

平成21年 4月15日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790464

研究課題名（和文） 脂肪肝治療の新たな可能性（PPAR γ をターゲットとした解析）研究課題名（英文） Development of new therapy via PPAR γ for fatty liver disease.

研究代表者

本村 亘（MOTOMURA WATARU）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70374791

研究成果の概要：

脂肪肝において PPAR γ 等、どのような遺伝子変化が起こっているかを検討した。まず、一つ目のモデルとして C57b1/マウスへの高脂肪食負荷により、マウス体重、肝重量、脂肪組織重量は負荷期間と比例して増加し、血清の検討では、高脂肪負荷マウスでは、軽度の alanine aminotransferase (ALT) の上昇と高中性脂肪血症を認めた。マウス肝臓を採取し、mRNA の変化を realtime PCR で検討した。その結果 Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) の上昇を認めた。また、PPAR γ には二つのバリエントがあり、脂肪組織以外の組織では PPAR γ 1 が主に発現していることが知られている。脂肪組織のみに発現しているはずの PPAR γ 2 の発現が肝臓の脂肪化に伴い上昇していることがわかった。また、脂肪滴形成に重要な働きをしていることが知られている PAT protein を perilipin、adipose differentiated-related protein (ADRP)、tail-interacting protein of 47 kDa (TIP47) の mRNA 発現検討を行った。その結果、ADRP のみが肝臓細胞脂肪化に従って変化し、mRNA が増加した。二つ目のモデルとして、脂肪融解を起こさせた高脂血症による脂肪肝モデルを作成した。C57b1/マウスの腹腔内に LPS を投与し経時的に組織採取を行った。その結果、投与 12 時間、24 時間でマウス肝細胞の脂肪滴形成を確認し、肝臓での遺伝子変化を realtime PCR にて検討した。LPS 投与による脂肪滴形成は主に肝臓での脂肪酸合成によるものではなく酸化低下、つまり分解低下による事、この脂肪肝形成には PPAR γ が関与していないことを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：PPAR γ 、脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

●脂肪肝の増加とその新規治療薬の開発の

必要性：最近我が国では食事の欧米化に伴い肥満、糖尿病、高脂血症といった生活習慣病が増加しつつあり、それに伴い脂肪肝患者が増加している。従来脂肪肝は良性可逆性の疾患ととらえられてきたが、その中に 10%程度に非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis:NASH) の発症が認められ、年々増加傾向にある。NASHは持続すると緩徐ではあるが、慢性に進行し肝硬変、肝癌へと進展することがある。最近、発症メカニズムが少しずつ明らかになりつつあるが、治療法は基盤となる肥満、糖尿病の治療が主体で肝臓自体をターゲットとした治療法は未だ研究途上であり治療法のスタンダードは確立されていない。

●Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)：PPAR γ は核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子であり、脂肪組織、骨格筋、肝臓で発現し、脂質、糖質代謝に関わる様々な分子の発現を制御している。近年、核内受容体に関連する転写因子研究、ならびにアディポサイトカインを中心とした脂肪細胞の機能解明が進むにつれて、PPAR γ は代謝異常に基づく生活習慣病に対する治療薬開発の分子標的として注目されている。実際、PPAR γ のリガンドは現在インスリン抵抗性改善薬として臨床の場で幅広く使用されている。最近の臨床研究でPPAR γ のリガンド投与により脂肪肝の改善を示す症例が報告され (Hepatology 2003. 38; 1008-17) 実験モデルマウスにおいてもPPAR γ のリガンド投与により脂肪肝は改善することが明

らかになりつつある (BBRC, 2004. 27;187-95, Gastroenterology, 2004. 126:873-85)。以上の成績から、肝臓のPPAR γ は脂肪肝治療の分子ターゲットになる可能性がある。

2. 研究の目的

高脂肪食付加による一般的な脂肪肝の他に、脂肪融解を起こさせた高中性脂肪血症による脂肪肝モデルを作成し、脂肪肝形成のメカニズムとその時のPPAR γ の役割について明らかにする。

3. 研究の方法

1. 動物実験

10週齢の雄性 C57Bl/6Ncrj マウス (Charles River Japan) を使用。12時間の light/dark cycle, 22°Cで飼育。マウスには normal diet (カロリー別脂肪含有率 13.2%)。LPS (Sigma-Aldrich Japan) をマウスの腹腔内に投与し時間ごとにマウスより肝臓を採取した。血液はマウスの心臓より採取し生化学的な解析を行った。また、肝臓、脂肪組織は取り出し、重量を測定した。また、凍結切片用、RNA 用には採取した組織を液体窒素にて凍結させた。すべての実験は旭川医科大学動物実験ガイドラインに従った。

