」の概念が提唱され (3)、現在では世界中に最も知られている疾患の一つとなっている。

肥満は医療が発達した現在でも増加の一途にあり、成人の主要死因である心血管病や糖尿病の原因として、特に先進国において深刻な問題となっている。WHOによれば、2016年の時点で成人男女共に39%の人が体重超過となっており、肥満指数であるBody Mass Index (BMI)は1975年から現在まで上昇傾向にある (4)。厚生労働省 (平成28年国民健康 栄養調査結果の概要)によると、我が国においても男性の31.3%、女性の20.6%が肥満である (5)。メタボリックシンドロームは、壮年期死亡の減少、健康寿命の延伸等の実現を目的とし策定された「健康日本21 (第2次)」の主要対象となり、2008年の策定時でのメタボリックシンドローム及び予備群の罹患人口である約1400万人を2015年までに25%減少することを目標に掲げられた。しかし、国民一体となって取り組んだ健康づくり運動を行ってきたにもかかわらず、約1412万人と

横ばいであり、依然としてメタボリックシンドロームの問題は解決していない

(6)。メタボリックシンドロームはそれ自身重篤な症状はないが、インスリン抵抗性や血管内皮障害が持続することは2型糖尿病、心血管疾患の発症に強く関与する(7、8、9、10)。また、インスリン抵抗性は肝脂肪変性を主症状とする非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease:

NAFLD)の進展にも強く関与しており、その他様々な臓器の障害の原因とな

り、NAFLDが心血管疾患のリスクを増加させることも報告された(11、12)。

肥満関連の心血管合併症は生命を脅かすだけでなく、Quality of Lifeを悪化させ健康寿命をも悪化させる疾患でもあり、高齢者の健康寿命延長を掲げる我が国において非常に深刻な問題である。自衛隊員においても、欧米諸国の者

(軍人)と行動を共にすることが多く高脂肪食にさらされやすいため、メタボリックシンドローム対策は隊員の健康管理およびパフォーマンスの維持のために重要な課題である。また、メタボリックシンドロームは長期的に死亡リスクを増加させることが明らかになっており(13)、この対策が国民・自衛隊員の長期予後とパフォーマンス改善に繋がることが想定される。

現在肥満及びメタボリックシンドロームの治療は内臓脂肪蓄積を防止するための食事療法や、エネルギー燃焼や代謝改善のための運動療法が主体である。

さらに、危険因子である高血圧症、脂質異常症、耐糖能異常のそれぞれに対する個別の薬物治療は存在するが、肥満及びメタボリックシンドロームの原因であるインスリン抵抗性そのものを改善する治療薬は未だ存在しないのが実情で

ある。致命的な、または健康寿命を短くする合併症の発症を減らすためにもインスリン抵抗性を標的とした新規薬剤の開発が期待される。

一酸化窒素 (NO) は血管拡張物質の一つとして広く知られている (図 1) (14)。インスリン抵抗性は肥満やメタボリックシンドロームの主要な要因であり、それには各臓器におけるインスリンシグナル伝達経路の変化が強く影響する。血管壁において、インスリンは血管トーンと血流を調節している。血管内皮における主要インスリンシグナル伝達経路は大きく二つの経路に分かれている。一つは phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) /AKT/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) /NO 経路で、血管拡張物質である NO を産生することで血管を拡張させ、血流増加に作用する経路である。一方、もう一つの主要経路である Raf/ mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) /extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路は Autocrine/Paracrine 的に血管収縮物質を産生することで血管を収縮させることが細胞実験を中心に報告されている (図 2) (15)。各臓器における物質交換に影響する血流調節はインスリンによるこれら二つの経路のバランスによる収縮と拡張により制御される。健常な血管では PI3K/AKT/eNOS/NO 経路が優位となり、それゆえインスリンは血流増加に作用する。一方、肥満やメタボリックシンドロームに関連した糖脂肪負荷、炎症性サイトカイン、高インスリン血症は PI3K/AKT/eNOS/NO 経路を障害し、また Raf/MEK/ERK 経路を活性化することで、Raf/MEK/ERK 経路が相対的に優位となることが *in vitro* では示されている。(図 3) (16、17、18、19)。

Raf/MEK/ERK 経路の Effector Molecule である ERK は多くの細胞において様々な役割を担っている。ERK には ERK1 と ERK2 のサブタイプがあり、アミノ酸配列は 84% の相同性があり、非常に似通った構造と標的分子を有する

(20)。ERK は発生学上必須の分子であり、ERK2 を全身で欠損させると胎生致死となることが報告されている (21)。当教室の Kujiraoka らは以前、肝細胞特異的 ERK2 欠損マウスの肥満モデルを作成したところ、NAFLD の増悪と血管内皮機能障害を呈した。このことから肝臓における ERK2 は NAFLD の進展、血管内皮障害に抑制的に働くことが判明した (22)。主に培養血管内皮細胞を用いた検討では、ERK は endothelin や thromboxane 等の血管収縮物質を産生することが報告されており、これらは肥満時の高血圧に関与しうる (23、24、25)。しかし、肥満及びメタボリックシンドロームにおける *in vivo* での血管内皮 ERK2 の役割についての検討はなされていない。

これらの背景を基に、本研究では血管内皮特異的 ERK2 ノックアウトマウスを作成して、高脂肪高ショ糖食を与えることでマウス肥満モデルを作成し、肥満及びメタボリックシンドロームにおける血管内皮 ERK2 が糖・脂質代謝、肝機能、血圧及び血管内皮機能に与える影響について検討し、血管内皮のインスリン抵抗性が血管障害・高血圧に関わる機序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 実験動物

ERK2 flox マウスは防衛医科大学校生化学教室 佐藤泰司博士より供与された (26)。血管内皮特異的プロモーターである Tie2 プロモーターの制御下で Cre を発現している Tg マウス (Tie2-Cre) は The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した。これらのマウスを交配し、血管内皮特異的 ERK2 ノックアウトマウスを作成し、遺伝的背景は C57BL/6J で揃えた。実験には血管内皮特異的 ERK2 ノックアウトマウス (Tie2-Cre [+/-]; ERK2 [lox/lox] マウス [EE2KO マウス]) と Control マウス (Tie2-Cre [-/-]; ERK2 [lox/lox] マウス [Control マウス]) を用いた。

飼育は防衛医科大学校動物実験施設にて行い、12 時間毎の明暗の照明のもと行われた。明は 7 時から 19 時、暗は 19 時から 7 時とした。食餌は通常食 (日本クレア株式会社、東京、日本) 及び高脂肪高シヨ糖食 (炭水化物 28.3%、脂質 54.5%、タンパク質 17.2%) (表 1) (オリエンタル酵母工業株式会社) を使用し、食餌、飲水共に自由摂取とした。ERK2 flox 遺伝子と Cre 遺伝子の確認のための Genotyping は Polymerase chain reaction 法 (PCR 法) を用いて確認した。flox 遺伝子の検出のために 5' -GATCTGATGCTTGCCAAAGCC-3' 及び 5' -TGTAAGTAGCAGCAGATGC-3' をプライマーとして使用し、Cre 遺伝子の検出のために 5' -GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3' 及び 5' -

GTGAAACAGCATTGCTGTCACCTT-3' をプライマーとして使用した (22) 。また、本研究は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て (承認番号: 13022) 、動物実験規則に基づき実施した。

## 第 2 節 組織のタンパク質抽出及びウエスタンブロット法

イソフルランによる麻酔下で開胸腹し、血液を回収した後クレブス・リンゲル重炭酸バッファー (NaCl 118.3 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、CaCl<sub>2</sub> 2.5 mmol/L、MgSO<sub>4</sub> 1.2 mmol/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mmol/L、NaHCO<sub>3</sub> 25 mmol/L、D-glucose 5.5 mmol/L) で還流した。摘出した組織 (脳、心臓、肝臓、腎臓、骨格筋、精巢周囲脂肪、胸部大動脈) は、1 mmol/L の phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 及び protease inhibitor cocktail を含んだタンパク質抽出バッファー (Tris-HCl 20 mmol/L、NaCl 150 mmol/L、Na<sub>2</sub>EDTA 1 mmol/L、EGTA 1 mmol/L、1% NP-40、sodium pyrophosphate 2.5 mmol/L、β-glycerophosphate 1 mmol/L、Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 1 mmol/L、pH 7.4) を加え、ホモジナイザーを用いて溶解した。溶解液は 4°C、15,000 x g で 20 分間遠心し、上清を回収した。タンパク質濃度の測定は Bradford 法を用いた。サンプルの加熱処理を行ったのち、SDS-PAGE 法にて電気泳動を行い、転写の際は polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンを用いた。ブロッキング液 (Blocking One、ナカライテスク、京都、日本) で 1 時間ブロッキングし、4°C、overnight で 1 次抗体反応を行った。翌日、Tween20 含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で 3 回洗浄した後、2 次抗体反応を行った。抗体反応終了後、PBS-T で 3 回洗浄し、Super

Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて化学発光させ、LAS3000IR (富士フイルム、東京、日本) で検出した。ERK の 1 次抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) から入手したものを使用した。

### 第 3 節 組織学的評価

イソフルラン麻酔下で、血液を回収した後クレブス・リンゲル重炭酸バッファーを還流させた。摘出した肝臓と大動脈は 4%パラホルムアルデヒドにて 24 時間固定し、パラフィン切片を作成した。肝臓はヘマトキシリン・エオジン染色とマッソン・トリクローム染色を、大動脈は抗 ERK2 抗体 (Abcam plc, Cambdige, UK) を用いて免疫染色法をそれぞれ行った。

### 第 4 節 食事と投与スケジュール

Control 及び EE2KO マウスそれぞれに、通常食 (ND) 及び高脂肪高シヨ糖食 (HFHSD) を 6 週齢から 30 週齢までの 24 週間与えることで 4 群 (Control-ND、EE2KO-ND、Control-HFHSD、EE2KO-HFHSD) を作成し、体重は 2 週間毎に測定した。

### 第 5 節 糖代謝の評価

14 時間の絶食後、血液を tail cut にて採取し、血清グルコース濃度はグルコースモニタリングシステム (FreeStyle、ニプロ、大阪、日本) を使用し測定した。また、ガラス毛細管を利用して採取した血液を遠心して血清を回収し

た。回収した血清を利用し、血清中のインスリン濃度を ELISA キット（富士フイルムワコーシバヤギ株式会社、群馬、日本）を使用し測定した。空腹時グルコース濃度と空腹時インスリン濃度から、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) を以下の式で計算した。

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹時グルコース濃度 (mg/dl)} \times \text{空腹時インスリン濃度 (ng/ml)}$$

より詳細な糖代謝を確認するために、intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) 及び insulin tolerance test (ITT) を行った。ipGTT は 6 時間の絶食後、D-glucose 3 g/kg 体重を溶解した生理食塩水を腹腔内注射し、投与直前 (0 分)、投与後 15 分、30 分、60 分及び 120 分にて採血を行い、グルコース濃度を測定した。また、0 分、15 分及び 30 分の血清を利用し、インスリン濃度も測定した。ITT は 4 時間の絶食後、速攻型インスリン 0.5 U/kg 体重 (Humulin R, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA) を腹腔内へ注射し、投与直前 (0 分)、投与後 15 分、30 分、45 分、60 分及び 120 分にて採血を行い、グルコース濃度を測定した。

## 第 6 節 NAFLD 活動スコア及び線維化の評価

肝臓の組織は脂肪肝の活動性の評価としてよく知られている NAFLD 活動スコア (NAS) にてヘマトキシリン・エオジン染色を組織学的に定量化した。NAS の評価項目として肝細胞の脂肪化の程度、実質炎症の程度、肝細胞の風船様腫大

の出現頻度を点数化し、0点から8点で評価した。また、線維化についてはマッソン・トリクローム染色切片を用いて0点から4点で評価した(27)。

#### 第7節 肝酵素、肝臓内の中性脂肪及び総コレステロールの評価

第5節で絶食後に回収された血清を酵素測定用キット(富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本)を用いて測定した。

イソフルラン麻酔下で血液を除去した後クレブス・リンゲル重炭酸バッファで還流したのちに肝臓を摘出した。肝臓1g当たり、タンパク質抽出バッファを3mL加え、ホモジナイザーを用いて溶解した。溶解液を4°C、15,000 x gで20分間遠心し、上清を回収したのち中性脂肪及び総コレステロールを生化学検査用キット(富士フイルム和光純薬株式会)を用いて測定した(22)。

#### 第8節 収縮期血圧と心拍数の測定及び血清硝酸塩及び亜硝酸塩( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) の評価

収縮期血圧と心拍数をtail cuff法にて無麻酔下で測定した(MK-2000、室町機械株式会社、東京、日本)。第5節で絶食後に回収された血清を硝酸塩及び亜硝酸塩( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ )専用の測定キット(株式会社 同仁化学研究所、熊本、日本)を用いて測定した。

## 第9節 血管拡張反応試験

装置として3D イージー・マグヌス（いわしや岸本医科産業株式会社、京都、日本）を使用した。マウスから胸部大動脈を速やかに摘出し、血管内皮を損傷させないように慎重に結合組織を除去した。その後3 mm 長に大動脈を分割し大動脈リングを作成したのち、クレブス・リンゲル重炭酸バッファーで満たされた恒温槽の張力測定用フックへ血管内皮を損傷させないように慎重に吊るした。バッファーは95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを溶存させ、37°Cに保った（22、28）。

初期張力は1.0 gとし、張力測定はトランスデューサーにて増幅してポリグラフ上に記録した。拡張反応試験の前にKCl バッファー（30 mmol/L）にて15分間の過収縮を起こし、その後クレブス・リンゲル重炭酸バッファーにて大動脈リングを3回洗浄した。L-phenylephrine（10<sup>-5.5</sup> mol/L）にて15分間最大収縮の直前まで収縮させたのち、acetylcholine（ACh）を恒温槽内へ漸増投与し（10<sup>-9</sup> mol/L-10<sup>-5</sup> mol/L）、AChによる血管内皮依存性拡張反応の張力を測定することで評価した。引き続き、クレブス・リンゲル重炭酸バッファーで3回洗浄した後、再度L-phenylephrine（10<sup>-5.5</sup> mol/L）にて15分間最大収縮の直前まで収縮させた。NOドナーであるsodium nitroprusside（SNP）を、同様に漸増投与し（10<sup>-9</sup> mol/L-10<sup>-5</sup> mol/L）、NOによる血管内皮非依存性拡張反応をAChと同様に評価した。

## 第 10 節 血管におけるスーパーオキシド産生の評価

dihydroethidium (DHE) 染色を使用し、摘出大動脈片におけるスーパーオキシド産生の評価を行った。DHE は Thermo Fisher Scientific より入手した (29)。胸部大動脈を速やかに摘出し、第 9 節と同様に大動脈リングを作成した。大動脈リングを optimal cutting temperature medium (O.C.T. Compound、サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本) に包埋し、液体窒素にて急速凍結した。引き続き 10  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作成した。スライドに DHE ( $2 \times 10^{-6}$  mol/L) を滴下し、室温遮光下で 30 分間反応させた。画像は Keyence 社の BZ-X710 (大阪、日本) を用いて、540 nm の励起光を使用し、605 nm の蛍光波長を使用し描出した。DHE 染色の蛍光強度は Keyence 社の解析ソフトを使用した。

## 第 11 節 Raf/MEK/ERK 経路の上流及び下流の検討

endothelin A 受容体阻害薬である BQ123 1  $\mu\text{mol/L}$  (Adipogen Life Sciences、San Diego、CA、USA)、thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 及び prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) の受容体である TXA プロスタノイド受容体 (TP 受容体) の阻害薬である S18886 1  $\mu\text{mol/L}$  (Cayman Chemical)、MEK 阻害薬である U0126 30  $\mu\text{mol/L}$  (Promega、Madison、WI、USA) をそれぞれ恒温槽に加え 30 分間摘出大動脈片と反応させ、第 9 節と同様に ACh 投与による内皮依存性血管拡張反応を検討した。また、摘出大動脈片におけるスーパーオキシド産生を評価するために、37°C に維持した恒温槽でそれぞれの阻害薬を加えたのちに

30 分間摘出大動脈片を反応させ、第 10 節と同様の方法にて DHE 染色を行った。

#### 第 12 節 S18886 の経口投与による血管内皮機能、糖代謝及び NAFLD の評価

Control-HFHSD 群と EE2KO-HFHSD 群にそれぞれ 5 mg/kg 体重/日の量の S18886 を水に溶解させて 6 週間経口摂取させた (30)。投与後、第 8 節と同様の方法にて収縮期血圧を測定した。また、第 9 節と同様に ACh を用いて大動脈片の内皮依存性血管拡張反応を評価した。糖代謝の評価を行うために、第 5 節と同様に体重、空腹時血清グルコース及びインスリン濃度を測定し、HOMA-IR を算出した。NAFLD の評価を行うために、第 6 節で示した方法を用いて肝臓の組織学的検討を行った。

