

2022 年度

岡山大学大学院保健学研究科

博士学位申請論文

内容要旨

検査技術科学分野

渡辺 彰吾 准教授 指導

7 3 D 2 1 0 0 6

佐藤 生弥

2022 年 12 月提出

内 容 目 次

主 論 文

Suppression of nitric oxide synthase aggravates non-alcoholic steatohepatitis and atherosclerosis in SHRSP5/Dmcr rat via acceleration of abnormal lipid metabolism
(一酸化窒素合成酵素の抑制はSHRSP5/Dmcrラットにおける脂質代謝異常の促進を介して非アルコール性脂肪肝炎およびアテローム性動脈硬化症を悪化させる)

佐藤生弥、山元修成、柿本麻衣、藤井萌、本間宏基、熊崎章太、松井麻実、中山日菜子、桐原空、Shang Ran、臼井真一、篠畑綾子、北森一哉、廣畑聡、渡辺彰吾

Pharmacological Reports 74(4) 669-683 2022

主 論 文

Suppression of nitric oxide synthase aggravates non-alcoholic steatohepatitis and atherosclerosis in SHRSP5/Dmcr rat via acceleration of abnormal lipid metabolism
(一酸化窒素合成酵素の抑制は SHRSP5/Dmcr ラットにおける脂質代謝異常の促進を介して非アルコール性脂肪肝炎およびアテローム性動脈硬化症を悪化させる)

[緒言]

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、脂肪沈着や肝線維化を特徴とし、心血管疾患 (CVD) の発生率と死亡率を上昇させることが知られている。生体内でシグナル伝達分子として働く一酸化窒素 (NO) は、L-アルギニンから NO 合成酵素 (NOS) の作用で産生される経路と、食事に含まれる硝酸塩と亜硝酸塩から生成される経路があり、その生物学的利用能は動脈硬化や炎症性疾患を含む様々な疾患と関連している。近年、体内の NO 産生を阻害すると、動物モデルにおいて肝臓への脂質沈着や血中コレステロール値の増加を認めるといった、NO と脂質・コレステロール代謝の関係性を示唆する報告がいくつかなされている¹。脂質やコレステロールの代謝異常は、NASH および CVD に共通する主要なリスク因子であるにもかかわらず、NO が脂質・コレステロール代謝に与える影響について詳細に明らかとなっていない。アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は、脂質や糖代謝などの制御に関与する主要なタンパク質を制御し、エネルギーバランスを調節する働きがある。加えて NO が AMPK 活性化に関与することが報告されている²。以上より本研究では NASH とアテローム性動脈硬化症を併発する SHRSP5/Dmcr ラットに NOS 阻害剤 (L-NAME) を投与し、NO と脂質・コレステロール代謝の関係および NASH や CVD に与える影響を検討した。

[方法]

SHRSP5/Dmcr ラットは、高脂肪・高コレステロール (HFC) 食を与えることで NASH や高脂血症を発症する。さらに、L-NAME を投与すると、動脈脂質沈着や冠動脈閉塞を起こすことが知られている。SHRSP5/Dmcr ラット (10 週齢) に 8 週間 HFC 食を与え、NASH を誘発させた。HFC 群および HFC+L-NAME 群にわけ、後者には解剖前 2 週間にわたり L-NAME (25 mg/kg/day) を投与した。18 週齢で解剖を行い、採取した血液や肝臓、小腸を使用して生化学解析、病理組織染色、リアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングを行った。有意差検定は Mann-Whitney U test を用いて行い、 $p<0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

[結果]

L-NAME 投与により収縮期血圧は有意に上昇した。生化学解析では、HFC + L-NAME 群で血中 VLDL、LDL コレステロールが顕著に増加し、酸化ストレスマーカーである血清マロンジアルデヒド (MDA) 濃度も上昇した。また、L-NAME 投与により血中および肝臓中の総胆汁酸 (BA) 濃度が有意に上昇し、肝組織中のトリグリセリド (TG) および総コレステロール (TC) の増加を認めた。病理組織染色では、HFC + L-NAME 群で肝臓における脂肪滴および線維化領域や、動脈の脂質沈着が顕著に増加した (図 1)。ウエスタンブロッティングおよびリアルタイム PCR 解析より、L-NAME は肝臓における AMPK 活性を低下させ、AMPK が制御する肝臓 X 受容体 (LXR α) の遺伝子発現量を増加させた。それに伴い、BA や TG 合成に関与するコレステロール 7 α -ヒドロキシラーゼ (CYP7A1) およびステロール調節エレメント結合タンパク質 1c (SREBP-1c) の遺伝子発現量も有意に上昇した。VLDL 合成に関与するミクロソームトリグリセライド転送蛋白 (MTP) とアポリポタンパク質 B (apoB) や、炎症マーカーであるインターロイキン-1 β (IL-1 β) の遺伝子発現量は、HFC+L-NAME 群で増加した。小腸では、食事性コレステロールの吸収に働くニーマンピック C1 様 1 (NPC1L1) の遺伝子発現量が L-NAME により有意に増加した。