2. 生化学的検討

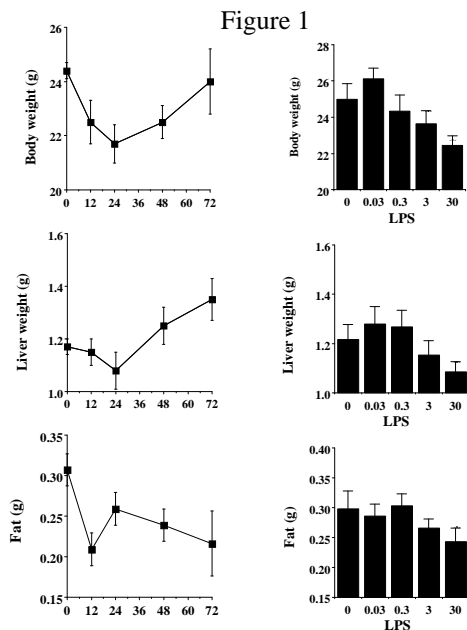
血清の alanine aminotransferase (ALT) は Automatic Analyzer 7180 (Hitachi High-Technologies, Tokyo) を使用し測定した。

3. 組織学的検討

肝組織は 4%パラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋、組織切片を作成し hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い評価した。肝臓の脂質を観察するために、肝臓より凍結切片を作成した。その切片を oil red O

染色を行い観察した。また、Adipose differentiated-related protein (ADRP)の免疫蛍光染色は我々の既報 (Motomura et al, BBRC 2006, 340, 1111-8) に従って行った。

4. RNA 精製と cDNA 合成、realtime PCR
 1ug RNA を RETROscript (Applied Biosystems) により逆転写反応にて cDNA を合成した。定量 PCR は 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いた。各プローブは Taqman probe を使用した。各プライマーは PPARalpha (Mm00440945_m1)、PPARgamma (Mm00440939_m1)、IL-1beta (Mm00434228_m1)、IL-6 (Mm00446190_m1)、TNFalpha (Mm00443258_m1)、RXR alpha (Mm00441182_m1)、RARalpha (Mm00436264_m1)、SREBF1 (Mm00550338_m1)、fatty acid synthetase (Mm00662319_m1)、steroyl-CoA desaturase (Mm00772290_m1)、acetyl-CoA carboxilase (Mm01304283_g1)、enoyl-CoA hydoratase (Mm00470091_s1)、very long acyl CoA dehydrogenase (Mm00444296_m1)、carnitine palmitoyltransferase (Mm00487202_m1)、ADRP (Mm00475794_m1) を Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)



より購入した。内部標準には 18S rRNA を選

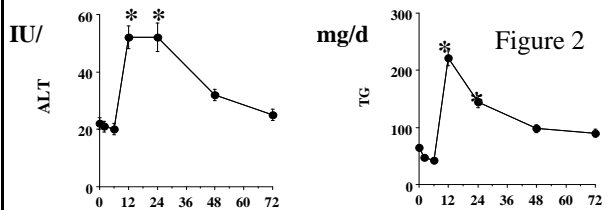
択して TaqMan® Ribosomal RNA Ccontrol Reagents VIC® Probe で増幅し補正を行った。

5. 統計処理

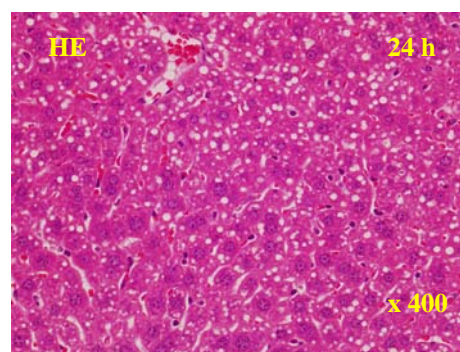
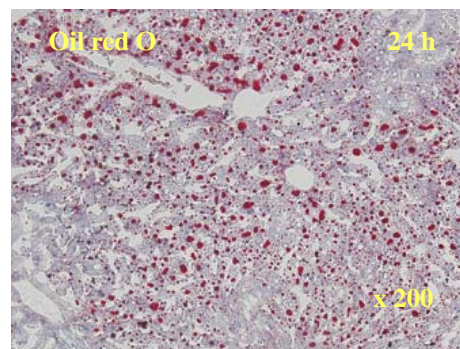
結果は平均±SE で示した。統計処理は ANOVA と subsequent Fisher's LSD test で行った。