#### 第 13 節 統計学的解析

すべてのデータは平均±標準誤差 (mean±SEM) で表記した。体重、ipGTT、ITT、血管拡張反応試験の評価には繰り返しのある 2-way analysis of variance (ANOVA) 後、Bonferroni 法で post hoc 解析を行った。4 群間の比較には Bartlett の等分散検定にて等分散であることを確認したのち、1-way ANOVA 後、Tukey の多重比較法を用いて post hoc 解析を行った。すべての統計解析は GraphPad Prism Software Ver. 7 (GraphPad Software、La Jolla、CA、USA) を使用し、すべての検定において  $p < 0.05$  を統計学的有意と判定した。

## 第3章 実験結果

### 第1節 EE2K0 マウスの特徴

抗 ERK2 抗体を用いて免疫染色法を行い、血管内皮における ERK2 の発現を確認した (図 4)。EE2K0 マウスでは Control マウスに比較して血管内皮における ERK2 の発現は著明に低下していた。ウエスタンブロッティング法で血管内皮以外の臓器における ERK2 の発現は Control マウスと EE2K0 マウスに差がないことを確認した (図 5)。また、EE2K0 マウスと Control マウスは ND と HFHSD を 24 週間摂取したが、各食事における体重差は認めなかった (図 6A、B)。

### 第2節 血清グルコースとインスリン濃度及び HOMA-IR

糖代謝を評価するために、血清グルコース及びインスリン濃度を測定した。HFHSD を負荷したマウスに空腹時のグルコースとインスリン濃度は EE2K0 マウスにおいて低値であったが、ND を摂取したマウスでは差を認めなかった。また、HOMA-IR は EE2K0-HFHSD 群が Control-HFHSD 群の約 50%であった (表 2)。このことから EE2K0-HFHSD 群のインスリン抵抗性は Control-HFHSD 群と比較して軽度であった。

### 第3節 耐糖能とインスリン感受性

第2節で EE2K0-HFHSD 群のインスリン抵抗性が軽度であることが示されたので、ipGTT と ITT を用いて耐糖能とインスリン感受性を詳細検討した。ipGTT

では、EE2K0-HFHSD 群は Control-HFHSD 群と比較して、血中インスリン濃度が同等であるにもかかわらず、15 分及び 60 分で血清グルコース濃度は低値であった（図 7A、B、C）。また、ITT では、同量のインスリンを投与したにもかかわらず、EE2K0-HFHSD 群の血清グルコース濃度は 60 分及び 120 分で有意に低値であった（図 8A、B）。以上の結果より、EE2K0-HFHSD 群は Control-HFHSD 群と比較して耐糖能及びインスリン感受性の悪化は軽微であると考えられた。

#### 第 4 節 肝臓の病理組織的評価

NAFLD は空腹時の血中グルコース濃度との関連性やインスリン抵抗性との関連性が多数報告されている（31、32、33、34、35、36、37、38）。第 2 節及び第 3 節で論じたように Control-HFHSD 群と比較すると EE2K0-HFHSD 群では空腹時血清グルコース濃度が低く、インスリン抵抗性の悪化も軽微であった。そこで次に NAFLD の程度についての組織学的評価である NAS、肝酵素である alanine aminotransferase (ALT)、肝臓中の中性脂肪及び総コレステロール含量の評価を行った。興味深いことに、EE2K0-HFHSD 群では Control-HFHSD 群と比較して体重に変化がないにも関わらず、脂肪滴の肥大が軽度であり（図 9A）、NAS も低値であった（図 9B）。血清 ALT は Control マウスにおいては ND 群と比較して HFHSD 群で有意に高値であったが、EE2K0 マウスでは ND 群と HFHSD 群で差を認めなかった。肝臓内中性脂肪含量は Control マウス及び EE2K0 マウス共に HFHSD 負荷で高値であったが、EE2K0 マウスは Control マウスと比較してその差が軽微であった（図 10A、B）。肝臓内総コレステロール含

量は Control 及び EE2K0 マウスの両方で HFHSD 負荷により高値であり、2 群間で差は認めなかった (図 10C)。肝組織の線維化についても EE2K0-HFHSD 群では Control-HFHSD 群より軽微であった (図 11A、B)。以上のことから EE2K0 マウスでは HFHSD 負荷による NAFLD の進展が抑制されることが示唆された。

## 第 5 節 収縮期血圧と一酸化窒素 (NO) の評価

インスリン抵抗性は血管内皮機能障害や高血圧と密接な関連があるため収縮期血圧を tail cuff 法で測定した。心拍数に差は認めなかったが、EE2K0 マウスの収縮期血圧は Control マウスに比較して ND および HFHSD 負荷時共に低値であった (図 12A、B)。一酸化窒素 (NO) は内皮由来血管拡張物質として広く知られており血圧低下に作用する (39、40、41)。血液中の NO を比較するために、その代謝産物である血液中の  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  濃度を確認した。EE2K0-HFHSD 群では Control-HFHSD 群と比較して  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  濃度は有意に高値であり、収縮期血圧低下との関連性が示唆された (図 12C)。NO 産生増加と収縮期血圧低下の関係性をさらに検討するために、NO 合成酵素阻害剤である N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Cayman chemical、Ann Arbor、MI、USA) を投与した。収縮期血圧を測定後、7 日間連日 100 mg/kg 体重の L-NAME を Control-HFHSD 群、EE2K0-HFHSD 群に腹腔内投与し、投与後 7 日目に再度収縮期血圧を測定した。投与前の収縮期血圧は EE2K0-HFHSD 群で低値であったが、投与 7 日後の収縮期血圧では Control-HFHSD 群、EE2K0-HFHSD 群共に上昇し、両群の間で差を認めなかった (図 12D)。この結果から L-NAME 投与前の収縮期

血圧の差に NO 産生増加の強い関与が示唆された。以上より EE2KO-HFHSD 群では NO 産生の増加により血管拡張を介して収縮期血圧が低下することが明らかとなった。

## 第 6 節 血管内皮機能の評価

第 5 節では EE2KO-HFHSD 群で NO 産生量が高値であったことを論じた。血中 NO の産生源は主に血管内皮細胞であるために、血管内皮での NO 産生増加が想定された。大動脈血管壁における ACh による内皮依存性血管拡張反応は eNOS からの NO 産生に依存する。そこで大動脈摘出血管片を用いて、内皮依存性血管拡張反応及び内皮非依存性血管拡張反応を検討した。Control-ND 群と EE2KO-ND 群との比較では、ACh 投与による内皮依存性血管拡張反応及び SNP 投与による内皮非依存性血管拡張反応とも同等であった。しかし、EE2KO-HFHSD 群では Control-HFHSD 群と比較して ACh 投与による内皮依存性血管拡張反応は良好であった (図 13A、B)。SNP 投与による内皮非依存性血管拡張反応については両群で差を認めなかった (図 13C)。以上より、EE2KO-HFHSD 群では Control-HFHSD 群と比較して NO による血管内皮機能が保持されることが確認できた。

## 第7節 血管における酸化ストレスの評価

ヘマトキシリン・エオジン染色切片による組織学的評価においては Control-HFHSD 群と EE2K0-HFHSD 群との血管壁に差は認めないが、第5節では EE2K0 マウスでは血中 NO 濃度が高いこと及び第6節では血管内皮機能障害が軽度であることが判明した。

そこで血管壁におけるスーパーオキシド産生を検討するために摘出大動脈片の DHE 染色を行った。Control-HFHSD 群では Control-ND 群と比較して DHE 染色の蛍光強度が高かったが、EE2K0-HFHSD 群と EE2K0-ND 群では差を認めなかった (図 14A、B)。この結果は、Control-HFHSD 群においてスーパーオキシド産生が上昇して NO の生物学的活性を低下させているが、EE2K0-HFHSD 群ではスーパーオキシド産生が増加せずに NO の生物学的活性が保たれていることを示唆していた。

## 第8節 Raf/MEK/ERK 経路の上流及び下流の検討

第7節で HFHSD 負荷時に血管内皮 ERK2 がスーパーオキシド産生を増加して血管内皮機能障害に関与することを検討した。しかし、HFHSD 負荷時の血管内皮機能障害において ERK2 経路の上流及び下流にどのような分子が作用して制御しているかは明らかではない。ERK2 は全身で重要な作用があり (20)、血管内皮における ERK2 の上流・下流分子の検討は薬物標的を考える上でも重要である。血管内皮細胞を用いた検討では ERK2 の上流として MEK が、ERK2 の下流にある血管収縮物質として endothelin 1 (ET1) 及び thromboxane A<sub>2</sub>

(TXA2)、prostaglandin H2 (PGH2) が知られている (図 1、15) (14、23、24)。そこで endothelin A 受容体阻害薬である BQ123、TXA2 及び PGH2 の受容体である TP 受容体の阻害薬である S18886、MEK 阻害薬である U0126 をそれぞれ投与し摘出大動脈片と反応させ、ACh 投与による内皮依存性血管拡張反応を検討した。Control-HFHSD 群において BQ123 投与は内皮依存性血管拡張反応に影響はなかったが、U0126 及び S18886 投与においては内皮依存性血管拡張反応を改善した。一方、BQ123、S18886 及び U0126 を投与した EE2KO-HFHSD 群では ACh による内皮依存性血管拡張反応に有意な変化を認めなかった (図 16)。これらの結果は ERK2 の上流として MEK が、そして下流においては TP 受容体を介する経路が血管内皮障害に関与することが示唆された。次に BQ123、S18886 及び U0126 を加えた際の摘出大動脈片におけるスーパーオキシド産生について検討した。BQ123 で反応させた Control-HFHSD から摘出された大動脈片では蛍光強度に差を認めなかったが、S18886 及び U0126 で反応させた摘出大動脈片では蛍光強度の低下を認めた。一方、EE2KO-HFHSD 群ではいずれの阻害薬でも差を認めなかった (図 17)。以上の結果より MEK/ERK2/TP 受容体経路は大動脈のスーパーオキシド産生を増加させ、血管内皮機能障害に関与したことが示唆された (図 18)。

## 第9節 S18886の経口投与による血管内皮機能、糖代謝及びNAFLDの評価

HFHSD 負荷時の MEK/ERK2/TP 受容体経路はスーパーオキシド産生を介して血管内皮機能を障害することを第8節で論じた。そこで、TP 受容体を持続的に阻害するために S18886 をマウスに長期投与した。このことが *in vivo* における MEK/ERK2/TP 受容体経路の血圧および血管内皮機能に与える影響について検討した。S18886 を摂取した Control-HFHSD 群の収縮期血圧は EE2KO-HFHSD 群と同等まで低下した (図 19A)。次に摘出大動脈片を用いて ACh による内皮依存性血管拡張反応を評価した。EE2KO-HFHSD 群においては S18886 経口摂取で変化を認めなかったが、Control-HFHSD 群では S18886 経口摂取により内皮依存性血管拡張反応が有意に改善した (図 19B、C)。体重及び血清インスリン濃度については S18886 投与で差を認めなかったが、S18886 を経口摂取した Control-HFHSD 群では空腹時グルコース濃度及び HOMA-IR が低下した。一方、S18886 を経口摂取した EE2KO-HFHSD 群では空腹時グルコース濃度のみ低下を認めた (図 20)。さらに肝臓の組織学的検討を行ったところ、NAFLD が部分的に改善を認めた。ヘマトキシリン・エオジン染色において S18886 を経口摂取した Control-HFHSD 群の肝臓で脂肪滴が縮小しており、NAS も低値であった (図 21)。マッソン・トリクローム染色でも S18886 を経口摂取した Control-HFHSD 群で肝臓の線維化が軽度であった (図 22)。HFHSD 負荷時の肥満状態において、S18886 を持続経口摂取することで血管内皮機能、血圧降下に働き、部分的に糖代謝、NAFLD も改善した。

## 第4章 考察

本研究では肥満における血管内皮 ERK2 の役割を *in vivo* で明らかにするために、血管内皮特異的に ERK2 を欠損したマウスである EE2KO を作成した。EE2KO-HFHSD 群では肥満食を摂取した時、同様の体重増加を認めたにもかかわらず、収縮期血圧の上昇、血管内皮障害が野生型よりはるかに軽微であった。その主要原因としては、血管壁におけるスーパーオキシド産生が抑制され NO の生理活性が保たれていたことが観察された。その分子機序として、MEK/ERK2/TP 受容体経路が抑制されることでスーパーオキシド産生が低下したことが示唆された。また、TP 受容体阻害薬である S18886 は血管壁のスーパーオキシドを低下させた。この持続経口投与が HFHSD 負荷時の収縮期血圧と血管内皮機能を改善した。それに伴い部分的に空腹時グルコース濃度や HOMA-IR を改善させ、NAFLD の進展も軽減させた (図 23)。このことから、肥満時の血管内皮における ERK2 は TP 受容体活性化を介して、血圧上昇と血管内皮障害を惹起し、糖代謝、NAFLD 進展にも関与することが判明した。

インスリン抵抗性と血管内皮機能の関連性は既に多数報告されている。肥満やメタボリックシンドロームのようなインスリン抵抗性状態はインスリンシグナル伝達経路における insulin receptor substrate-1 (IRS1) のチロシン残基リン酸化を阻害し、PI3K/AKT/eNOS 経路活性化を抑制して NO 産生を低下させ、血管内皮機能が障害されると考えられている (42、43、44)。本研究ではインスリン抵抗性状態においては血管内皮の ERK2 を介する経路、つまり

PI3K/AKT/eNOS 経路とは別の主要経路である MEK/ERK2/TP 受容体経路を介したスーパーオキシド産生の増加による NO の生理活性低下及び NO の合成阻害のために血管内皮機能障害が生じることを明らかにした。また、MEK/ERK2/TP 受容体経路を遺伝学的、もしくは薬理的に阻害することで血管内皮機能が改善することを示した。一般的に肥満及びメタボリックシンドロームの治療はインスリン抵抗性を改善させるための運動療法や食事療法そして高血圧、脂質異常症に対する薬物治療とされている。本研究において血管内皮におけるインスリンシグナル伝達経路の一つである MEK/ERK2/TP 受容体経路を阻害することでインスリン抵抗性を改善することが示唆され、新たな肥満やメタボリックシンドローム治療法に繋がる可能性が想定された。

高血圧の機序として、血管拡張物質の一つである NO 生理活性が減弱し、血管内皮機能が障害され収縮期血圧が上昇することは広く知られている (45)。NO は ACh、ブラジキニン等の血管作動性物質に反応して、L-アルギニンから eNOS を介して酵素学的に合成される。合成された NO は血管平滑筋に放出され、グアニルシクラーゼを活性化しサイクリック GMP を産生することで血管弛緩を誘発する (46、47、48、49、50)。NO は半減期が短く、酸素や金属と反応して容易に  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  に変換される。本研究においても NO の代謝産物指標、血清  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  濃度は Control-HFHSD 群で低値であり、収縮期血圧が高値であった。一方、EE2KO-HFHSD 群では血清  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  濃度は高値であり、収縮期血圧は Control-HFHSD 群と比較して低値であった。また、eNOS 阻害薬である L-NAME を投与し NO 産生を阻害したところ、EE2KO-HFHSD 群の収縮期血圧が上昇して

Control-HFHSD 群に L-NAME を投与した群と差を認めない程度まで上昇した。このことから、両群の収縮期血圧の差は、NO 生理活性の差によって生じていると考えられた。

NO は血管拡張物質として細動脈において血管抵抗の調整に大きな役割を果たすので、NO 生理活性が減少することは高血圧の原因の一つと考えられる。一方、血圧を上昇させる血管収縮因子としては様々な物質が明らかにされており、Autocrine/Paracrine 的に放出される内皮依存性血管収縮物質の高血圧への関与が報告されている (25)。過去の報告から、Raf/MEK/ERK 経路の下流で血管収縮を起こす内皮依存性血管収縮物質としては ET1 と TXA2 が示されていた (23、24)。我々はそれぞれの受容体阻害薬である BQ123 と S18886 および ERK の上流である MEK の阻害薬 U0126 を使用して ACh による内皮依存性血管拡張反応を評価した。Control-HFHSD 群では U0126 と S18886 の前投与によって血管拡張反応が改善し、BQ123 の前投与では変化を認めなかった。BQ123 の IC50 は約 7 nmol/L であり、本研究で使用した 1  $\mu$ mol/L は endothelin A 受容体を十分に阻害したことは想定された (51)。また、EE2KO-HFHSD 群ではいずれの薬剤も効果が無かった。このことから、ERK2 の上流として MEK が、下流として少なくとも部分的には TP 受容体活性化が、NO 生理活性低下と血管内皮障害に関与することが判明した。

