

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19506

研究課題名(和文) 高中性脂肪血症の新たな分子機構解明と治療標的の探索

研究課題名(英文) Elucidation of novel molecular mechanisms and therapeutic targets of hypertriglyceridemia

研究代表者

高梨 幹生 (Takanashi, Mikio)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70610799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高中性脂肪(TG)血症の成因には完全に解明されていない点が多い。研究代表者らはインスリン欠乏性高TG血症に着目し、ホルモン感受性リパーゼ欠損マウスではTG上昇が軽微に留まることを見出し、その分子機構の解明を目指した。また、その他の各種脂質関連遺伝子欠損マウス、MCTオイル、triton WR-1339を用いた実験系からも、高TG血症の成因解析を進めた。その結果、リポ蛋白リパーゼ(LPL)による脂質異化とは異なる、新規メカニズムによる高TG血症の存在が示唆され、現在解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of hypertriglyceridemia is not fully understood, so we do not have adequate therapeutic agents. In insulin deficient status, the plasma level of triglycerides is lower in hormone-sensitive lipase (HSL) deficient mice than in wild-type mice. The current study was aimed at elucidating the novel molecular mechanisms and therapeutic targets of hypertriglyceridemia. HSL-deficient mice and some other lipolytic gene deficient mice were used in this study. Under various statuses (insulin-deficient, treated with triton WR-1339, challenged with olive oil or medium chain triglycerides), we examined the plasma level of triglycerides and gene expressions. Novel molecular mechanism independent of lipoprotein lipase (LPL) was suggested, and which are currently under investigation.

研究分野：脂質異常症

キーワード：脂質 糖尿病 インスリン ホルモン感受性リパーゼ リポ蛋白リパーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 1型糖尿病など、インスリン分泌やその作用が減弱した病態では、高中性脂肪(TG)血症が観察される。

インスリン作用が減弱した病態では糖質に代わるエネルギー源として脂質を利用するために、貯蔵脂肪の分解が行われる。インスリンは cAMP-PKA 経路の抑制を介して脂肪細胞の脂肪分解を抑制することは古くから知られており、この脂肪分解は、ホルモン感受性リパーゼ(HSL)を含む複数の中性脂肪水分解酵素により担われていることが、研究代表者らの所属するグループによる研究により明らかとされている (Osuga et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2000; Okazaki et al. Diabetes 2002)。

一方、脂肪組織でのリポ蛋白リパーゼ(LPL)の発現や活性はインスリンによって正に制御される (Tavangar K et al., J.Clin. Invest., 1992)。このことから、インスリン作用減弱時の高 TG 血症は、脂肪細胞での脂肪分解亢進に加えて、LPL の作用低下が原因であるというのが定説となっている。しかしその具体的な分子機構は完全には解明されていない。

(2) これまでに研究代表者らは、HSL 欠損マウスではインスリン欠乏時の高 TG 血症が軽微に留まるという驚くべき結果を得ている。

食餌性の脂質摂取を強調したモデルとしてストレプトゾトシン(STZ)投与下のマウスにオリーブオイルを経口投与したところ、野生型マウスでは著しい高 TG 血症を生じたが、HSL 欠損マウスでは TG 上昇は軽微であった。すなわち、インスリン欠乏時の高 TG 血症の成因に HSL が関与していることを示している。

さらに、この genotype 間の差異は LPL 阻害薬である triton WR-1339 を前投与した条件下においても残存していた。すなわち、インスリン欠乏時の高 TG 血症の成因には LPL とは独立した機序が存在することを示唆している。

一方でインスリン欠乏時における LPL や LPL 関連遺伝子の発現、および post heparin plasma の LPL 活性は genotype 間の差異を認めないことも確認している。以上のことから、インスリン欠乏時の高 TG 血症が LPL を介した機序とは異なる機序によって生じている可能性が示唆されると同時に、そこに HSL が何らかの重要な役割を果たしていることが示唆されている。このことはインスリン欠乏時の高 TG 血症の新たな分子機構解明の糸口となる重要な先進的予備的知見であると考えられた。

