

機関番号：11401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591041

研究課題名 (和文) 肝細胞特異的 PTEN 欠損マウスを用いた、肥満に対する遺伝子治療の試み

研究課題名 (英文) Study for therapeutic effect of hepatocyte specific Pten deficiency on severe obesity.

研究代表者

大嶋 重敏 (OHSHIMA SHIGETOSHI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：50375268

研究成果の概要 (和文)：

過食により、高度な肥満を呈するレプチン欠損 ob/ob マウスに、肝細胞特異的に Pten を欠損させた AlbCre/Pten^{flox/flox} マウスを交配し、ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox} マウス (double KO マウス) を作成することによって、ob/ob マウスの肥満を改善し得るか調べた。ob/ob マウス (ob/ob グループ)、ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox} マウス (double KO グループ)、AlbCre/Pten^{flox/flox} マウス (Pten KO グループ)、Wild type マウス (WT グループ) において、離乳 40 週後に体重、精巣または卵巣周囲の脂肪重量、肝湿重量、肝内中性脂肪含有量、血清 ALT、ROS 値を測定し、さらに western blot により、Akt の活性を評価し、その下流の脂肪代謝に関わる転写因子の発現を mRNA レベルで評価した。その結果、ob/ob マウスに、肝細胞特異的に Pten を欠損させることで、著明な肥満の改善をみた。肥満の改善のメカニズムには、脂肪代謝が大きな役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Our aim is to investigate whether hepatocyte-specific Pten deficiency can improve obesity in the leptin-deficient ob/ob mouse by activating lipogenesis in the liver. For this purpose, we have mated hepatocyte-specific Pten deficient mouse with leptin-deficient ob/ob mouse and established ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox} mouse. ob/ob mice (ob/ob group), ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox} mice (double KO group), AlbCre/Pten^{flox/flox} mice (KO group), Wild type mice (WT group) were sacrificed at 40 weeks just after weaning and measured body weight, fat tissue weight around testis or ovary, liver weight, triglyceride content in the liver, serum transaminase level and total ROS level in serum. Moreover we investigated Akt activation by western blot analysis and examined the expression of various genes especially related to β -oxidation by quantitative real-time PCR. The result is Hepatocyte-specific Pten deficiency improved obesity in the leptin-deficient ob/ob mouse by activating lipogenesis in the liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：PTEN, 肥満, 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、日本を含む先進諸国では、メタボリック症候群が大きな社会問題となっている。メタボリック症候群は、その診断基準にみられるように、中心性肥満に高血圧、糖尿病、高脂血症等を合併した状態であり、動脈硬化による虚血性心疾患のリスクファクターとして生命予後に大きな影響を与えることが指摘されている。メタボリック症候群の病態の最上流は中心性肥満であるため、メタボリック症候群の治療としては、運動療法や食事療法などによる肥満の改善が中心となり、補助的に食欲、消化吸収抑制剤や、エネルギー代謝促進剤等の薬物治療が併用されている。しかし、現在では確立された薬物治療はなく、新しい治療薬の開発が待たれている。そこで我々は、典型的な肥満のモデルマウスである *ob/ob* マウスを用いて、肥満に対する新たな遺伝子療法の開発を試みた。すなわち *ob/ob* マウスでは、レプチン産生遺伝子に変異しているため、正常なレプチンが欠如し、食欲の亢進、エネルギー消費の低下がみられる他、インスリン抵抗性に基づく耐糖能異常と脂肪組織における脂肪合成が亢進することによって、肥満が発症すると考えられている。一方、我々が作製した *AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスでは、脂肪肝の発生に伴い、精巣あるいは子宮周囲の脂肪組織が減少することが確認されている。*AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスでみられる肝臓の脂肪化は、摂食の増加とそれに続く血中遊離脂肪酸の肝臓への流入によっておこなわれるのではなく、肝細胞におけるAktの活性化に伴うSREBP1cやPPAR γ などの脂肪の合成や脂肪細胞の分化形成に関わる転写因子の発現亢進に基づく。そのため肝臓での脂肪の合成亢進に伴い、脂肪組織からの脂肪酸の流出が起これ、脂肪組織が減少すると考えられている。以上のデータから、*ob/ob* マウスに *AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスを交配して作製

した *ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスでは、脂肪組織の減少に基づいて、肥満の解消が得られるとの仮説を立てた。*ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスが、*ob/ob* マウスの肥満を解消し、そのメカニズムが明らかになれば、肝特異的にPtenを欠損させることによる、新たな肥満への遺伝子治療の可能性が広がることが考えられた。