血管壁でのスーパーオキシド産生増加は種々の機序により NO の生物活性を低下させる (52、53、54、55)。また、ミトコンドリア、Nicotinamide

adenine dinucleotide phosphate (NADPH) Oxidase, Xanthine Oxidase などから発生するスーパーオキシドと二次的に産生される reactive oxidative species (ROS) が NO を不活性化することは、動脈硬化、高血圧、糖尿病、肺高血圧症、心不全などの多くの心血管病の進展に関与することが報告がされている (56、57、58)。NO はスーパーオキシドと速やかに結合し ONOO<sup>-</sup> となることで生理活性は低下し (59)、またスーパーオキシドによる eNOS の uncoupling により NO の合成は障害され、NO 産生は減少する (60、61)。本研究では、Control-HFHSD 群の血管壁でスーパーオキシド産生の程度を DHE 染色で評価したところ、Control-ND 群と比較して高値を認めた。そこで、次に MEK/ERK2/TP 受容体経路がスーパーオキシドの産生を促進させ、血管内皮機能障害に働くことを検討した (62)。EE2KO-HFHSD 群では Control-HFHSD 群と比較してスーパーオキシド産生量が低値であり、血管内皮拡張反応低下も軽度であった。これは Control-HFHSD 群において ERK2 を介したスーパーオキシド産生が NO の生理活性を阻害し、低下させたためと考えられた。また、S18886 と U0126 は血管壁スーパーオキシドの産生を低下させ血管内皮機能を改善したにも関わらず BQ123 は作用しなかった。このことから、HFHSD 負荷による肥満・インスリン抵抗性モデルにおいて MEK/ERK2/TP 受容体経路が血管壁スーパーオキシドの産生促進に働き、NO を減少させることが内皮機能障害と密接に関わることが示唆された。

肥満やメタボリックシンドロームでは NAFLD が進展することは広く認知されており、インスリン抵抗性と NAFLD に密接な関係があることは多数報告されて

いる (11、32、33、34、35、36、37、38)。また、NAFLD モデルのラットでは、肝臓の細血管の血管内皮機能が悪化し NO が減少することで、組織の酸素化が低下し、肝臓の微小循環も悪化しているという報告もあり、NO を介する血管内皮機能と NAFLD の関連性も指摘されている (63、64)。本研究では、EE2K0-HFHSD 群は Control-HFHSD 群と比較して NAFLD の程度が軽く、また S18886 を経口投与することでも Control-HFHSD 群の NAFLD は軽減した。本研究では ERK2/TP 経路阻害による血管内皮機能改善がどのようにして糖代謝や NAFLD を改善したかは明らかでない。NOS 欠損マウスはインスリン抵抗性になることが報告されており (65、66)、血管内皮機能とインスリン抵抗性は密接に関係している。インスリン抵抗性は糖・脂肪代謝異常・NAFLD との関係は広く知られており、本研究では血管内皮機能改善がインスリン抵抗性改善により糖代謝・NAFLD を改善した可能性がある。

ここまでの研究では Control-HFHSD 群及び EE2K0-HFHSD 群の血管片への MEK/TP 受容体阻害剤を用いた検討で、MEK/ERK2/TP 受容体経路活性化により、肥満及びメタボリックシンドロームにおける血管壁スーパーオキシド産生と NO 生物学的活性低下が起こり、その結果血圧が上昇し、インスリン抵抗性及び NAFLD の進展に関与しうる事が示唆された。そこで、*in vivo*でのこの経路の関与を調べるために、TP 受容体阻害薬である S18886 を Control-HFHSD 群及び EE2K0-HFHSD 群に 6 週間持続経口投与した。S18886 を投与した Control-HFHSD 群の収縮期血圧、血管内皮機能及びインスリン抵抗性は EE2K0-HFHSD 群と同等までに改善した。以前の報告では、S18886 は LDL 受容体欠損マウスの動脈硬化

を抑制することが示されている (60、67)。アスピリンは主に血小板のシクロオキシゲナーゼを阻害することで TXA2 合成を阻害する薬剤であり、S18886 は TP 受容体を阻害する薬剤である。このアスピリンと S18886 の抗動脈硬化作用を比較検討した結果、S18886 のみ動脈硬化抑制作用が認められたとの報告がある (68)。我々のサーチでは過去にアスピリンがインスリン抵抗性や血管内皮障害を改善したという報告は認めず、アスピリンと S18886 の作用機序の違いが考えられた。その可能性として、まずアスピリンは主に血小板の TXA2 抑制に強く作用するが、S18886 は血管内皮細胞での TP 受容体抑制に作用している可能性がある。次にアスピリンは血管に保護的なプロスタサイクリン産生も抑制する可能性がある (68)。これらにより、メタボリックシンドロームにおける血管内皮機能改善には TXA2 合成阻害より、TP 受容体阻害が有効である可能性が示唆された。

S18886 投与は Control-HFHSD 群の NAFLD や肝臓の線維化を部分的に改善したが、その機序として EE2K0 同様にインスリン抵抗性改善の関与が考案される。Rosado らによると、S18886 は肝臓の血管内皮障害を改善させ、肝血管抵抗を減少し門脈圧を改善したとの報告がある (69)。従って、S18886 が MEK/ERK2/TP 受容体経路を抑制し、肝臓内の血管内皮障害を改善した可能性があり、今後の検討課題と考えられた。

S18886 については terutroban という名称で開発され、頸動脈の動脈硬化を伴う高心血管リスク患者を対象とした臨床研究が行われた。この研究ではヒト

の血管内皮機能を評価したところ、terutroban は血管内皮機能を改善することが明らかとなった (70)。その他にもいくつか臨床研究が実施されており、虚血性脳卒中及び一過性脳虚血の既往のある患者を対象に脳虚血の再発を予防する効果についてアスピリンと比較検討がなされた (71、72)。この研究によると、terutroban はアスピリンと比較し非劣性であったが、副作用が認められたために試験途中で終了した。また、頸動脈の動脈硬化抑制についての臨床研究でも、terutroban はアスピリンとの比較において、非劣性であったが有意性を認めなかった (73)。ヒトにおいて、S18886 がインスリン抵抗性や血管内皮機能、高血圧を改善するかについての研究は未だなされていない。

我々の研究室の Kujiraoka らは以前、肝臓特異的に ERK2 を欠損させたマウスに HFHSD を負荷することで NAFLD が増悪し、インスリン抵抗性を悪化させて、血管壁化ストレスが増強して血管内皮機能障害に働くことを報告した

(22)。本研究では血管内皮特異的に ERK2 を欠損させることで逆に血管壁酸化ストレスを抑制して、血管内皮機能を改善させて、インスリン抵抗性及び NAFLD を改善させた。肥満やメタボリックシンドロームにおいて、ERK2 活性を組織特異的に調節することで NO とスーパーオキシドのバランス、インスリン抵抗性及び NAFLD を調整しうる (図 24)。これら肝細胞と血管内皮細胞での ERK2 の役割は相反しており、ERK2 自身を直接の Drug Target にするのは困難である。本研究で TP 受容体を同定したように、ERK2 の上流や下流を臓器特異性の高い分子を同定することにより、新たな Drug Target の探索に繋がりと考えられた。

本研究は *in vivo* で肥満・メタボリックシンドロームにおける血管内皮 ERK2 の役割を明らかにした初めての報告である。これらの結果は肥満やメタボリックシンドロームにおいて MEK/ERK2/TP 受容体経路は血管内皮機能を障害し、血圧を上昇し、インスリン抵抗性を悪化させ、その結果糖脂肪代謝悪化や NAFLD 増悪に関与することを示唆している。

本研究にはいくつかの研究限界が存在する。まず、本研究では血管内皮特異的 ERK2 ノックアウトマウスを使用したが、メタボリックシンドロームにおける血管内皮の ERK1 の役割はまだ検討されていない。全身の ERK1 を欠損させることでインスリン抵抗性を予防したという報告もあるが、血管内皮での ERK1 の作用は不明である (74)。上述したように当教室の Kujiraoka らは、肝臓特異的に ERK2 を欠損させると、インスリン抵抗性が悪化することを報告した

(22)。ERK1 及び ERK2 は MEK1 という同じ上流分子をもち、リン酸化標的アミノ酸にも強い相同性があるが、その作用の違いは明らかでなく、それぞれの臓器における異なる役割を持っている可能性がある。二番目に我々は血管内皮特異的 ERK2 ノックアウトマウスを使用し、血管内皮の ERK2 を欠損させることで血管内皮機能、インスリン抵抗性及び NAFLD が改善することを明らかにした。しかし、血管内皮機能と NAFLD 改善の関係について詳細な作用機序を明確にできていない。今後 ERK2 欠損マウスを用いた各臓器での検討を更に進めることにより、NO 生理活性と活性酸素調節による血管内皮機能、収縮期血圧、インスリン抵抗性及び NAFLD の関連がより明らかになる可能性が考案された。

## 第5章 結論

マウス肥満モデルである HFHSD を与えたマウスにおいて、血管内皮細胞における Raf/MEK/ERK2/TP 受容体経路は酸化ストレスの原因物質の一つであるスーパーオキシドを増加させて NO の生理活性を減弱することにより、血管内皮機能を悪化させ、高血圧、インスリン抵抗性及び NAFLD を促進していることが示唆された。また、この肥満モデルでは S18886 を用いた TP 受容体阻害によりインスリン抵抗性、NAFLD、収縮期血圧及び血管内皮機能が改善した。このことは、現在直接的な薬物治療法のない肥満やメタボリックシンドロームに対し、今後の治療標的となりうることが考案された。また、このモデルから肥満やメタボリックシンドロームにおいて、Raf/MEK/ERK2/TP 受容体経路活性化による酸化ストレスが、病態の進行に関与することが示唆された。

## 謝辞

本論文作成にあたり、ERK2 flox マウスをご提供頂きました防衛医科大学校  
生化学講座 教授 佐藤 泰司先生、詳細なご批評をしていただきました防衛  
医科大学校内科学1 講座 腎臓内科教授 熊谷 裕生先生に深く感謝いたしま  
す。最後になりましたが、直接御指導を賜りました防衛医科大学校内科学1 講  
座 循環器内科教授 足立 健先生に深甚なる謝意を表します。また、本研究  
の遂行にご支援いただいた多くの先生方、研究科学生、実験技官、秘書の皆様  
方にも深く御礼申し上げます。

## 略語一覽

ACh	acetylcholine
ALT	alanine aminotransferase
ANOVA	analysis of variance
BMI	body mass index
DHE	dihydroethidium
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ET1	endothelin 1
HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance
ipGTT	intraperitoneal glucose tolerance test
ITT	insulin tolerance test
IRS1	insulin receptor substrate-1
L-NAME	N $\omega$ -nitro-l-arginine methyl ester
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
NADPH oxidase	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD activity score
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrite
PCR	polymerase chain reaction
PGH2	prostaglandin H2

PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
ROS	reactive oxidative species
SNP	sodium nitroprusside
TP	thromboxane prostanoid
TXA2	thromboxane A2

## 参考文献

1. Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P. The “metabolically-obese,” normal-weight individual. *Am J Clin Nutr.* 1981;34:1617-1621.
2. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37:1595-1607.
3. World Health Organization. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO Consultation. Geneva, World Health Org, 1999.
4. World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data. [https://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight\\_text/en/Accessed](https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/Accessed) Nov 29
5. 厚生労働省. 平成 28 年(2016) [https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/kekkagaiyou\\_7.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/kekkagaiyou_7.pdf) Accessed Nov 29, 2018.
6. 厚生労働省. 平成 30 年(2018) <https://www.mhlw.go.jp/content/000378318.pdf> Accessed Nov 29, 2018.
7. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2001;24:683-9.
8. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA.* 2002;288:2709-16.
9. Girman CJ, Rhodes T, Mercuri M, Pyörälä K, Kjekshus J, Pedersen TR, Beere PA, Gotto AM, Clearfield M. The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Am J Cardiol.* 2004;93:136-41.
10. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L’Italien GJ, Pio JR, Williams GR. Impact of the metabolic syndrome on mortality from

- coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004;110:1245-50.
11. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001;50:1844-50.
  12. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, Zenari L, Falezza G. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2005;54:3541-6.
  13. Mancia G, Bombelli M, Corrao G, Facchetti R, Madotto F, Giannattasio C, Trevano FQ, Grassi G, Zanchetti A, Sega R. Metabolic syndrome in the Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni (PAMELA) study: daily life blood pressure, cardiac damage, and prognosis. *Hypertension*. 2007;49:40-7.
  14. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219:22-96.
  15. Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2052-2059.
  16. Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res*. 2004;94:1211-8.
  17. Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest*. 1998;101:1784-8.
  18. Goodyear L, Giorgino F, Sherman L, Carey J, Smith R, Dohm G. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are

- decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest.* 1995;95:2195-204.
19. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest.* 1999;104:447-57.
  20. Boulton T, Nye S, Robbins D, Ip N, Radziejewska E, Morgenbesser S, DePinho R, Panayotatos N, Cobb M, Yancopoulos G. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 1991;65:663-675.
  21. Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL, Meloche S. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep.* 2003;4:964-8.
  22. Kujiraoka T, Satoh Y, Ayaori M, Shiraishi Y, Arai-Nakaya Y, Hakuno D, Yada H, Kuwada N, Endo S, Isoda K, Adachi T. Hepatic extracellular signal-regulated kinase 2 suppresses endoplasmic reticulum stress and protects from oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000361.
  23. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-415.
  24. Gluais P, Paysant J, Badier-Commander C, Verbeuren T, Vanhoutte PM, Félétou M. In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A2 as endothelium-derived contracting factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H2255-64.
  25. Félétou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol.* 2009;156:563-74.
  26. Satoh Y, Endo S, Nakata T, Kobayashi Y, Yamada K, Ikeda T, Takeuchi A, Hiramoto T, Watanabe Y, Kazama T. ERK2 contributes to the control of social behaviors in mice. *J Neurosci.* 2011;31:11953-67.

27. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-21.
28. Dong Y, Liu L, Kataoka K, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, Nako H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53:180-191.
29. Miller FJ, Gutterman D, Rios C, Heistad D, Davidson B. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*. 1998;82:1298-1305.
30. Zuccollo A, Shi C, Mastroianni R, Maitland-Toolan K, Weisbrod R, Zang M, Xu S, Jiang B, Oliver-Krasinski J, Cayatte A, Corda S, Lavielle G, Verbeuren T, Cohen R. The thromboxane A2 receptor antagonist S18886 prevents enhanced atherogenesis caused by diabetes mellitus. *Circulation*. 2005;112:3001-8.
31. Rizza R. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes*. 2010;59:2697-707.
32. Loomba R1, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E, Bass NM. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology*. 2012;56:943-51.
33. Abenavoli L, Milic N, Di Renzo L, Preveden T, Medić-Stojanoska M1, De Lorenzo A. Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2016;22:7006-16. 31.
34. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med*. 1999;107:450-5.

35. Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:181-205.
36. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology.* 2002;35:367-72.
37. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia.* 2005;48:634-42.
38. Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3023-8.
39. Feelisch M, Noack EA. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol.* 1987;139:19-30.
40. Hutchinson PJ, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. *Eur J Pharmacol.* 1987;141:445-51.
41. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 1983;52:352-7.
42. Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res.* 2004;94:1211-8.
43. Sesti G, Federici M, Hribal M, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 2001;15:2099-111.

44. Goodyear L, Giorgino F, Sherman L, Carey J, Smith R, Dohm G. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest.* 1995;95:2195-204.
45. Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res.* 1995;18:87-98.
46. Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, Busse R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res.* 1986;58:531-8.
47. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986;237:893-900.
48. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:3375-8.
49. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature.* 1983;306:174-6.
50. Aisaka K, Gross SS, Griffith OW, Levi R. NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;160:881-6.
51. Ihara M, Ishikawa K, Fukuroda T, Saeki T, Funabashi K, Fukami T, Suda H, Yano M. In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA Receptor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20 Suppl12:S11-4.
52. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2479-88.

53. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992;267:24173-6.
54. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation.* 1991;83:652-60.
55. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986;250:H822-7.
56. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002;105:1567-72.
57. Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:5949-53.
58. Utsumi H, Muto E, Masuda S, Hamada A. In vivo ESR measurement of free radicals in whole mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;172:1342-8.
59. Tomasz J, Guzik, Nick E. J. West, Ravi Pillai, David P. Taggart and Keith M. Channon. Nitric Oxide Modulates Superoxide Release and Peroxynitrite Formation in Human Blood Vessels. *Hypertension.* 2002;39:1088-1094.
60. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113:1708-14.
61. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 2002;109:817-26.
62. Ding L, Chapman A, Boyd R, Wang H. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H2997-3005.
63. Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue

- oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis. *Microvasc Res.* 2005;70:129–36.
64. Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology.* 2000;32:1280–8.
  65. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.* 2011; 13: 294–307.
  66. Tsutsui M, Tanimoto A, Tamura M, Mukae H, Yanagihara N, Shimokawa H, Otsuji Y. Significance of nitric oxide synthases: lessons from triple nitric oxide synthases null mice. *J Pharmacol Sci.* 2015;127:42–52.
  67. Worth N, Berry C, Thomas A, Campbell J. S18886, a selective TP receptor antagonist, inhibits development of atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 2005;183:65–73.
  68. Cayatte A, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren T, Cohen R. The Thromboxane Receptor Antagonist S18886 but Not Aspirin Inhibits Atherogenesis in Apo E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1724–8.
  69. Rosado E, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Tripathi D, Garcia-Caldero H, Bosch J, Garcia-Pagan J. Terutroban, a TP-receptor antagonist, reduces portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology.* 2013;58:1424–35.
  70. Lesault P, Boyer L, Pelle G, Covali-Noroc A, Rideau D, Akakpo S, Teiger E, Dubois-Rande J, Adnot S. Daily administration of the TP receptor antagonist terutroban improved endothelial function in high-cardiovascular-risk patients with atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71:844–51.
  71. Hennerici M, Bots M, Ford I, Laurent S, Touboul P. Rationale, design and population baseline characteristics of the PERFORM

vascular project: an ancillary study of the Prevention of cerebrovascular and cardiovascular Events of ischemic origin with terutroban in patients with a history of ischemic stroke or transient ischemic attack (PERFORM) trial. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010;24:175-80.