(3) さらにオリーブオイルの経口投与実験において、少量の MCT (medium chain triglycerides) オイルを作用させることで、投与後の高 TG 血症が rescue されることを見

出した。この知見からは、カイロミクロン (CM) 合成や LPL による脂質異化における MCT オイルの機能的な役割が明らかにされることが期待され、これらの分子機構の解明は、インスリン欠乏時高 TG 血症のみならず、より普遍的な生理現象 (脂質吸収や CM 合成、脂質異化、一般的な高 TG 血症など) の基礎的理解を大きく推し進めることが期待された。

2. 研究の目的

インスリン欠乏時の高 TG 血症の成因として、

- 末梢での TGRL 異化の低下
- 小腸での脂質吸収・CM 合成の亢進
- 肝臓での VLDL 合成の亢進

のいずれかが想定される。ヒトの場合、糖尿病に合併する脂質異常症は および を成因とした高 VLDL が主体であることが多いが、これまでの予備的検討からは、少なくともマウスの STZ 投与モデルにおいては、小腸での脂質吸収・CM 合成の亢進が成因として有力であると考えられた。

小腸での脂質吸収・CM 合成を評価するため、STZ を投与した野生型マウスに通常食と脂質を全く含有しない high sucrose (HS) 食を与え、血漿 TG の経過を観察したところ、通常食群では摂食開始後から徐々に血漿 TG 値が増加したが、HS 食群ではその増加を認めなかった (図 1)。インスリン欠乏時の高 TG 血症には食餌性の要素が寄与している可能性を強く示唆するものであった。さらに、前述のオリーブオイル投与により著しい高 TG 血症を来すことから、インスリン欠乏時には小腸での脂質吸収・CM 合成に大きな影響が出ることが示されていた。

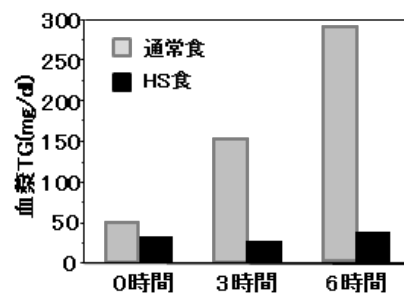


図1 食餌によるTG上昇の差異

このことから、特に小腸での脂質吸収・CM 合成に焦点を当て、この工程における HSL の未知なる機能を解明することで、インスリン欠乏時の高 TG 血症の具体的な分子機構を解明することを目指した。

一方、MCT オイルは小腸から吸収後は TG に再合成されず、従って CM を形成せず、脂肪酸のまま門脈経路で吸収されるとされている。MCT オイルによる高 TG 血症の rescue と、

HSL 欠損による高 TG 血症の rescue という 2 つの現象の共通点を探ることで、インスリン欠乏という特殊な条件下だけではなく、一般的な高 TG 血症に対する新たな知見の発見も期待された。

3. 研究の方法

(1)研究代表者の所属先で作成され(Osuga et al., PNAS, 2000)、継代飼育中の HSL 欠損マウスとその同胞野生型マウスを用いる。また、やはり所属先で継代飼育している、その他の各種脂質関連遺伝子欠損マウスを用いる。

(2)インスリン欠乏性糖尿病モデルマウスについては、10~13 週齢の雄マウスに STZ を投与して作成する。STZ 投与 day4 の時点での随時血糖が 350mg/dl 以上のマウスを糖尿病マウスとして実験に用いる。

(3)野生型マウス、HSL 欠損マウス、各種脂質関連遺伝子欠損マウス、およびそれぞれのインスリン欠乏性糖尿病モデルマウス、triton WR-1339 投与下など、様々な条件下で、オリーブオイルや MCT オイルの投与を行い、血漿中の中性脂肪を測定する。

(4)糖尿病下・非糖尿病下、摂食下・絶食下など様々な条件下において白色脂肪組織、肝臓、筋肉などの各種臓器を採取し、LPL の発現や、Angptl3、Angptl4、Gpihbp1、Lmf1 など LPL 関連遺伝子の発現を RT-PCR 法により測定する。