4. 研究成果

LPS 投与によりマウスの体重、脂肪重量、肝

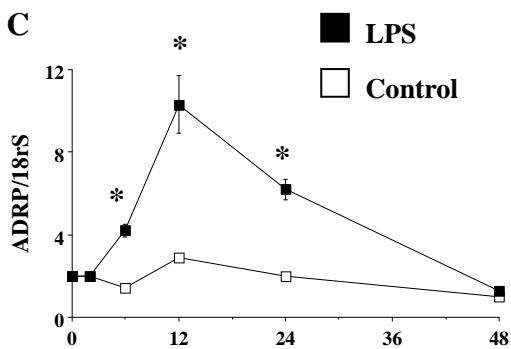
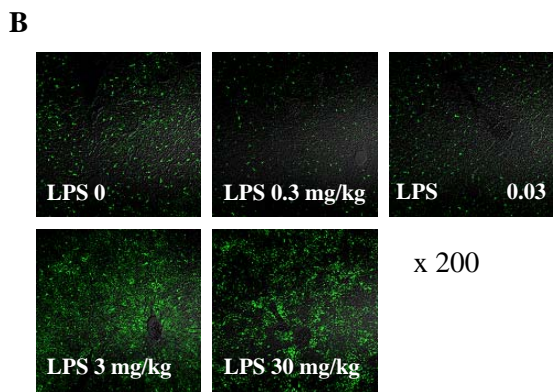
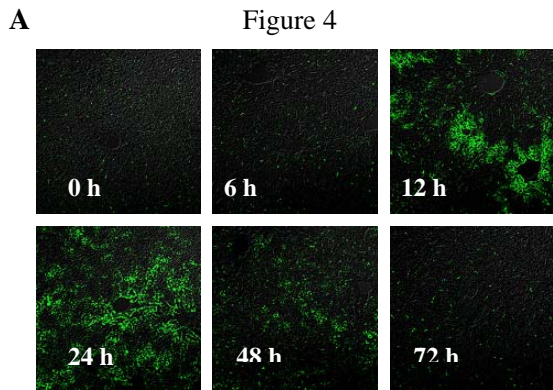


重量は Figure1 のように変化した。LPS は肝重量、脂肪重量を初めの 12 時間は減少させた。さらにその減少は LPS の濃度依存性に変動していた。



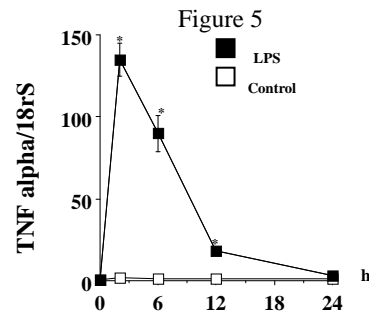
また、生化学的結果であるが Figure2 のように変化した。LPS30mg/kg で投与したときに初めの 6 時間は ALT と triglycerides は変化しなかった。しかし LPS 投与 12 時間を過ぎた所から ALT と triglycerides はともに上昇し

LPS 投与により十分高中性脂肪血症をきたしていた。組織学的には LPS 投与 24 時間後には figure 3 に示すように肝臓内に明らかに小脂肪滴を形成した。この脂肪滴は主に中心静脈領域よりはむしろ門脈領域に多く認められた。また、炎症細胞の浸潤はほとんど認めない。脂肪滴は 24 時間後には認めるが、



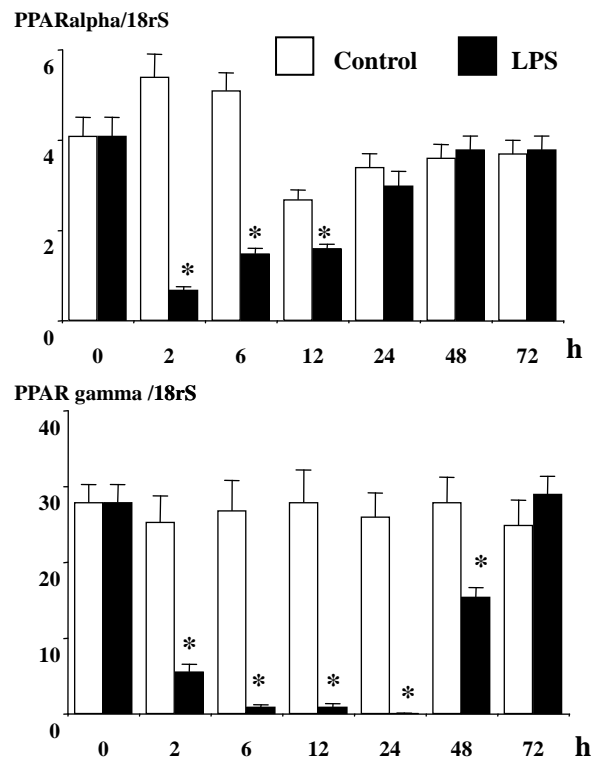
48 時間後、72 時間後にはほとんど認められなくなっている。LPS 投与 24 時間後での LPS 濃度依存的な変化を検討した。その結果 LPS 濃度依存的に脂肪滴が蓄積することを見いだした。この脂肪滴形成に LPS 投与による接