72. Bousser M, Amarenco P, Chamorro A, Fisher M, Ford I, Fox K, Hennerici M, Mattle H, Rothwell P, de Cordoue A, Frattacci M and PERFORM Study Investigators. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet.* 2011;377:2013-22.
73. Bots ML, Ford I, Lloyd SM, Laurent S, Touboul PJ, Hennerici MG, Prevention of C and Cardiovascular Events of Ischemic Origin With Terutroban in Patients With a History of Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack Vascular Ultrasound Study, Investigators. Thromboxane prostaglandin receptor antagonist and carotid atherosclerosis progression in patients with cerebrovascular disease of ischemic origin: a randomized controlled trial. *Stroke.* 2014;45:2348-53.
74. Jager J, Corcelle V, Gremeaux T, Laurent K, Waget A, Pages G, Binetruy B, Le Marchand-Brustel Y, Burcelin R, Bost F, Tanti J. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia.* 2011;54:180-9.

## 図表

	Normal Diet (CE-7)		High-Fat/High-Sucrose Diet (F2HFHSD)	
	g/100 g	kcal, %	g/100 g	kcal, %
Total calories	343 kcal		481 kcal	
Protein	17.7 g	20.6	20.7 g	17.2
Fat	3.8 g	10.0	29.1 g	54.5
Carbohydrate	59.4 g	69.4	34.0 g	28.3

### Ingredient:

Casein 25%, Cellulose 5%, a-Corn starch 14.869%, Sucrose 20%,  
 Vitamin mix (AIN-93) 1%, Mineral mix (AIN-93G) 3.5%, Beef tallow 14%  
 Choline bitartrate 0.25%, tert-Butylhydroquinone 0.006%, Lard 14%  
 Soybean oil 2%, L-Cysteine 0.375%

表 1. 通常食 (ND) 及び高脂肪高シヨ糖食 (HFHSD) の組成

	ND		HFHSD	
	Control	EE2KO	Control	EE2KO
Serum Glucose (mg/dl)	90.6±3.3	85.8±6.7	136.1±4.8**	109.3±6.1**†
Insulin (ng/ml)	0.44±0.11	0.123±0.02	2.23±0.36**	1.11±0.22*††
HOMA-IR	25.9±5.64	7.86±1.31	240.9±48.4**	108.4±20.9††

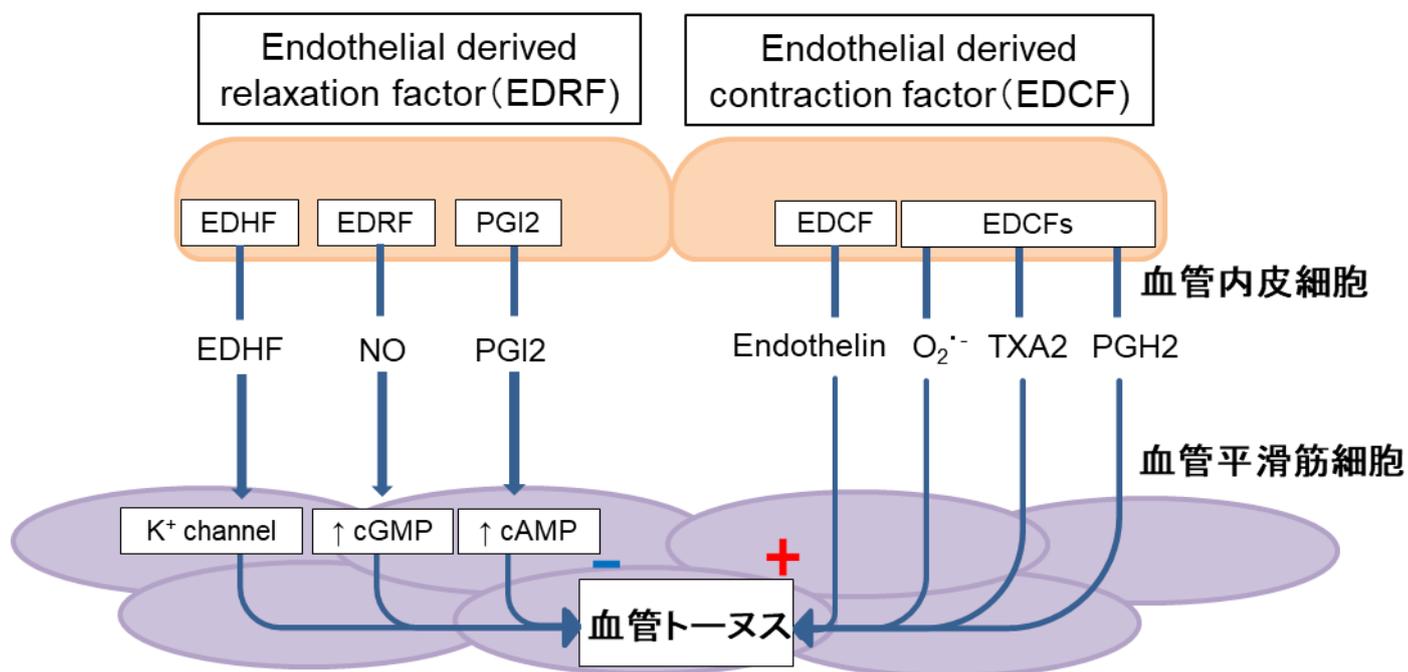
表 2. 各群における血清グルコース及びインスリン濃度及び HOMA-IR

(Control-ND、n=11; EE2KO-ND、n=9; Control-HFHSD、n=11; EE2KO-HFHSD、n=9)

HFHSD を摂取したマウスにおいて空腹時のグルコースとインスリン濃度は EE2KO マウスで低値であったが、ND を摂取したマウスでは差は認めなかった。また、HOMA-IR は EE2KO-HFHSD 群が Control-HFHSD 群の約 50%であった。

データは平均値±標準誤差で示した。\*P<0.05 vs ND 群、\*P<0.01 vs ND 群、

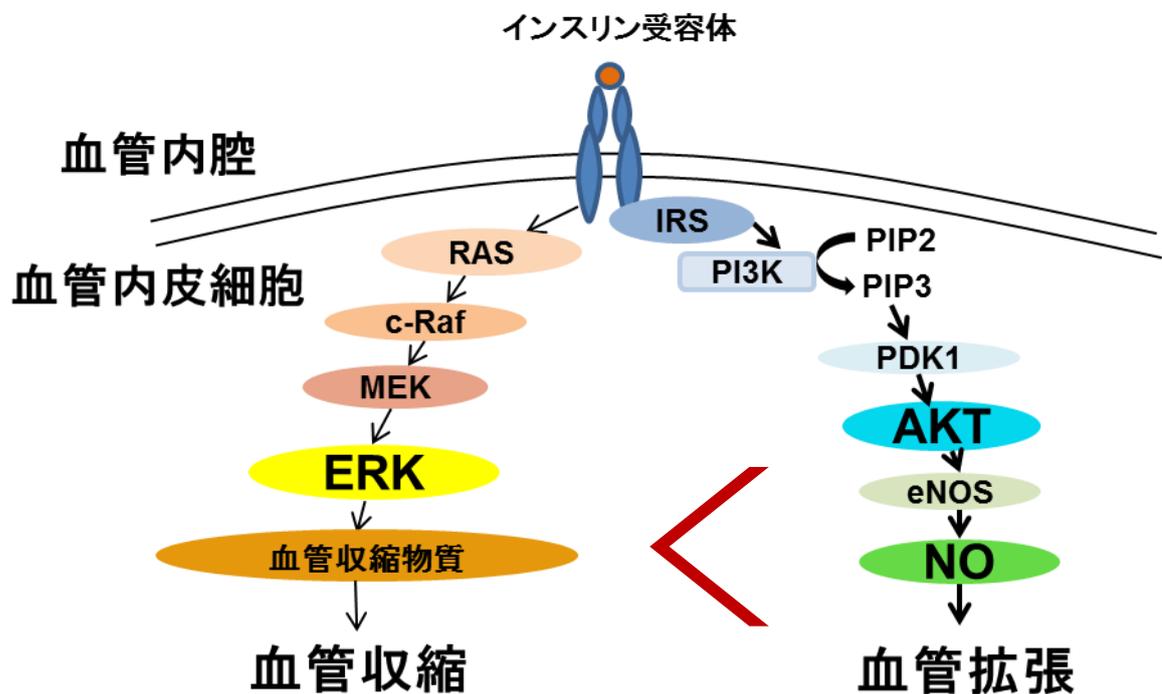
†P<0.05 vs Control-HFHSD 群、††P<0.01 vs Control-HFHSD 群。



cAMP : 環状アデノシンーリン酸、cGMP : 環状グアノシンーリン酸  
 EDCF (s) : 内皮由来収縮因子、EDHF : 内皮細胞依存性過分極因子  
 EDRF : 内皮由来弛緩因子、NO : 一酸化窒素、O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : スーパーオキシド  
 TXA2 : トロンボキサン A2、PGH2: プロスタグランジン H2  
 PGI2 : プロスタグランジン I2 (プロサイリン)

図 1. 血管壁における内皮依存性血管拡張及び収縮の機序 (14)

内皮依存性血管拡張においては EDHF、NO 及び PGI2 が血管拡張物質として知られている。一方、内皮依存性血管収縮においては endothelin、スーパーオキシド、thromboxane A2 及び prostaglandin H2 が血管収縮物質として知られている。

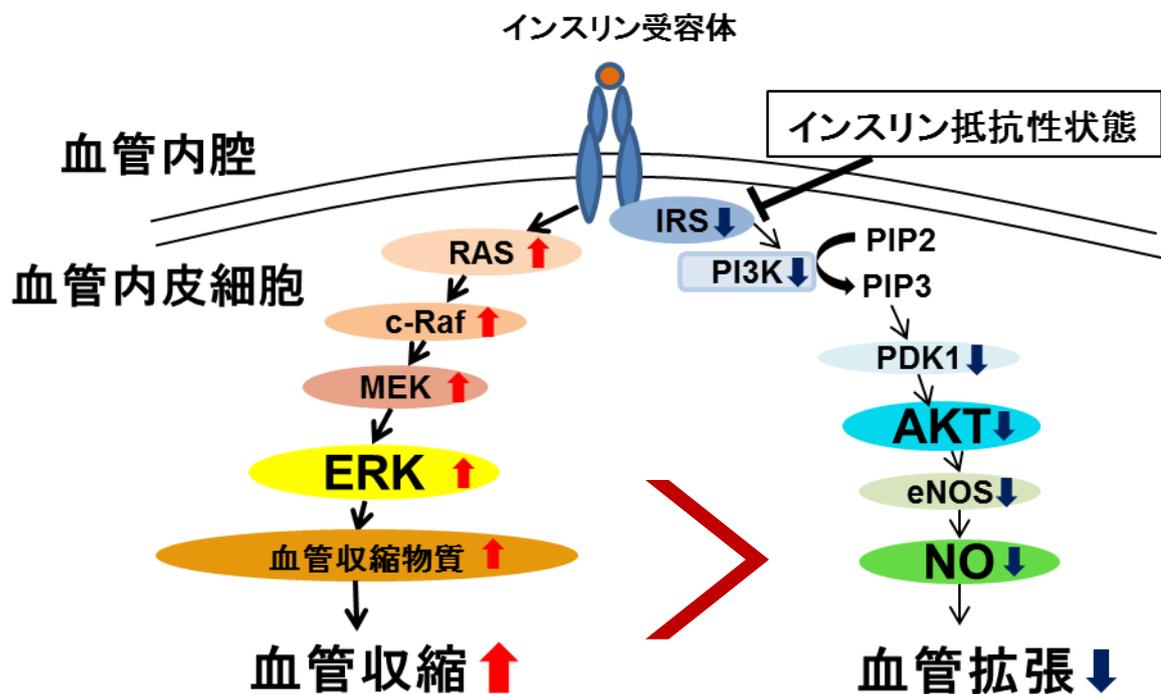


AKT : プロテインキナーゼ B、eNOS : 血管内皮型一酸化窒素合成酵素  
 ERK : 細胞外シグナル調節キナーゼ、IRS : インスリン受容体基質  
 MEK : MAPK/ERK キナーゼ、NO : 一酸化窒素  
 PDK1 : ホスフォイノシチド依存性キナーゼ 1  
 PIP2 : ホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸  
 PIP3 : ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸  
 PI3K : ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ、RAS : RAS タンパク質

図 2. インスリンシグナル伝達経路 (15)

インスリンシグナル伝達経路には PI3K/AKT/eNOS/NO 経路と Raf/MEK/ERK 経路

が存在し、通常では PI3K/AKT/eNOS/NO 経路が優位となっている。



AKT : プロテインキナーゼ B、eNOS : 血管内皮型一酸化窒素合成酵素  
 ERK2 : 細胞外シグナル調節キナーゼ 2、IRS : インスリン受容体基質  
 MEK : MAPK/ERK キナーゼ、NO : 一酸化窒素  
 PDK1 : ホスフォイノシチド依存性キナーゼ 1  
 PIP2 : ホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸  
 PIP3 : ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸  
 PI3K : ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ、RAS : RAS タンパク質

図 3. 肥満及びメタボリックシンドロームにおけるインスリンシグナル伝達経路の変化 (16、17、18、19)

メタボリックシンドロームでは PI3K/AKT/eNOS/NO 経路が減弱し、相対的に Raf/MEK/ERK 経路が亢進する。

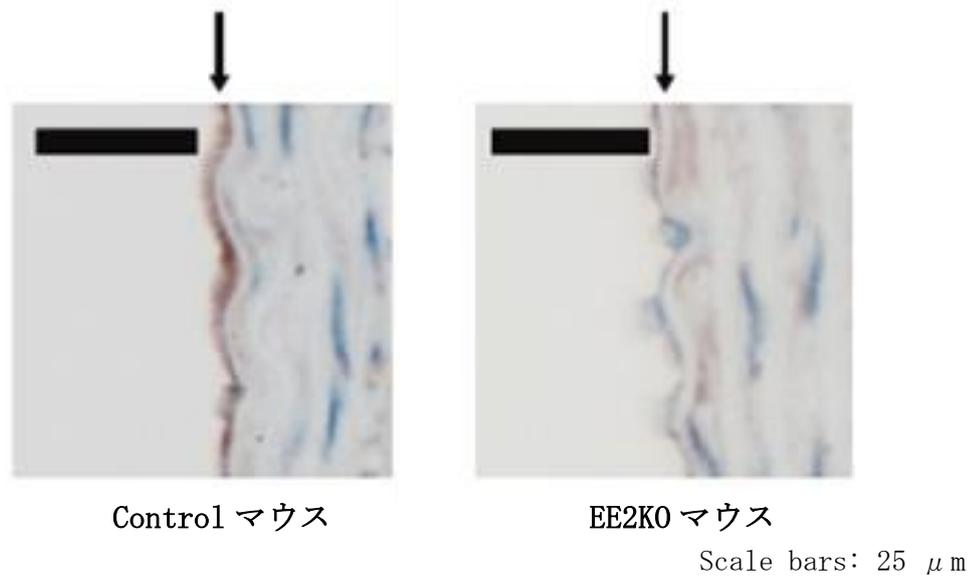


図 4. 抗 ERK2 抗体免疫染色法

抗 ERK2 抗体を使用し、血管内皮細胞における ERK2 の発現を免疫染色法で確認した。Control マウスの血管内皮細胞においては ERK2 の発現を確認できたが、EE2KO マウスでは ERK2 の発現は著明に低下していた。