2. 研究の目的

過食により、高度な肥満を呈するレプチン欠損 *ob/ob* マウスに、肝臓での脂肪の合成亢進が亢進している肝細胞特異的 Pten 欠損マウス (*AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウス) をかけあわせて、*ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスを作成し、肝細胞特異的 Pten 欠損が、*ob/ob* マウスの肥満を改善できるかを観察し、また脂肪代謝動態を調べることにより、肥満改善のメカニズムについて検討し、肝細胞特異的に Pten を欠損させることが、新たな肥満治療になるかを考察する。

3. 研究の方法

(1) *ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスの作成

AlbCre/Pten^{flox/flox}Cre 酵素の存在下で PTEN 遺伝子の欠失がおこる *AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスと肝細胞に特異的な遺伝子であるアルブミンによってCreの発現が制御されている *AlbCre* トランスジェニックマウスを交配し、実験に用いる *AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスを作成する。さらに *ob/ob/* マウスと *AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスを交配させ、*ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウス (double KO マウス) を作製する。そして、*ob/ob/* マウス (*ob/ob* グループ n=8), *ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウス (double KO グループ n=17), *AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウス (KO グループ n=13), wild type マウス (WT グループ n=12) について、主に 40 週齢で麻酔下でと殺し、以下の項目について調べる。

(2) double KO マウスの肥満の改善度を経時的にモニターする。

各グループの体重の変化を経時的に観察し、double KO マウスの肥満の改善度を経時的にモニターする。

(3) double KO マウスの体内脂肪動態の変化

各グループにおいて、40 週齢のマウスで、

①肝湿重量/体重比の測定

②精巣または子宮周囲の脂肪組織の湿重量

③肝臓内中性脂肪量

等を調べ、肥満の改善と体内脂肪分布の変化の関連を検討する。

(4) *ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウスの血液生化学データ

各グループのマウスの AST, ALT などの肝細胞障害マーカー、血中ラジカル生成能による ROS の評価をし、double KO グループの肥満解消の背景にあるメカニズムを血中生化学所見から解明する。

(5) double KO マウスの体内脂肪分布の背景メカニズムの検討

各グループのマウスの肝臓より蛋白および RNA を抽出、精製し、Akt やのリン酸化と SREBP1c, PPAR α , PPAR γ およびその下流の SCD1, FAS, ACC などの脂肪酸合成に関与する遺伝子、AOX, PTL などの脂肪酸の消費過程に関与する遺伝子の発現レベルをウエスタンブロット、RT-PCR にて検討し、double KO マウスの体内脂肪分布の変化の背景にある分子メカニズムを解析する。

4. 研究成果

(1) *ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウス (double KO) マウスの作成に成功し、*ob/ob/ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウス (*ob/ob* グループ), *ob/ob/AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウス (double KO グループ), *AlbCre/Pten^{flox/flox}* マウス (KO グループ), wild type マウス (WT グループ) の各グループについて以下の結果が得られた。

(2) double KO マウスは、*ob/ob* マウスの肥満を著明に改善した。

① 20 週齢における double KO マウスと *ob/ob* マウスの外観の比較

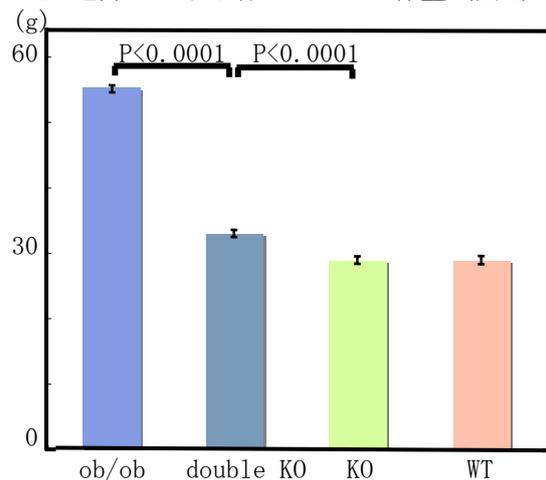


doubleKO マウス *ob/ob* マウス 図 1

図 1 に示すように、double KO マウスは、外観上、*ob/ob* マウスの肥満を著明に改善することがわかった。

②各グループの体重の変化を経時的にみた。

20 週齢における各グループの体重 (図 2)



40 週齢における各グループの体重 (図 3)