[考察]

AMPK は NO によって活性化することがわかっている。L-NAME による NO 合成阻害が肝臓の AMPK 活性を低下させた結果は、先行研究を強く支持している。AMPK は、LXR α や転写因子であるステロール調節エレメント結合タンパク質 2 (SREBP-2) を直接制御しており、本研究においても、AMPK 活性低下に伴う LXR α およびその下流遺伝子である CYP7A1 や SREBP-1c の発現量が増加した。生化学解析や病理組織染色による解析では、肝臓含有 TG 量および脂肪滴の増加が観察され、NO 合成阻害が TG 合成を促進することが明らかとなった。体内のコレステロールは、SREBP-2 を介して肝臓で産生されるものと、腸から吸収される食事由来のものがある。後者には小腸で発現する NPC1L1 が深く関与しており、本研究では NOS 阻害により小腸の NPC1L1 遺伝子発現量が増加した。L-NAME 投与により肝臓の TC 含有量も顕著に増加したことから、腸からのコレステロール吸収が促進した可能性がある。胆汁酸は CYP7A1 によってコレステロールから合成されるため、コレステロールの主要な排泄手段である。本研究では NO 合成阻害により CYP7A1 の遺伝子発現量が有意に増加し、血中および肝臓中の総 BA 濃度が顕著に増加した。TG の蓄積は脂肪性肝疾患の特徴であり、肝コレステロールの増加は肝細胞のアポトーシスや炎症を促進する。総 BA 濃度の上昇は胆汁うっ滞を示唆しており、特に一次胆汁酸から形成される二次胆汁酸は細胞障害性を有する。本研究では、肝臓での IL-1 β の遺伝子発現量や肝線維化領域が顕著に増加したことから、NO 合成阻害により NASH 病態が悪化することが明らかとなった。一方、肝

臓中の TG やコレステロールは、MTP の働きにより apoB と共に VLDL 粒子を形成する。VLDL 粒子は血中に排出された後、LDL に代謝される。L-NAME 投与による NO 合成阻害は、肝臓での MTP と apoB の遺伝子発現量を増加させた。血中の VLDL コレステロールも顕著に上昇しており、NO 合成阻害が VLDL 合成を促進することが示唆された。以前の報告では、肝臓中の TG 量の増加に伴い MTP の発現が亢進することが示されているため、本研究では NO 合成阻害による肝臓含有 TG および TC の増加が、MTP の遺伝子発現量を上昇させたと考えられる。一方、血中の LDL コレステロールを肝臓に取り込む際に働く LDL 受容体 (LDLR) の遺伝子発現量は NO 合成阻害による変化を認めず、この結果は本研究における LDL コレステロールの増加に寄与している可能性がある。

NO 合成阻害は動脈への脂質沈着を顕著に増加させた。血管内皮で産生される NO は、いくつかの重要な心血管機能の恒常的な制御因子である。血管内皮機能の低下は、動脈硬化のリスク因子である高血圧や酸化ストレスに関連する。L-NAME による NO 合成阻害は血管内皮機能を傷害し、SHRSP5/Dmcr の収縮期血圧および血清 MDA を有意に上昇させた。加えて、肝臓における NO/AMPK 経路の抑制は、血中総 BA およびコレステロールを顕著に増加させた。前述のように二次胆汁酸は細胞傷害性を持ち、炎症や酸化ストレスを亢進する。LDL コレステロールは損傷した血管内皮下で酸化ストレスに曝露されて酸化 LDL コレステロールとなり、プラークを形成する。同時に、NO 合成阻害も組織の酸化ストレスと内皮機能不全を引き起こし、酸化 LDL コレステロールの蓄積を誘導する。以上より、本研究では NO 合成阻害が直接誘引する高血圧、内皮機能障害、酸化ストレス上昇に加え、AMPK 活性抑制による高コレステロール血症や血中 BA 濃度の上昇が間接的に関与し、アテローム性動脈硬化症が悪化したと考えられる。近年、AMPK アゴニストや NO 補充療法が、脂肪肝の改善や血中コレステロールの低減に寄与することが報告されている。本研究の結果は、NO の補充療法が NASH と CVD に対する新しい治療アプローチとなる可能性を示唆している。

[結論]

L-NAME による NO/AMPK 経路の抑制は、HFC を与えた SHRSP5/Dmcr ラットにおいて、脂質代謝異常と胆汁うっ滞を誘発して NASH を悪化させた。また、それに伴う血中 TC および総 BA の上昇は、内皮機能障害および酸化ストレスを介して動脈硬化を悪化させることが明らかとなった。

1. Yatera Y, et al., Severe dyslipidaemia, atherosclerosis, and sudden cardiac death in mice lacking all NO synthases fed a high-fat diet. *Cardiovasc Res*. 2010;87(4):675–82
2. Cordero-Herrera I, et al., AMP-activated protein kinase activation and NADPH oxidase inhibition by inorganic nitrate and nitrite prevent liver steatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(1):217–226