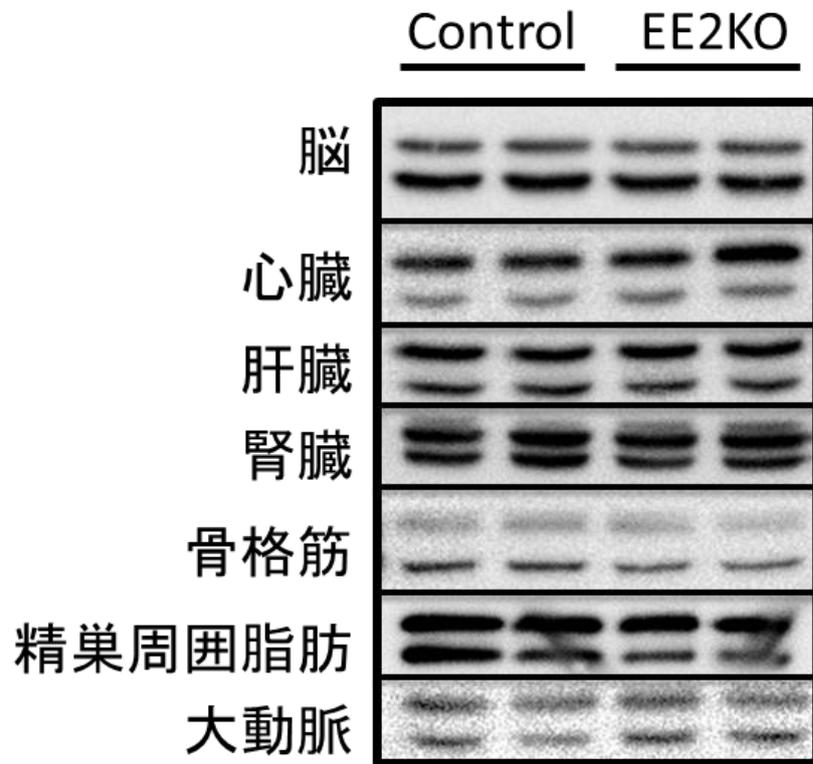
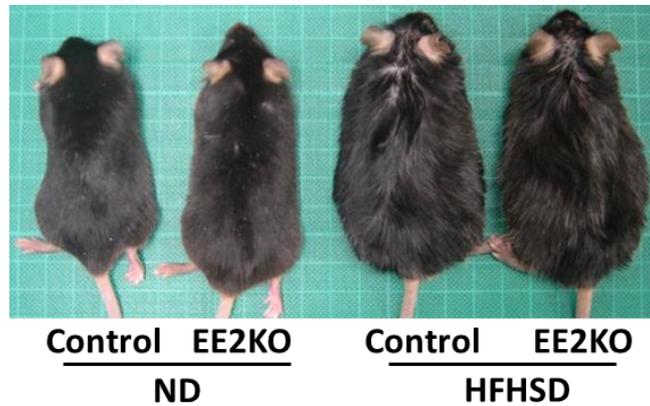


図 5. 各臓器における ERK のウエスタンブロッティング法  
 (上段 : ERK1、下段 : ERK2)

抗 ERK 抗体を用いて各臓器における ERK1/2 の発現をウエスタンブロッティング法で確認した。脳、心臓、肝臓、腎臓、骨格筋、精巣周囲脂肪及び大動脈において、EE2KO マウスの ERK2 の発現は Control マウスと差を認めなかった。

A



B

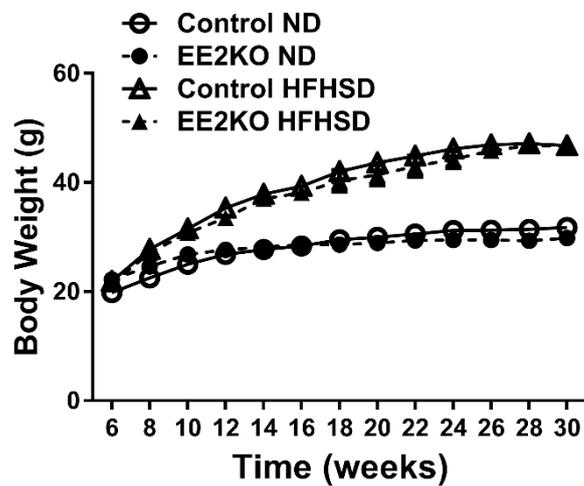


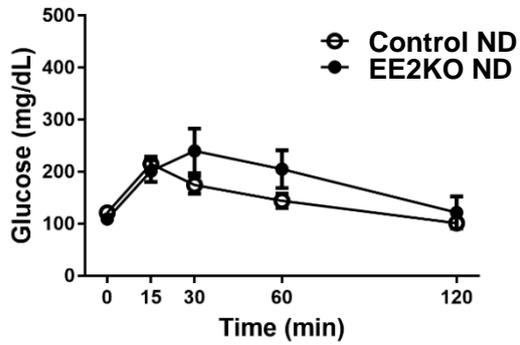
図 6. 各群における体重の推移

A : 30 週目における各群のマウスのサイズの比較

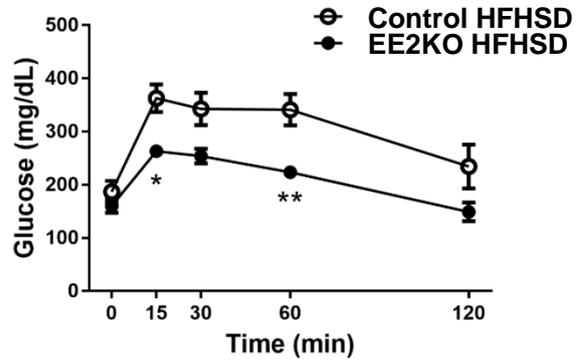
B : 各群のマウスの体重推移 (N=9)

EE2KO マウスと Control マウスは通常食 (ND) と高脂肪高シヨ糖食 (HFHSD) を 24 週間摂取したが、食事ごとに体重差は認めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。

A



B



C

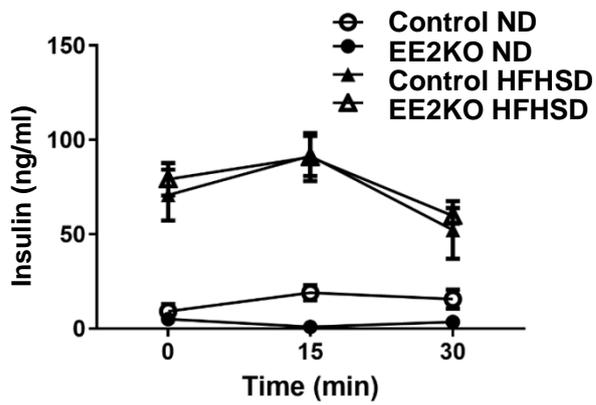


図7. ipGTTによる耐糖能

A : Control-ND 群及び EE2KO-ND 群の ipGTT における血清グルコース濃度

(n=6-7)

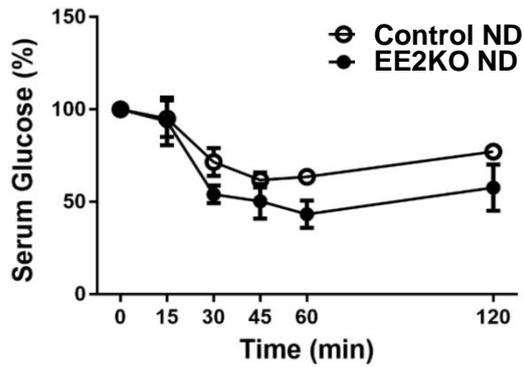
B : Control-HFHSD 群及び EE2KO-HFHSD 群の ipGTT における血清グルコース濃度

(n=7)

C : 各群の ipGTT における血清インスリン濃度 (n=6-7)

ipGTT では、EE2K0-HFHSD 群は Control-HFHSD 群と比較して、インスリン量に差はないにもかかわらず、血清グルコース濃度の増加は有意に緩やかであった。データは平均値±標準誤差で示した。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  vs Control-ND または Control-HFHSD 群。

A



B

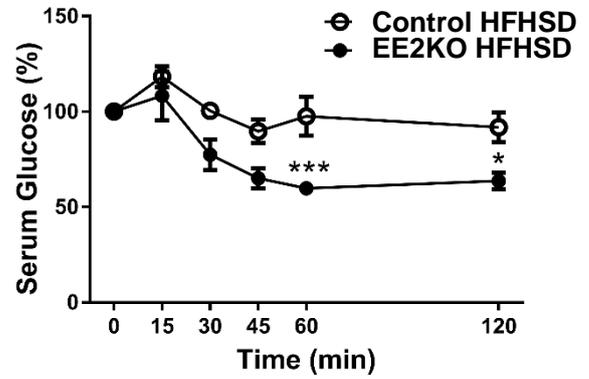


図 8. ITT によるインスリン感受性

A : Control-ND 群及び EE2KO-ND 群の ITT における血清グルコース濃度

(n=6-7)

B : Control-HFHSD 群及び EE2KO-HFHSD 群の ITT における血清グルコース濃度

(n=7)

同量のインスリンを使用したにもかかわらず、EE2KO-HFHSD 群の血清グルコース濃度は Control-HFHSD 群と比較して有意に低値であった。EE2KO-HFHSD 群のインスリン感受性の低下は Control-HFHSD 群より軽微であった。データは平均値±標準誤差で示した。\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$  vs Control-HFHSD 群。

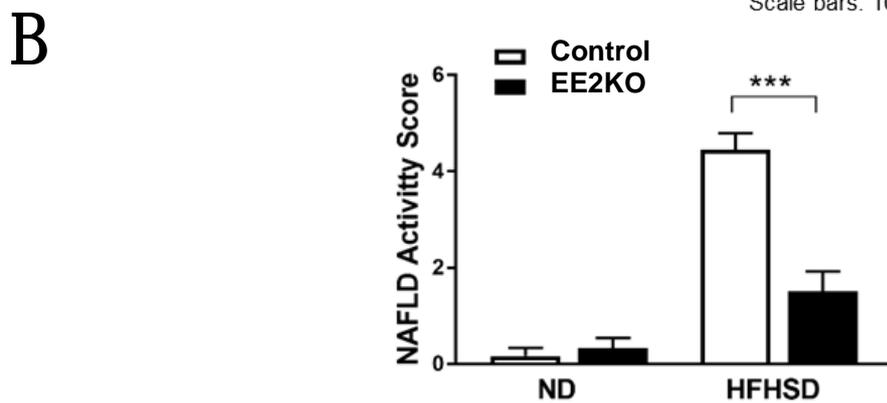
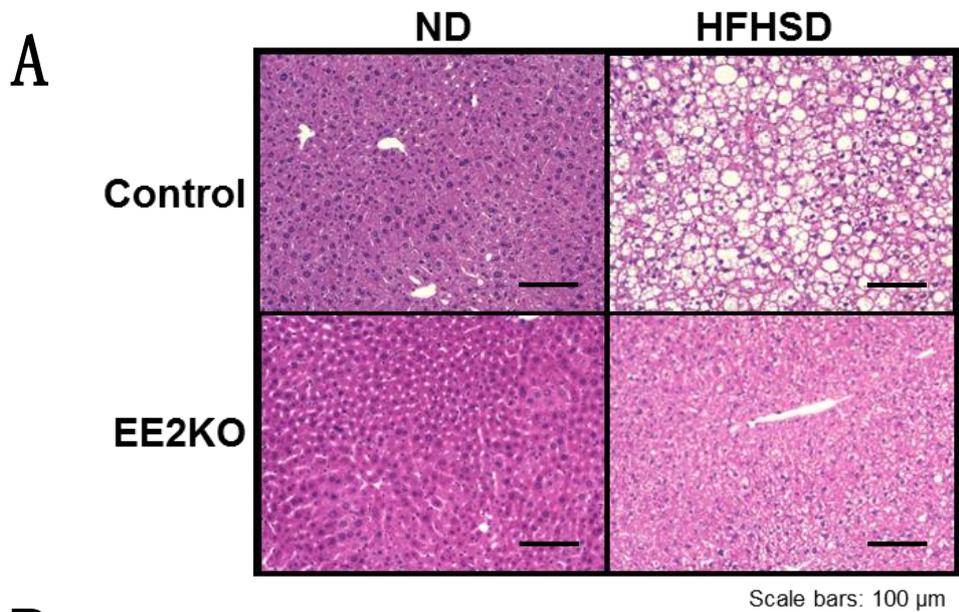


図 9. 肝臓の病理組織学的評価

A : 肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色

B : NAFLD Activity Score (NAS) (n=9-11)

EE2KO-HFHSD 群では Control-HFHSD 群に比較して脂肪滴の肥大が軽度であり、NAS も低値であり、肝組織の脂肪化は軽度であった。データは平均値±標準誤差で示した。\*\*\* $P < 0.001$  vs Control-HFHSD 群。

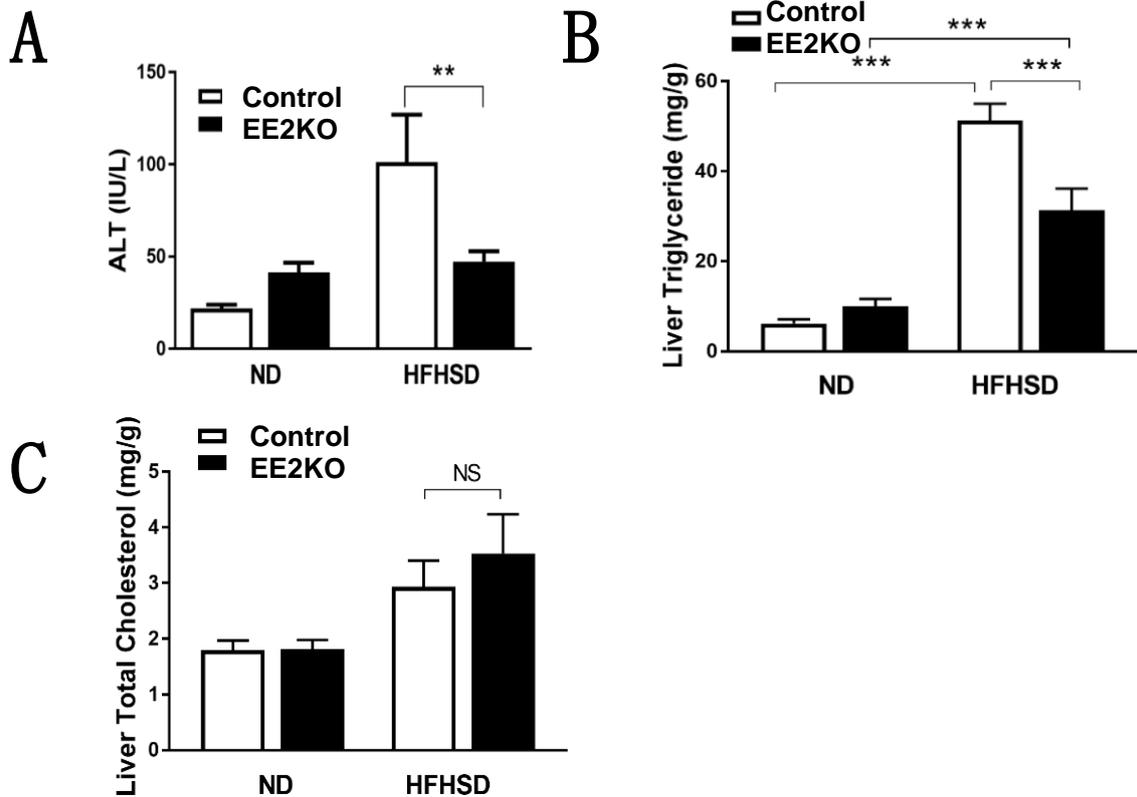


図 10. 血清 ALT 及び肝臓組織における脂質評価

A : 血清 ALT 値 (n=6-12)

B : 肝臓組織中の中性脂肪含量 (n=10-15)

C : 肝臓組織中の総コレステロール含量 (n=10)

EE2KO-HFHSD 群の血清 ALT 値及び肝臓内中性脂肪含量は Control-HFHSD 群と比較して低値であった。一方、肝臓内総コレステロール含量に差は認めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001 vs Control-ND、EE2KO-ND 群または Control-HFHSD 群。

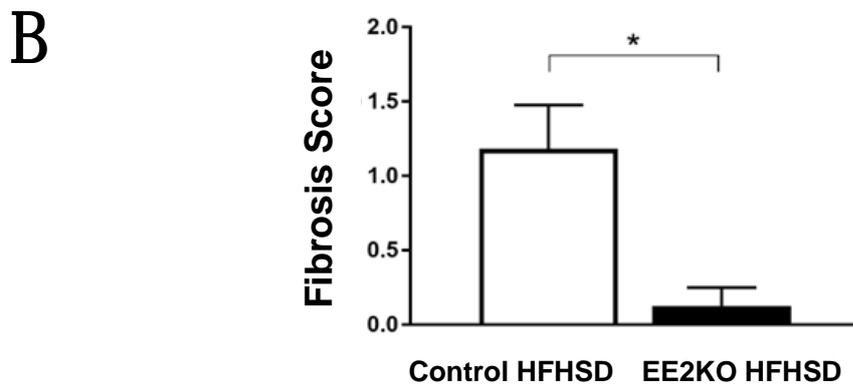
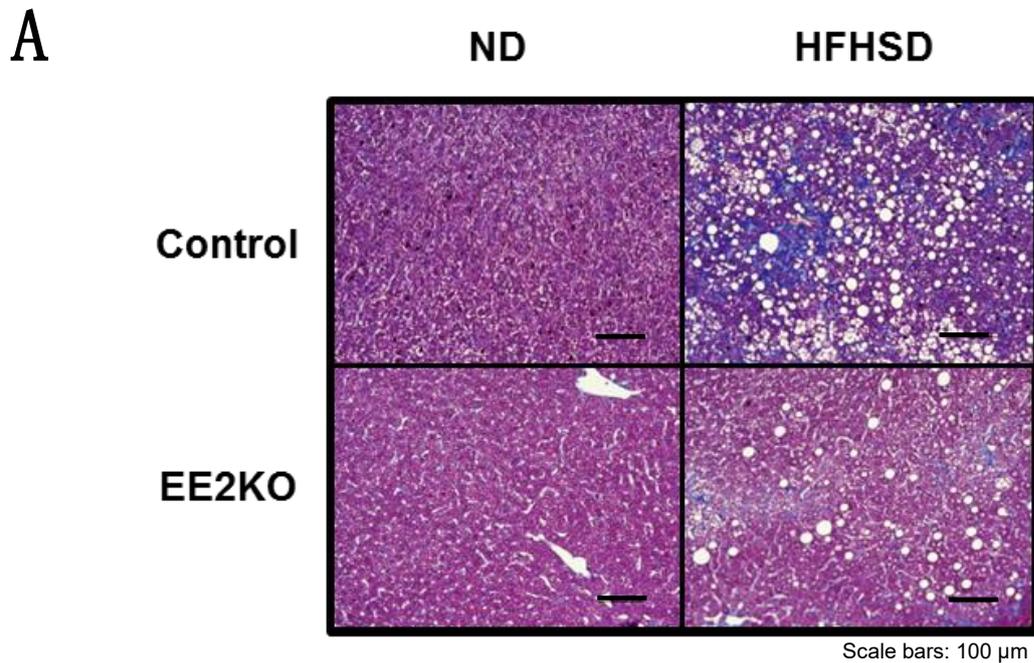