4. 研究成果

(1)LPL および LPL 関連タンパクの発現

これまでの検討では、LPL も LPL 関連遺伝子もインスリン欠乏下での発現は野生型マウスと HSL 欠損マウスで同程度であり、高 TG 血症の成因と考えるのは困難であった。このため、インスリン欠乏時の高 TG 血症の成因は、「末梢での TGRL 異化の低下」ではなく、「小腸での脂質吸収・CM 合成の亢進」あるいは、「LPL 以外の経路による CM 異化の遅延」が有力であると考えられていた。

しかし一連の研究を通して、LPL 機能に関連する遺伝子(遺伝子 X)の白色脂肪組織での発現が、HSL 欠損マウスではほぼ皆無であり、かつ野生型マウスではインスリン欠乏時に増加することを見出した。そこで他の臓器での発現程度を RT-PCR 法により調べたところ、肝臓では genotype や糖尿病化の有無による発現変化を認めなかったが、筋ではやはり HSL 欠損マウスでの発現が弱く、かつ野生型マウスではインスリン欠乏時に増加していた。

この遺伝子 X の白色脂肪組織および筋での動態と高 TG 血症の程度との関連の有無につ

いてはさらなる検証が必要であり、現在肝臓や筋などを含めた様々な組織における LPL 機能の解析を進めている。

(2)他の脂質関連遺伝子欠損マウスでの検討

インスリン欠乏下で生じる高 TG 血症への理解を助けるため、HSL 以外の各種の脂質関連遺伝子が欠損したマウスで、同様の検討を行った。この中で、LPL 機能に影響を与えることが知られているある種の遺伝子が欠損したマウスでは、糖尿病化することやオリーブオイルを投与することで野生型マウス以上の程度の高 TG 血症が観察された。

この遺伝子の欠損マウスでは通常時には VLDL が蓄積することが知られているが、オリーブオイル投与時のみならず、糖尿病化した際に生じる高 TG 血症も CM 優位であることが他の実験から示唆されており、現在そのメカニズムの解明に向け解析を進めている。

(3)MCT オイルを用いた検討

MCT オイルにより高 TG 血症が rescue できる可能性については dose response を確認する実験により、その詳細が明らかになりつつある。MCT オイルによる高 TG 血症 rescue のメカニズム解析や、HSL 欠損マウスにおける高 TG 血症 rescue との共通点の検討などから、より普遍的な高 TG 血症の新規分子機構の解明を目指した。

(4)「小腸での脂質吸収・CM 合成の亢進」の検証

以上の実験結果などから、インスリン欠乏性糖尿病モデルマウスにおける高 TG 血症には「小腸での脂質吸収・CM 合成の亢進」がより大きく関与しているものと考えている。よりクリアな条件下の実験系構築のため、リンパ管から直接回収したリンパ液での解析を検討している。現在リンパ液回収手技の習熟訓練中である。また、小腸特異的 HSL 欠損マウスなど、発生工学的な手法により、より条件をクリアにできるものと考えており、作成に向け準備をしている。

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)

[学会発表](計3件)

Mikio Takanashi, et al.,
“Amelioration of streptozotocin-induced diabetic hypertriglyceridemia in the absence of hormone-sensitive lipase”,
American Heart Association Scientific Sessions 2016, November 12-16 2016, New Orleans (USA)

高梨 幹生 他、「インスリン欠乏性高中性脂肪血症の成因におけるホルモン感受性リパーゼの重要な役割」、第47回日本動脈硬化学会総会・学術集、2015年7月9-10日、仙台国際センター（宮城・仙台）

高梨 幹生 他、「インスリン欠乏性高中性脂肪血症に与えるホルモン感受性リパーゼの重要な役割」、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月21-24日、海峡メッセ下関（山口・下関）

6．研究組織

(1)研究代表者

高梨 幹生 (TAKANASHI, Mikio)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70610799