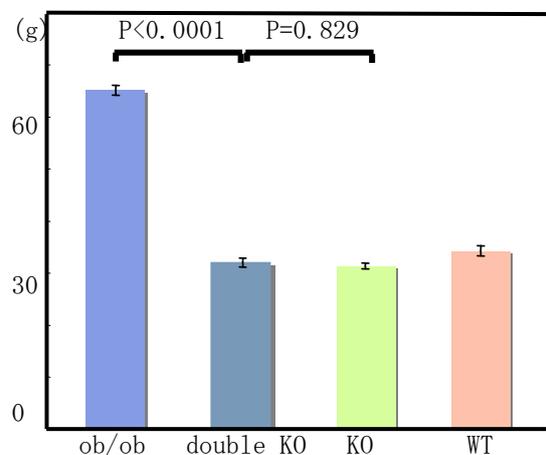


図2に示すとおり、20週齢ですでに、double KO グループで ob/ob グループに比較して著明な体重の減少を認めるが、KO グループ、WT グループに比較すると、double KO グループの方が体重が多い。しかし、図3に示すとおり、40週齢になると、double KO グループは、KO グループや WT グループと同程度まで、体重が減少していることがわかる。

(3) 体内脂肪動態の変化

① 肝湿重量/体重比を各グループで比較すると、ob/ob グループでは、WT グループに比較して肝湿重量/体重比が有意に増加していたが、double KO グループでは、ob/ob グループに比較してさらに増加していた。

② 精巣または子宮周囲の脂肪組織の湿重量をそれぞれのグループで比較すると、double KO グループでは、ob/ob グループに比較して著明な精巣または子宮周囲の脂肪組織の湿重量の減少が認められ、WT グループとの差が認められないまでに減少していた。

③ 肝内中性脂肪含有量を各グループで比較すると、ob/ob グループでは WT グループに比較して肝内中性脂肪含有量が有意に増加していたが、double KO グループでは、ob/ob グループに比較してさらに増加していた。

これらの結果から、double KO マウスでは、肝臓における脂肪代謝の亢進に伴い、末梢の脂肪組織から脂肪酸を肝臓に誘導していることが推察された。

(4) 各グループの血液生化学検査の検討すると、ob/ob グループでは、WT グループに比較して ALT 値が有意に増加していたが、double KO グループでは、ob/ob グループに比較してさらに増加していた。同様に血清の ROS 値を比較すると、ob/ob グループでは WT グループに比較して血清 ROS 値が有意に増加していたが、double KO グループでは、ob/ob グループに比較してさらに増加していた。以上の結果より、ob/ob グループでは、肝臓に増員された脂肪の影響で血清の transaminase 値や、血清の ROS 値が増加していることが考えられた。

(5) double KO マウスが、ob/ob マウスの肥満を改善したメカニズムを詳細に検索するために、脂肪酸の合成や消費に関わる蛋白や遺伝子を比較した。その結果、double KO マウスでは、ob/ob グループに比して脂肪合成に関わる蛋白である Akt の活性化が、有意に亢進していた。また、肝臓における脂肪合成に重要な遺伝子である、SREBP1c が double KO マウスでは、ob/ob グループに比して有意にその発現が増加していた。また、 β 酸化に関わる重要な遺伝子である peroxisomal thiolase (PTL) の発現も、double KO マウスでは、ob/ob グループに比して有意に増加していた。

これらの結果をまとめると、double KO マウスでは、肝臓における脂肪代謝の亢進に伴い、末梢の脂肪組織から脂肪酸を肝臓に誘導し、さらに β 酸化による脂肪酸の消費も亢進させることによって、ob/ob マウスの肥満を改善させたことが考えられた。この結果は、肝細胞特異的に Pten を欠損させることによる、遺伝的な肥満治療の可能性を示唆するものであるが、 β 酸化の亢進に伴い、transaminase の上昇や、血清の ROS 値の上昇も認められており、脂肪性肝炎の進行も示唆されるために、さらなる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

(1) 大嶋重敏, 堀江泰夫, 後藤隆, 三浦光一, 澁谷友美, 佐藤亘, 道免孝洋, 姉崎有美子, 山田育弘, 鎌田健太郎, 鈴木聡, 大西洋英: 肝細胞特異的 Pten 欠損によるレプチン欠損 ob/ob マウスの肥満の改善. 肝臓病学会総会 2011,6,3. 東京

(2) Shigetoshi Ohshima, Yasuo Horie, Takashi Goto, Kouichi Miura, Akira Suzuki, Hirohide Ohnishi: Hepatocyte-specific Pten deficiency improves obesity in the leptin-deficient ob/ob mouse. DDW2011, 2011, 5,10. Chicago

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 重敏 (OHSHIMA SHIGETOSHI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：50375268

(2) 研究分担者

堀江 泰夫 (HORIE YASUO)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30282164