図 11. 肝臓の線維化についての病理組織学的評価

A : 肝臓のマッソン・トリクローム染色

B : 肝臓の Fibrosis Score (n=9-11)

肝組織の線維化は Control-HFHSD 群で EE2KO-HFHSD 群よりも多く認めた。

Control-ND 群及び EE2KO-ND 群は線維化を認めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。\* $P < 0.05$  vs Control-HFHSD 群。

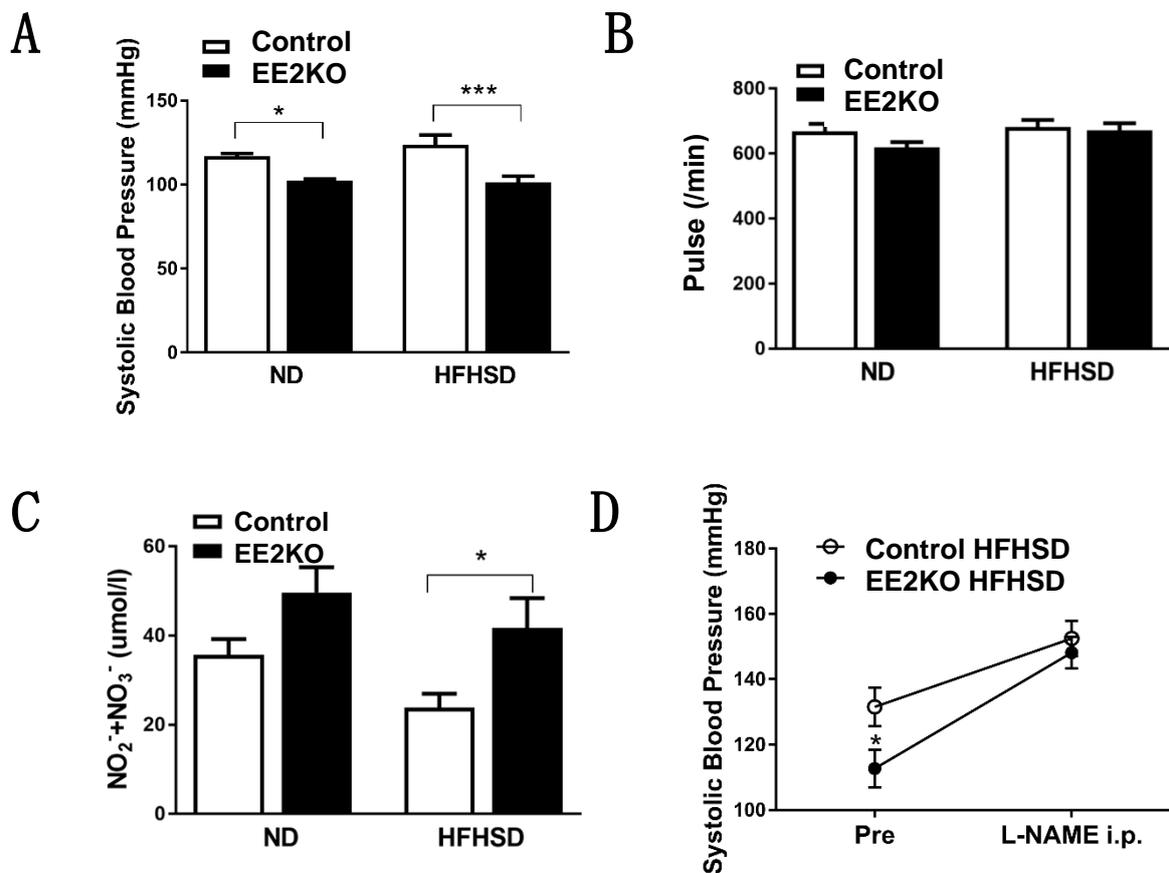


図 12. 収縮期血圧、心拍数及び血中  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  濃度

A : 収縮期血圧 (n=8)

B : 脈拍 (n=8)

C : 血中  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  濃度 (n=9-16)

D : L-NAME の連日腹腔内投与による収縮期血圧の変化 (n=7)

EE2KO マウスの収縮期血圧は低値であった。また、血中の  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  濃度が EE2KO-HFHSD 群で高値であった。L-NAME 投与により eNOS を阻害したところ、Control-HFHSD 群と EE2KO-HFHSD 群の収縮期血圧の差が消失した。データは平均値±標準誤差で示した。\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$  vs Control 群。

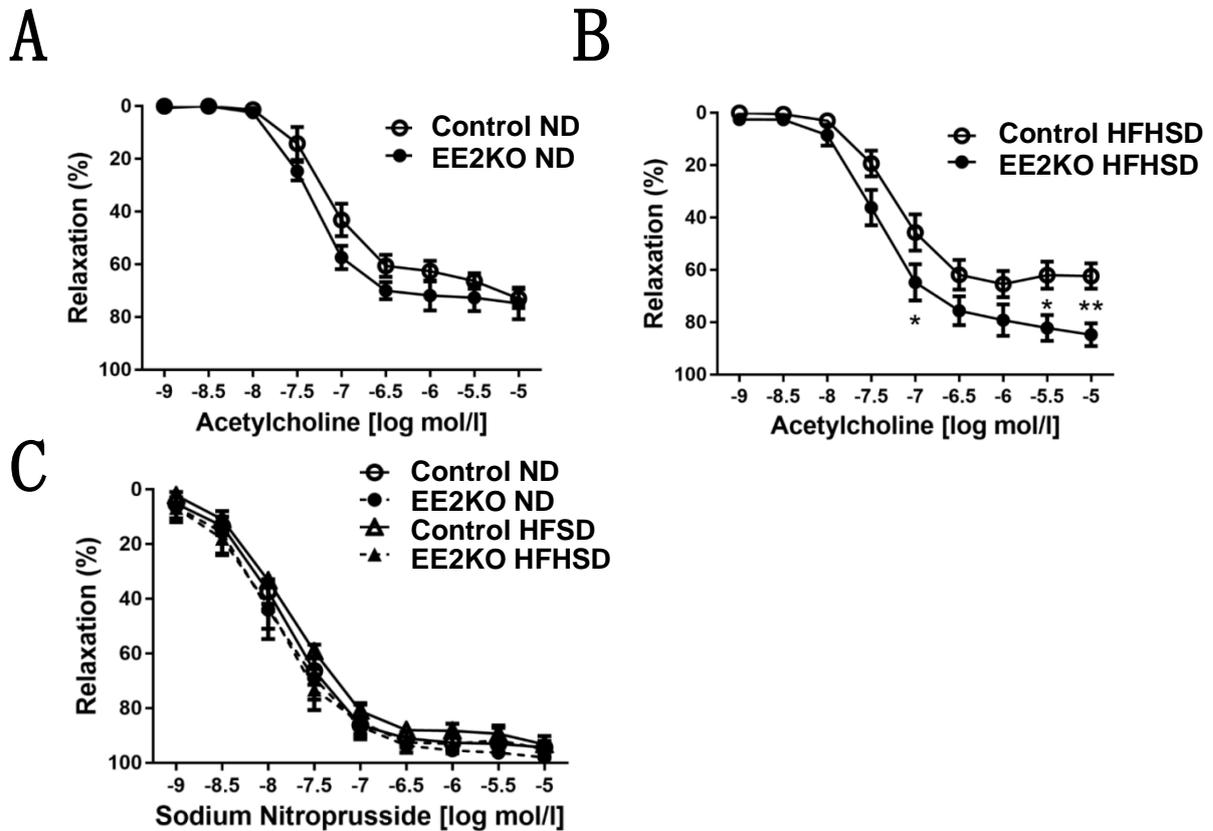


図 13. 内皮依存性及び内皮非依存性血管拡張反応

A : ACh による ND 群の内皮依存性血管拡張反応 (n=5-7)

B : ACh による HFHSD 群の内皮依存性血管拡張反応 (n=7-10)

C : SNP による内皮非依存性血管拡張反応 (n=5-10)

ACh 投与による内皮依存性血管拡張反応では、ND 群では差を認めなかったが、

EE2KO-HFHSD 群では Control-HFHSD 群と比較して血管拡張能は良好であった。

一方、SNP 投与による内皮非依存性血管拡張反応においては、4 群間で差を認

めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。\*P<0.05、\*\*P<0.01 vs

Control 群。

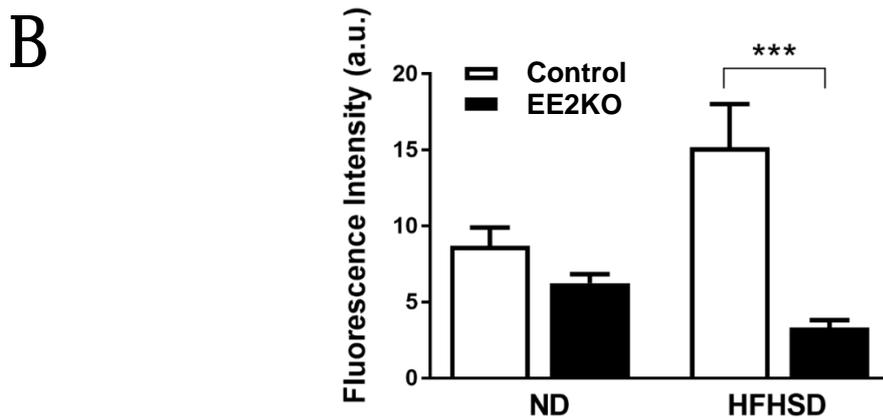
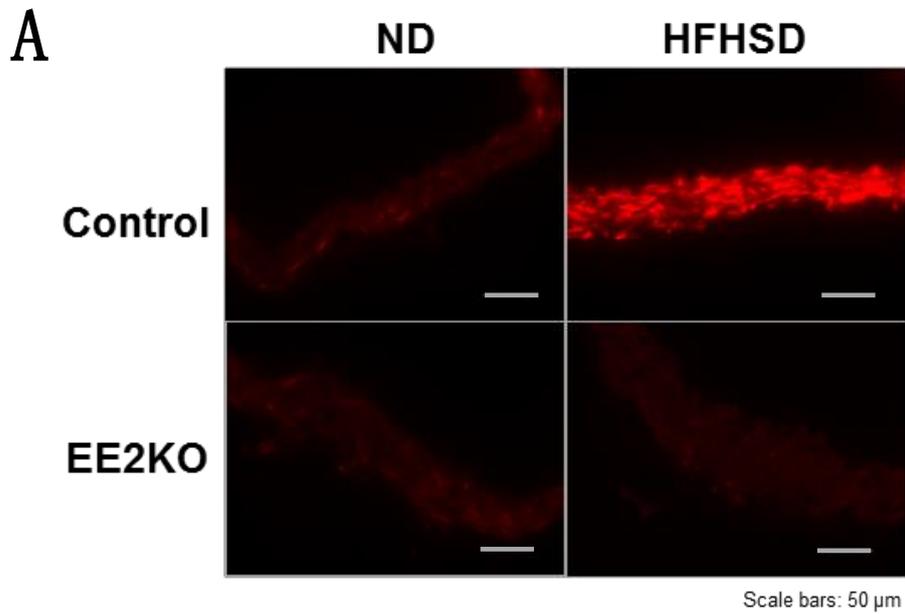
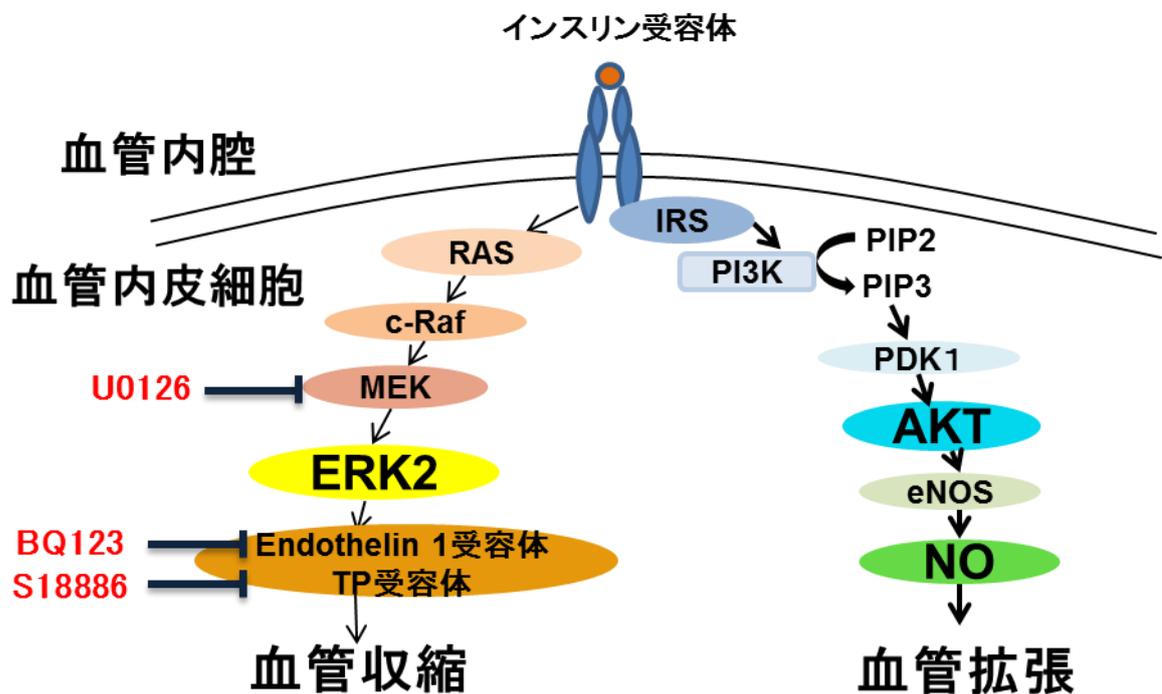


図 14. 血管におけるスーパーオキシド産生

A : 血管の DHE 染色

B : 血管の DHE 染色の蛍光強度 (n=3-8)

Control-HFHSD 群では Control-ND 群と比較して DHE 染色の蛍光強度は高値であったが、EE2KO-HFHSD 群では EE2KO-ND 群と差を認めなかった。データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。\*\*\* $P < 0.001$  vs Control-HFHSD 群。



AKT : プロテインキナーゼ B、eNOS : 血管内皮型一酸化窒素合成酵素  
 ERK2 : 細胞外シグナル調節キナーゼ 2、IRS : インスリン受容体基質  
 MEK : MAPK/ERK キナーゼ、NO : 一酸化窒素  
 PDK1 : ホスフォイノシチド依存性キナーゼ 1  
 PIP2 : ホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸  
 PIP3 : ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸  
 PI3K : ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ、RAS : RAS タンパク質  
 TP : トロンボキサンプロスタノイド

図 15. MEK、endothelin 1 受容体及び TP 受容体の阻害薬とインスリン

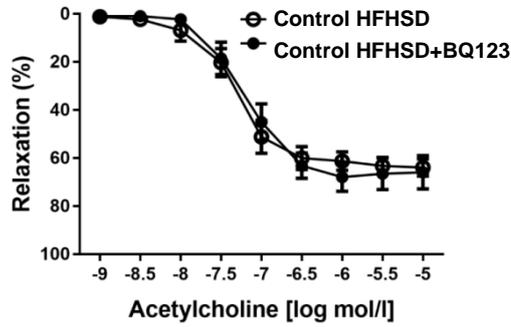
シグナル伝達経路 (14、23、24)