触の低下が関与しているかを検討するため、絶食条件で同様の検討を行ったが、絶食による脂肪滴の形成など、食事性の変化は認めな



かった。LPS 投与による脂肪滴形成をさらに正確に調べるため脂肪滴表面を覆う蛋白である ADRP の発現を免疫蛍光染色にて検討し

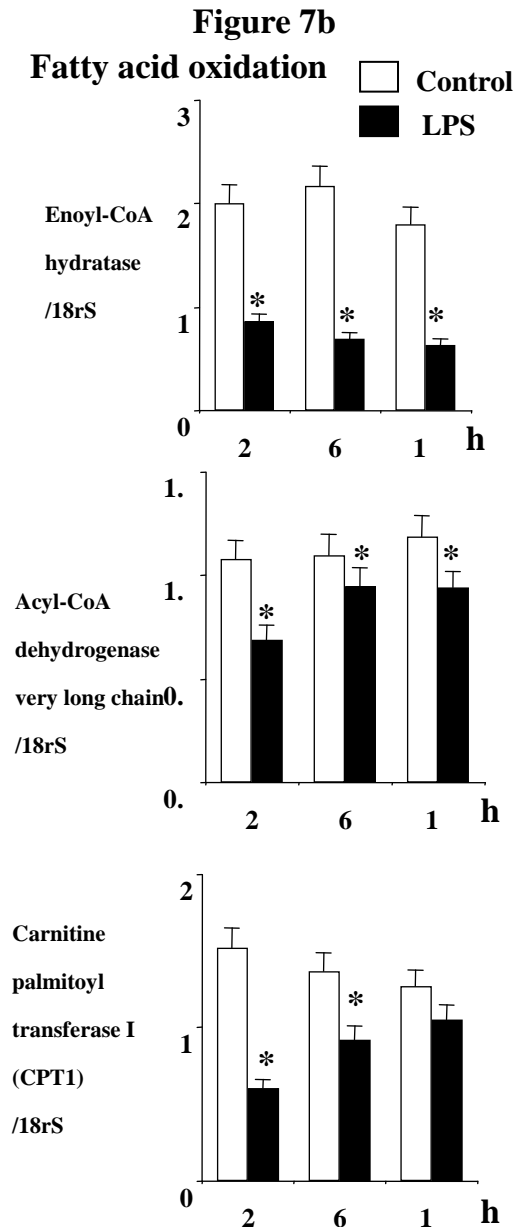
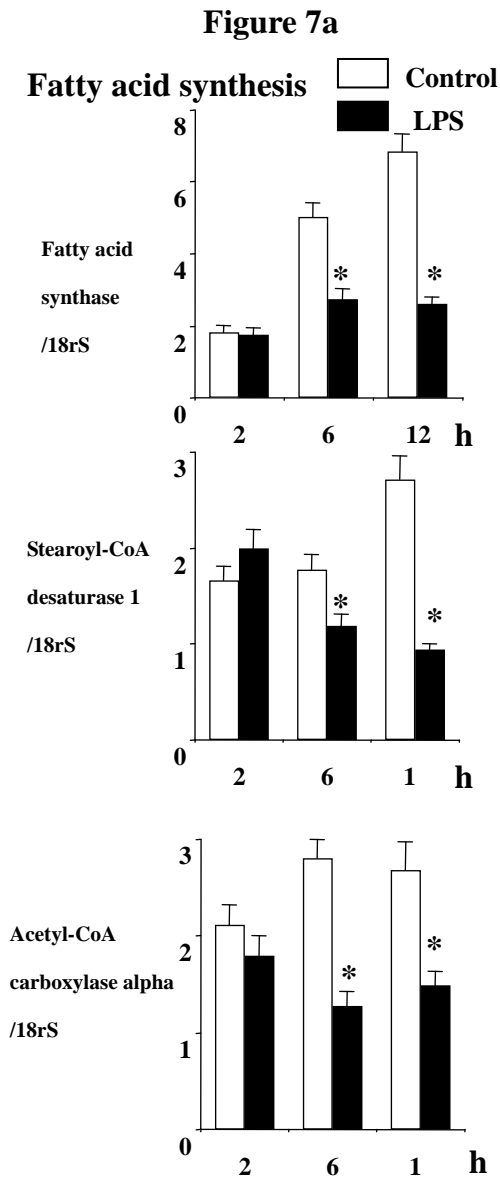
Figure 6