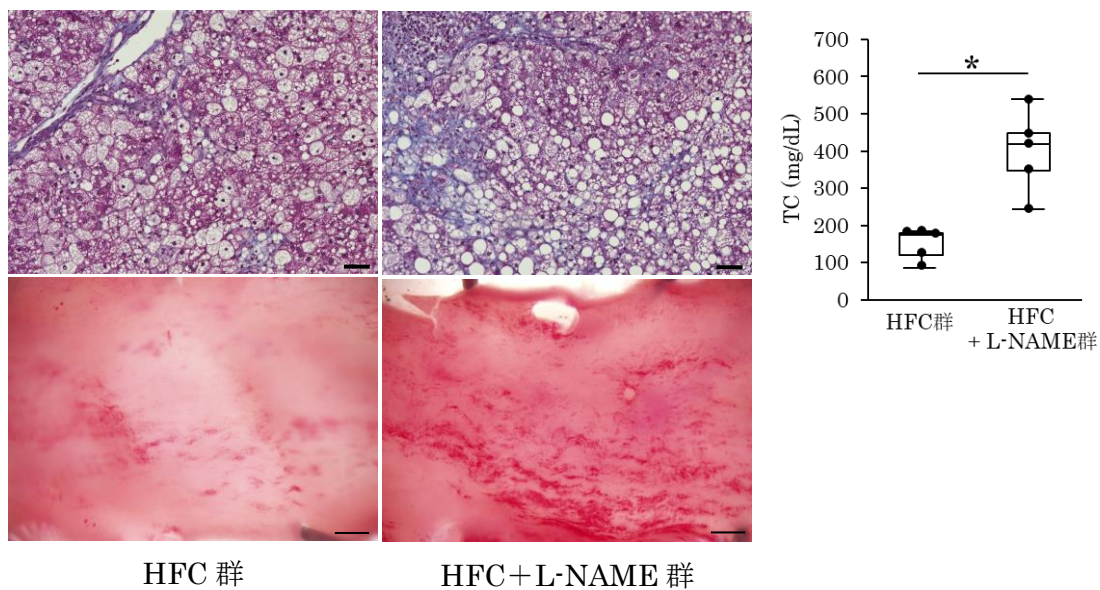


図 1. 肝臓と腹部大動脈の病理染色および血中の総コレステロール濃度
 上段：マッソントリクローム染色（スケールバー＝50 μm ）
 下段：オイルレッド O 染色（スケールバー＝500 μm ）

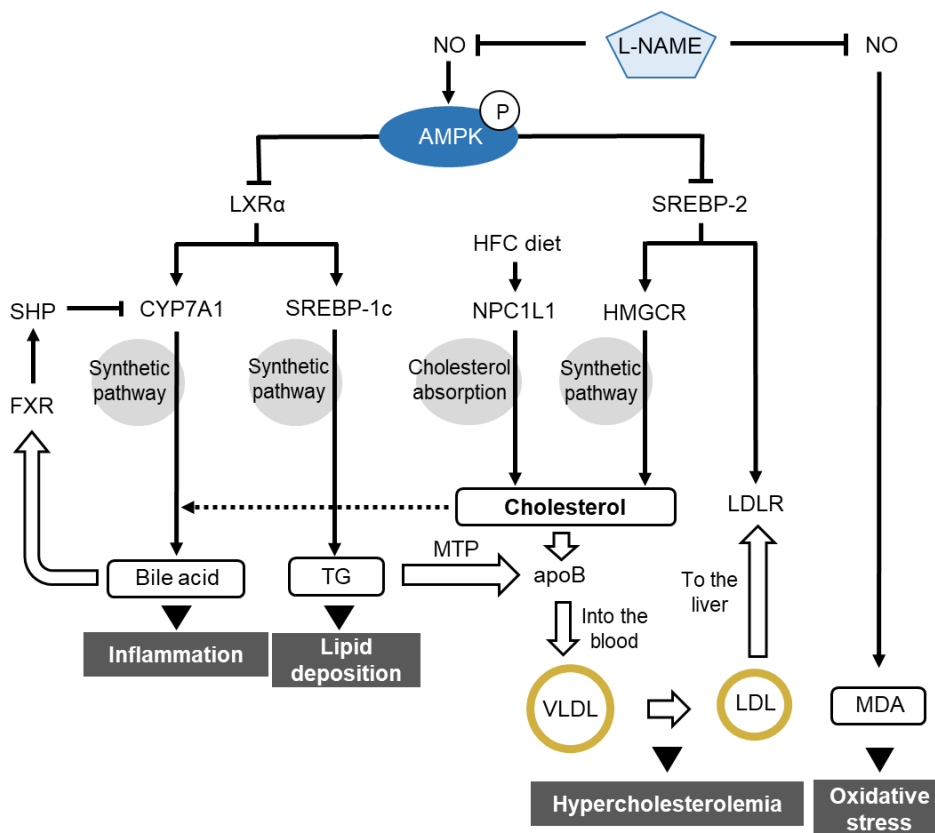


図 2. NO 合成阻害による NASH およびアテローム性動脈硬化症への影響