ERK2 の上流の候補である MEK の阻害薬、U0126 と ERK2 の下流の血管内皮依存

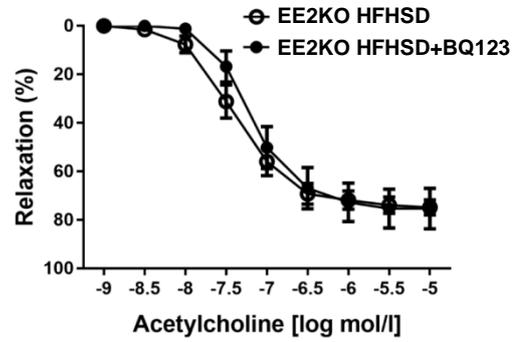
性収縮物質である endothelin 1 及び TP 受容体阻害薬、BQ123 及び S18886 を使

用して血管機能障害における機序を検討した。

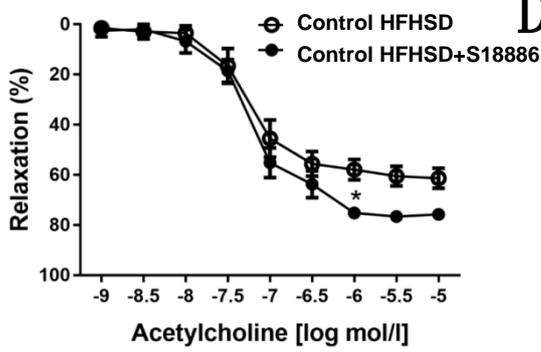
A



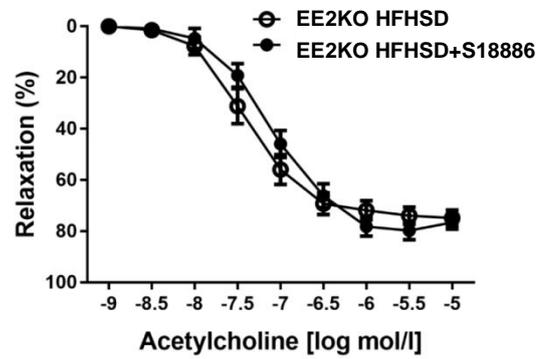
B



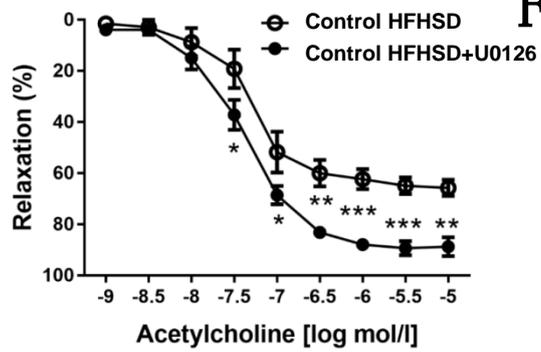
C



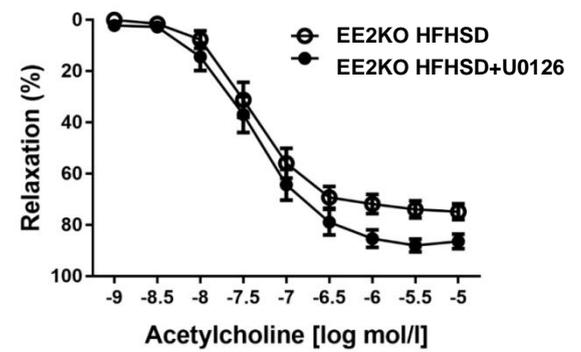
D



E



F



(説明は次頁)

図 16. 各阻害薬使用時の内皮依存性血管拡張反応

A : BQ123 (endothelin 1 受容体阻害薬) による Control-HFHSD 群の内皮依存性血管拡張反応 (n=8-9)

B : BQ123 による EE2K0-HFHSD 群の内皮依存性血管拡張反応 (n=7-9)

C : S18886 (TP 受容体阻害薬) による Control-HFHSD 群の内皮依存性血管拡張反応 (n=7)

D : S18886 による EE2K0-HFHSD 群の内皮依存性血管拡張反応 (n=7-9)

E : U0126 (MEK 阻害薬) による Control-HFHSD 群の内皮依存性血管拡張反応 (n=7)

F : U0126 による EE2K0-HFHSD 群の内皮依存性血管拡張反応 (n=9-10)

Control-HFHSD 群では、U0126 と S18886 の前投与により内皮依存性血管拡張反応が増強した。BQ123 の前投与では差を認めなかった。一方、EE2K0-HFHSD 群ではいずれの阻害薬の前投与でも差を認めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  vs Control 群。

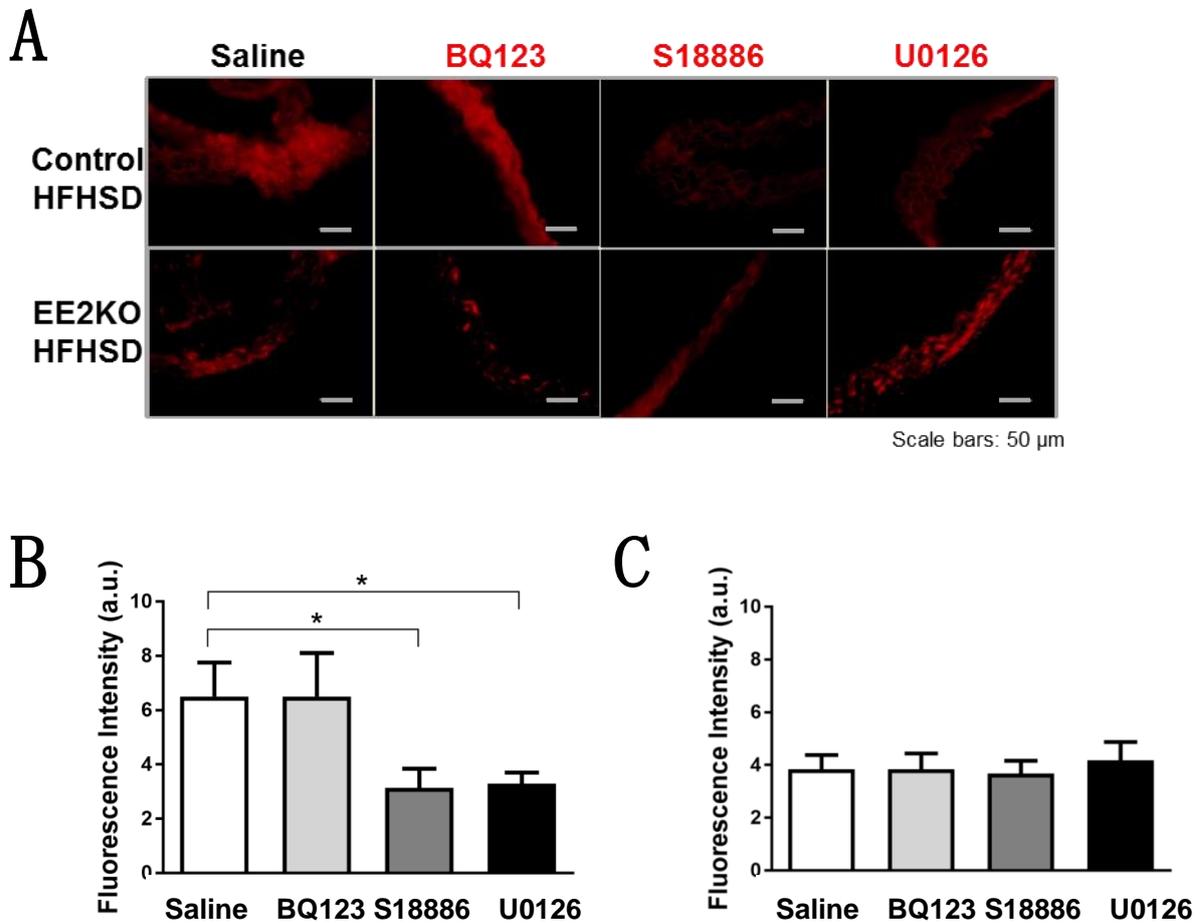


図 17. 各阻害薬使用時の血管壁におけるスーパーオキシド産生

A : DHE 染色による各阻害薬使用時の血管壁におけるスーパーオキシド産生

B : 各阻害薬を使用した Control-HFHSD 群における DHE 染色の蛍光強度

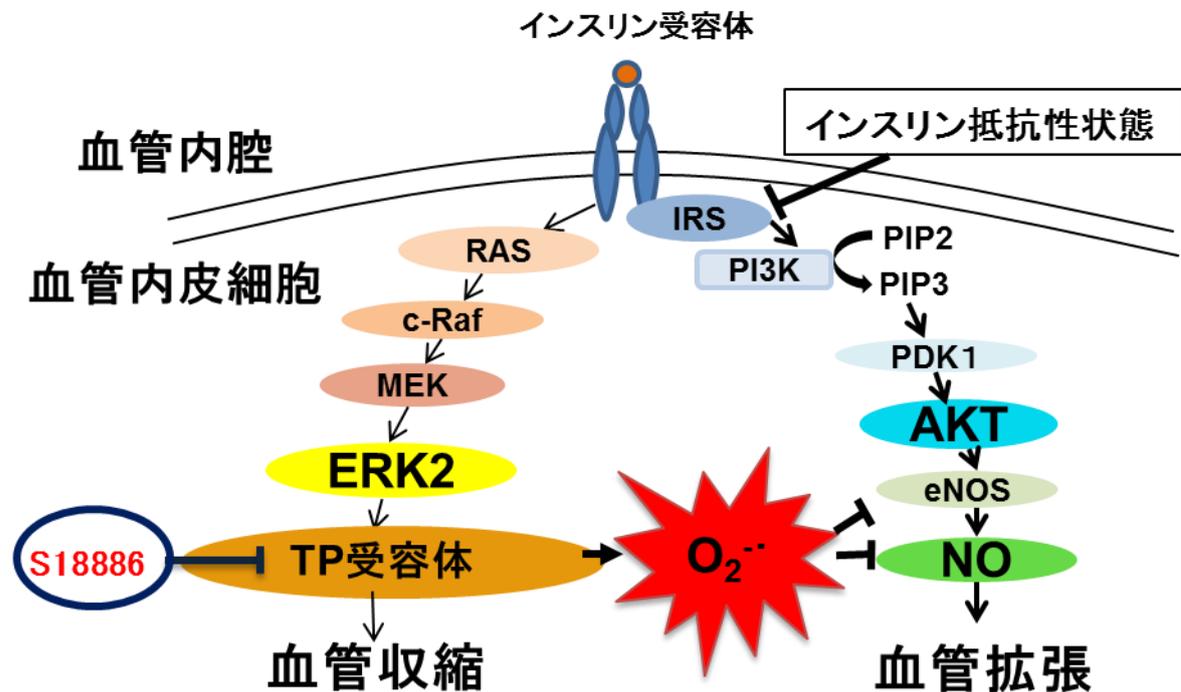
(n=7-8)

C : 各阻害薬を使用した EE2KO-HFHSD 群における DHE 染色の蛍光強度 (n=6)

BQ123 を前投与した血管壁ではスーパーオキシド産生に差を認めなかった

が、S18886 及び U0126 を前投与した血管壁ではスーパーオキシド産生の低下

を認めた。データは平均値±標準誤差で示した。\* $P < 0.05$  vs Saline 群。



AKT : プロテインキナーゼ B、eNOS : 血管内皮型一酸化窒素合成酵素  
 ERK2 : 細胞外シグナル調節キナーゼ 2、IRS : インスリン受容体基質  
 MEK : MAPK/ERK キナーゼ、NO : 一酸化窒素、 $O_2^{\cdot -}$  : スーパーオキシド  
 PDK1 : ホスフォイノシチド依存性キナーゼ 1  
 PIP2 : ホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸  
 PIP3 : ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸  
 PI3K : ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ、RAS : RAS タンパク質

図 18. 血管内皮機能障害におけるインスリンシグナル伝達経路の機序

血管内皮機能障害において、ERK2 の上流には MEK が、下流には TP 受容体が関与していることが明らかになった。TP 受容体が活性化することにより、スーパーオキシド産生が増加し、peroxynitrite が産生され、NO の生理活性及び産生量が低下することで、内皮依存性血管拡張反応が低下することが示唆された。

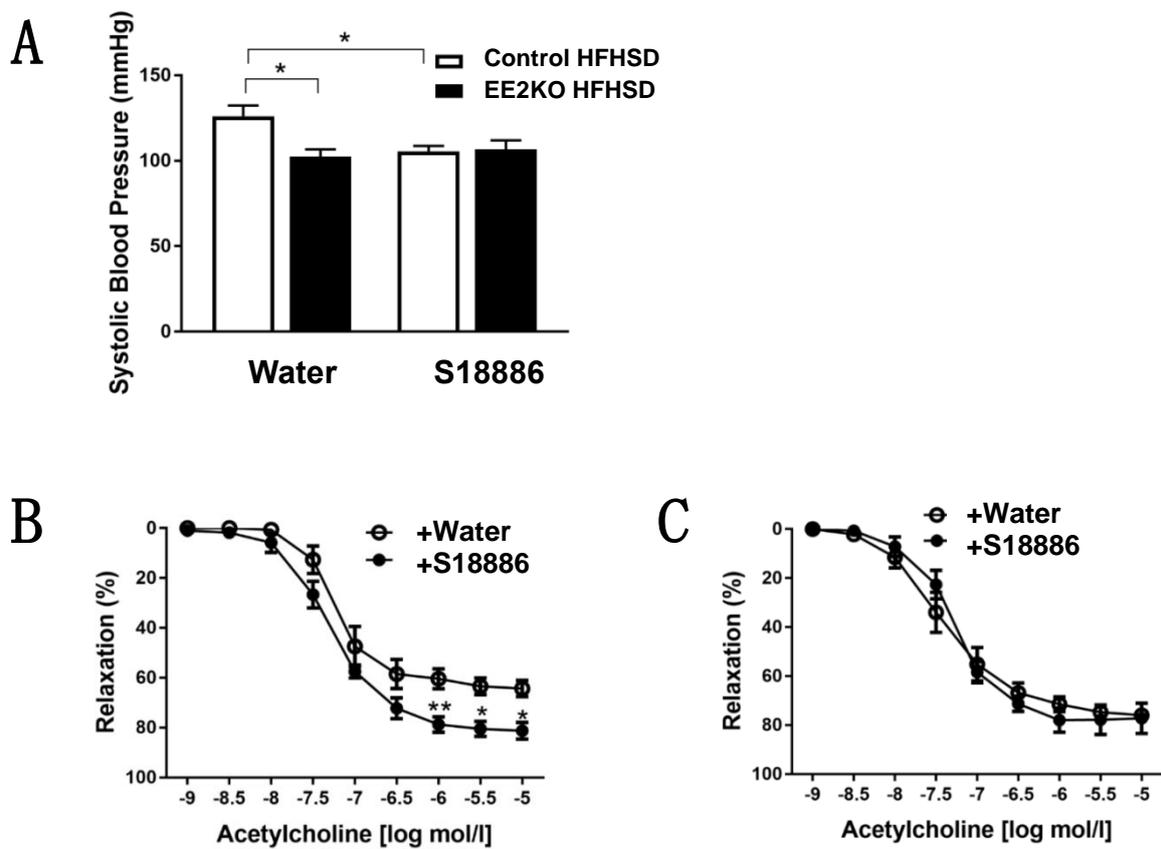


図 19. S18886 の経口投与による体重、収縮期血圧及び血管拡張能への影響

A : 収縮期血圧 (n=6-8)

B : Control-HFHSD 群の内皮依存性血管反応 (n=6)

C : EE2KO-HFHSD 群の内皮依存性血管反応 (n=6)

S18886 を経口摂取した Control-HFHSD 群の収縮期血圧は EE2KO-HFHSD 群と同等までに低下した。内皮依存性血管拡張反応は S18886 を経口摂取した Control-HFHSD 群では有意に良好であった。EE2KO-HFHSD 群では差を認めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。\*P<0.05、\*\*\*P<0.001 vs Control-HFHSD+Water 群。