た (Figure 4A, B)。その結果、脂肪滴は LPS 投与後 24 時間より明らかに中心静脈域を中心に出現し、24 時間まで持続し、48 時間では消失することを明らかにした。また、LPS を濃度依存的に投与し 24 時間後の肝臓を検討した所、3mg/kg 以上の投与で脂肪肝を形成

していることが明らかとなった。Real-time PCR の検討で mADRP の発現は 6 時間後より増加していることも明らかとなった (Figure 4C)。LPS はまた、投与 2 時間後から肝臓での TNFalpha mRNA を増加させていることも明らかとなった (Figure 5)。
PPARalpha や PPARgamma などの転写因子は肝

と PPAR gamma が LPS 30mg/kg 投与後 2 時間後から発現が低下していることが明らかとなった。一方 SREBP-1 は変化を認めなかった。脂肪酸の合成か脂肪酸の酸化のどちらが脂肪滴形成に主に関与しているかを検討するために LPS 投与後の肝臓での各ステップに関与する酵素の mRNA 量を検討した (Figure 7)。



臓の脂肪滴形成に関与していることが知られている (Reddy JK, Am J Physiol Gastrointest liver Physiol 2006)。様々な核内転写因子を Real-time PCR にて検討したところ、Figure 6 に示すように PPAR alpha

その結果、脂肪酸の合成と脂肪酸の酸化、両方が低下していることが明らかとなった。以上より、LPS 投与により TNF alpha が上昇し PPAR alpha を抑制し、脂肪酸の酸化の抑制を

起こすという一連のメカニズムで肝細胞に脂肪滴が形成されることが示唆された。以上よりマウスにLPSを投与すると、体重減少、精巢上体脂肪重量の減少がみられ、肝内には一過性の脂肪沈着と脂肪滴表面構成蛋白であるADRPの発現亢進がみられた。LPS投与により、内蔵脂肪が早期から分解され、血清中性脂肪の増加がおこり、肝細胞内に中性脂肪の沈着が生じたことが一因と考えた。また、肝細胞内では脂肪酸合成系の酵素は発現が低下するのに対し、分解系の酵素が低下することにより肝細胞内に脂肪滴が形成されることが示唆された。

Sepsisやendotoxin shockでは脂質代謝に関連した病理学的変化として肝細胞ADRP発現の亢進を伴った一過性の脂肪沈着が生じることが考えられた。

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: Tsuchiya Y, Takahashi N, Yoshizaki T, Tanno S, Ohhira M, Motomura W, Tanno S, Takakusaki K, Kohgo Y, Okumura T, A Jak2 inhibitor, AG490, reverses lipin-1 suppression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, 382, 348-52、査読有
- ②: Kumei S, Motomura W, Yoshizaki T, Takakusaki K, Okumura T, Troglitazone increases expression of E-cadherin and claudin 4 in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, 380, 614-619、査読有
- ③: Motomura W, Yoshizaki T, Ohtani K,

Okumura T, Fukuda M, Fukuzawa J, Mori K, Jang SJ, Nomura N, Yoshida I, Suzuki Y, Kohgo Y, Wakamiya N. Immunolocalization of a Novel Collectin CL-K1 in Murine Tissues. *J Histochem Cytochem.* 2008, 56, 243-52、査読有

④: Ohhira M, Motomura W, Fukuda M, Yoshizaki T, Takahashi N, Tanno S, Wakamiya N, Kohgo Y, Kumei S, Okumura T. LPS induces ADRP expression and lipid accumulation in the liver through inhibition of fatty acid oxidation in mice. *J Gastroenterology.* 2007, 42, 969-78、査読有

[学会発表] (計1件)

大平賀子, 本村 亘, 高橋伸彦, 丹野誠志, 阿部真美, 三好茂樹, 鈴木康秋, 大竹孝明, 高後裕, 奥村利勝

LPSはマウス肝に一過性の脂肪沈着 adipose differentiation -related protein 発現を亢進させる

第44回日本肝臓学会総会、2008年6月6日、愛媛県民文化会館

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本村 亘 (MOTOMURA WATARU)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70374791

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し