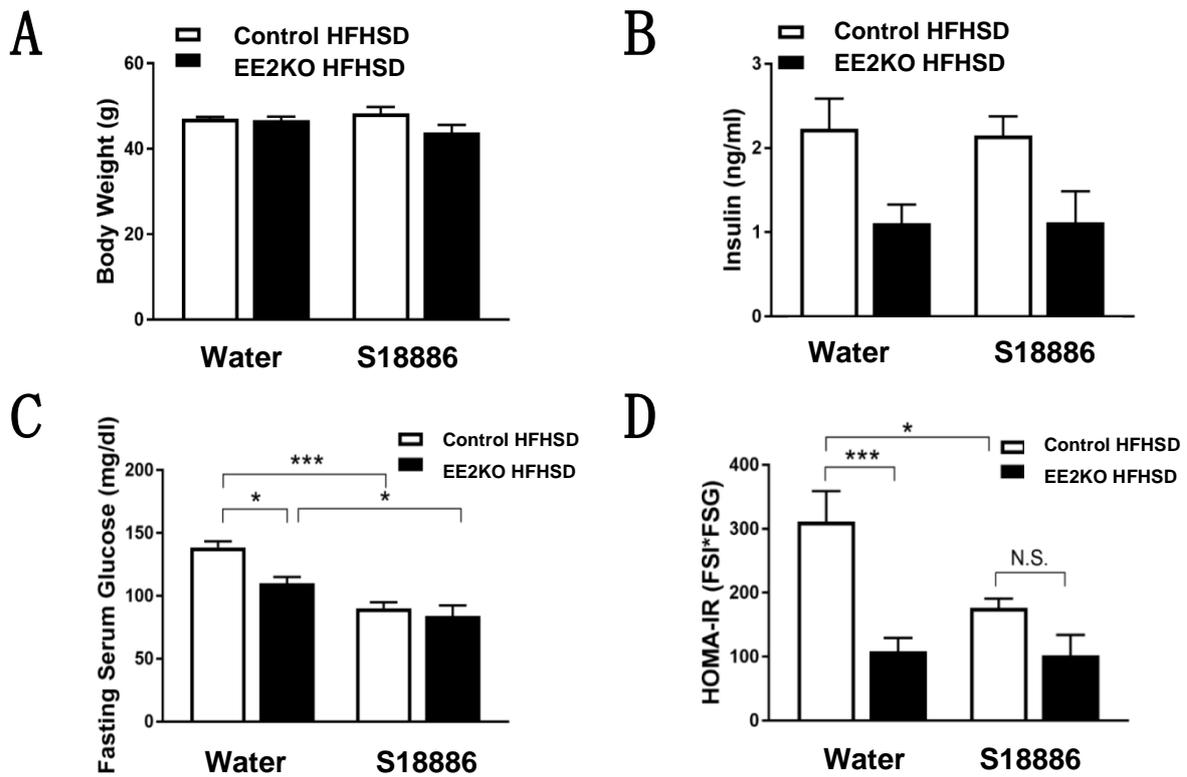


図 20. S18666 の経口投与による糖代謝への影響

A : 体重 (n=6-8)

B : 空腹時血清インスリン濃度 (n=6-8)

C : 空腹時血清グルコース濃度 (n=6-8) D : HOMA-IR (n=6-8)

体重及び血清インスリン濃度は S18886 投与の有無で差を認めなかった。

S18886 を投与した Control-HFHSD 群では空腹時グルコース濃度及び HOMA-IR は低値であった。一方、S18886 を投与した EE2KO-HFHSD 群では空腹時グルコース濃度のみの低値であった。データは平均値±標準誤差で示した。\*P<0.05、\*\*\*P<0.001 vs Control-HFHSD + Water 群。

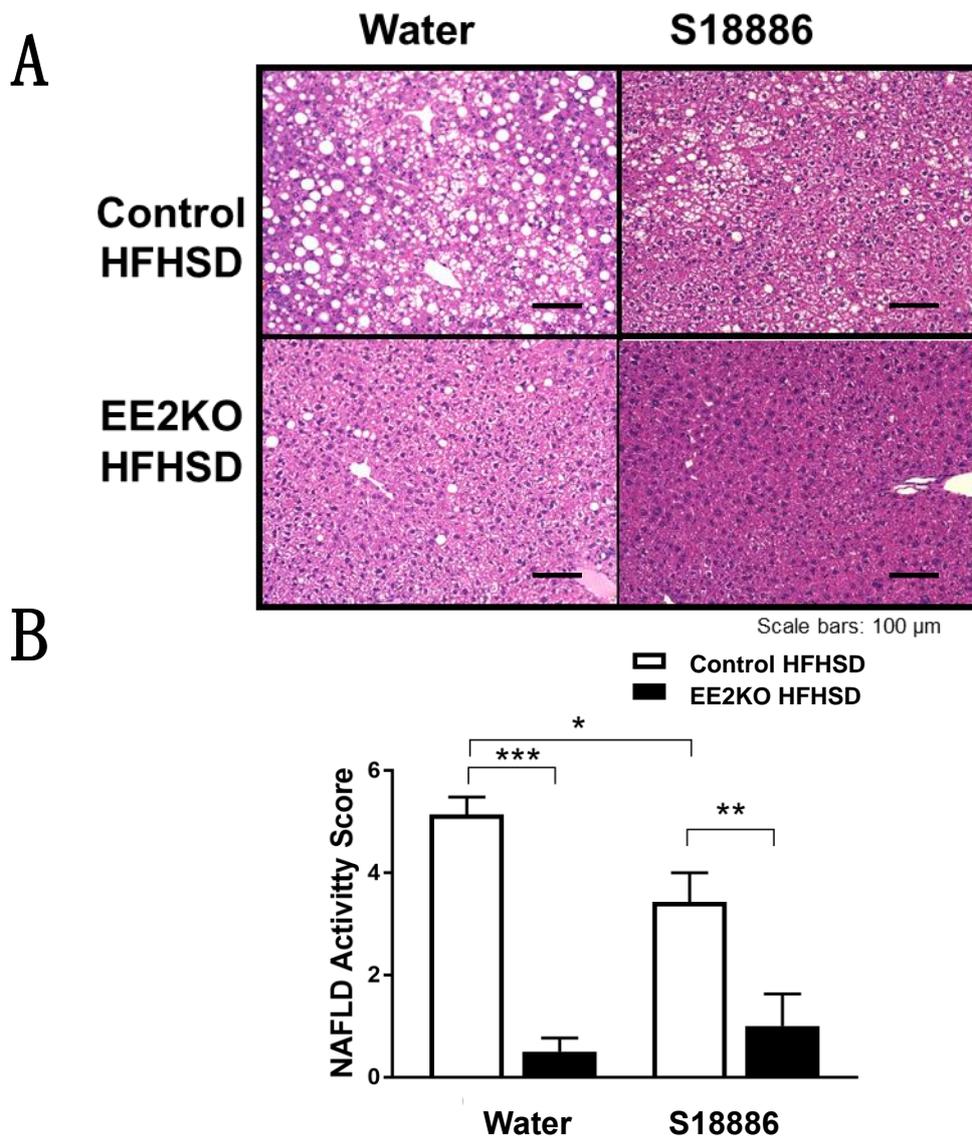


図 21. S18886 の経口投与による NAFLD への影響

A : 肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色

B : NAFLD Activity Score (NAS) (n=5-7)

ヘマトキシリン・エオジン染色において S18886 を経口摂取した Control-HFHSD 群の肝臓で脂肪滴が小さく、NAS も低値であった。データは平均値±標準誤差で示した。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  vs Control-HFHSD 群。

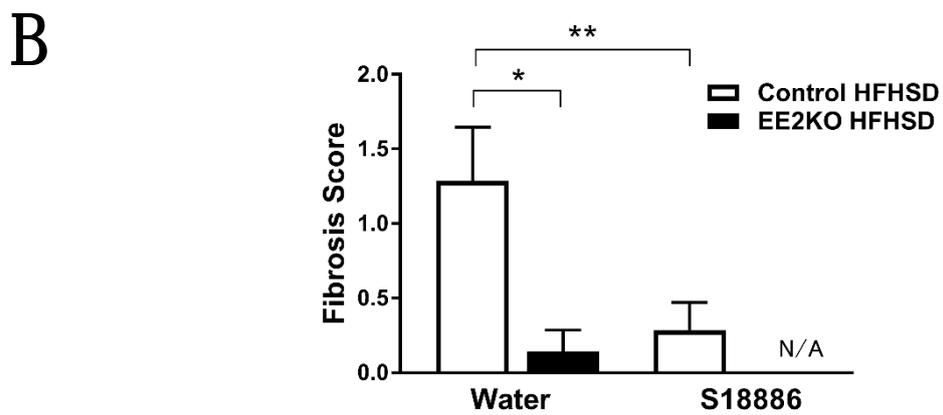
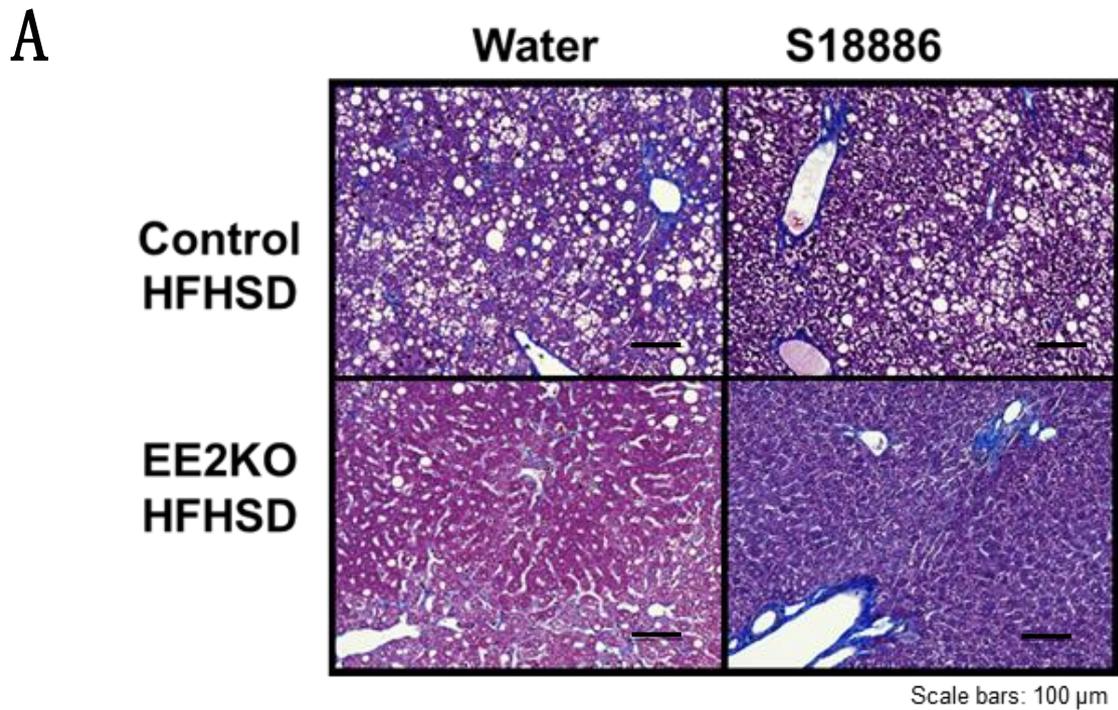
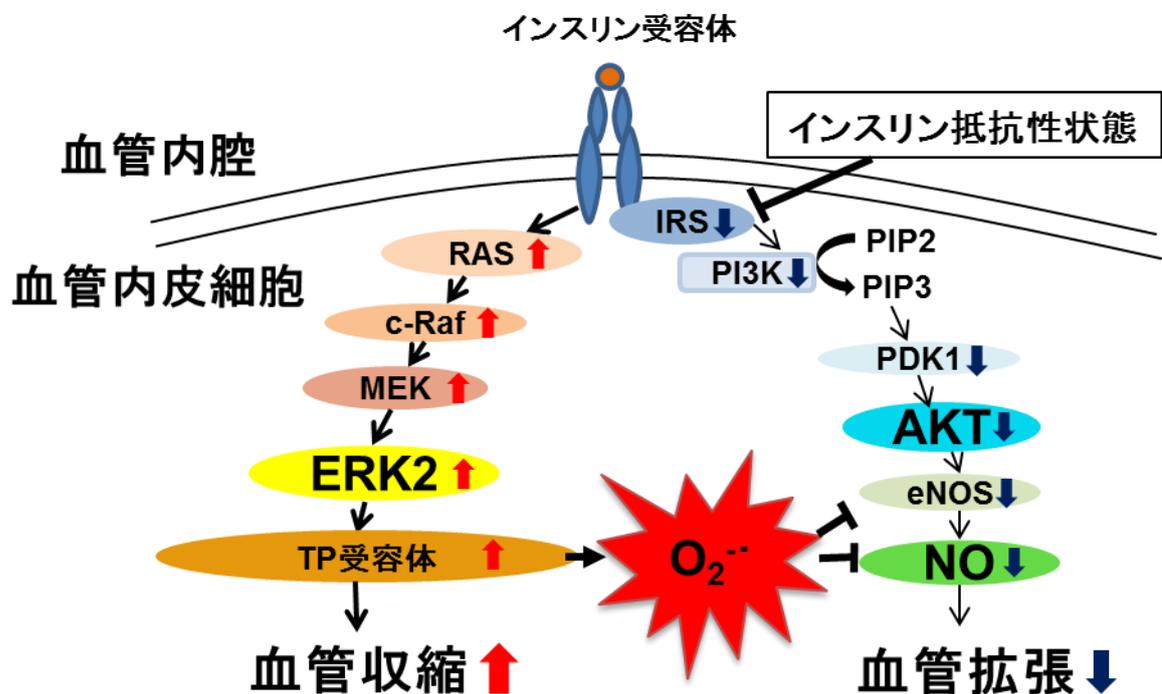


図 22. S18886 の経口投与による肝臓の線維化への影響

A : 肝臓のマッソン・トリクローム染色

B : 肝臓の Fibrosis Score (n=5-7)

マッソン・トリクローム染色において S18886 を経口摂取した Control-HFHSD 群で肝臓の線維化は軽微であった。データは平均値±標準誤差で示した。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  vs Control-HFHSD+Water 群。



AKT : プロテインキナーゼ B、eNOS : 血管内皮型一酸化窒素合成酵素  
 ERK2 : 細胞外シグナル調節キナーゼ 2、IRS : インスリン受容体基質  
 MEK : MAPK/ERK キナーゼ、NO : 一酸化窒素、 $O_2^{\cdot -}$  : スーパーオキシド  
 PDK1 : ホスフォイノシチド依存性キナーゼ 1  
 PIP2 : ホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸  
 PIP3 : ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸  
 PI3K : ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ、RAS : RAS タンパク質  
 TP : トロンボキサンプロスタノイド

(説明は次頁)

図 23. 本研究で明らかとなった肥満及びメタボリックシンドロームにおける血管内皮におけるインスリンシグナル伝達経路

肥満及びメタボリックシンドロームにおいては、MEK/ERK2/TP 経路が亢進することで、スーパーオキシド産生が亢進した。スーパーオキシドは NO と反応することにより peroxynitrite となり、NO の生理活性を低下させた。また、peroxynitrite は eNOS を障害し、NO 合成を阻害することで、NO の生理活性は低下し、内皮依存性血管拡張を抑制した。その結果、血管内皮障害、収縮期血圧を増悪させ、それに伴い部分的に空腹時グルコース濃度や HOMA-IR も悪化させ、NAFLD の進展も促進させることが明らかとなった。

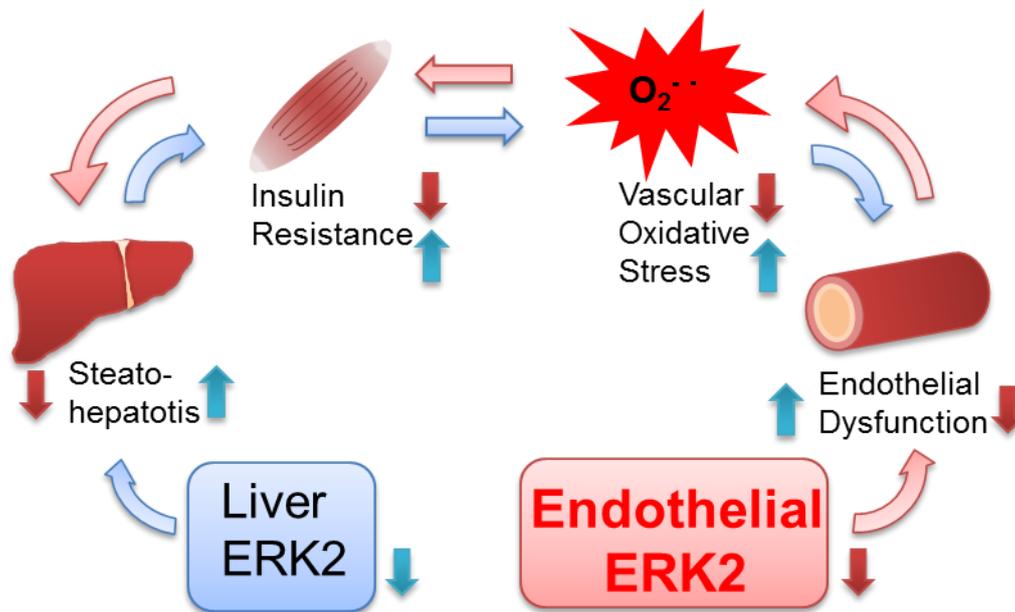


図 24. 臓器特異的 ERK2 ノックアウトと NAFLD、インスリン抵抗性、酸化ストレス及び血管内皮機能の関係 (22)

肝臓特異的に ERK2 を欠損させることで NAFLD が促進され、インスリン抵抗性を悪化させ、血管の酸化ストレスを促進し、血管内皮機能が悪化することが明らかとなっている。一方、本研究では血管内皮特異的に ERK2 を欠損させることで逆に酸化ストレスを抑制し、血管内皮機能を改善させ、インスリン抵抗性及び NAFLD を改善させた。肥満及びメタボリックシンドロームにおいて、ERK2 を組織特異的に活性化させることで NO とスーパーオキシドのバランス、インスリン抵抗性及び NAFLD を調整することができることを明らかにした。