

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82613
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500689
 研究課題名（和文） 肥満・脂肪肝発症予防のための PPAR 組織・サブタイプ特異性に関する網羅的解析
 研究課題名（英文） The analysis of tissue- and subtype-specificity for preventing obesity and NAFLD
 研究代表者
 山崎 聖美（TOMOMI YAMAZAKI）
 独立行政法人 国立健康・栄養研究所・基礎栄養研究部・室長
 研究者番号：00218439

研究成果の概要（和文）：マウスへの高脂肪食負荷によって各組織で遺伝子発現変化がみられたが、肝臓における変化が最も大きかった。肝臓では転写因子である PPAR γ 2 の発現増加が大きく、特異的なノックダウンによる解析から、肝臓における PPAR γ 2 の発現増加は脂肪肝発症に大きく関係していることが明らかになった。PPAR γ 2 が活性化されやすいマウスは、脂肪食摂取後に血中脂質濃度が増加し、肥満しやすいことがわかった。

研究成果の概要（英文）：Saturated fatty acid-rich oil induced fatty liver in mice, and this was triggered initially by an increase in PPAR γ 2 protein in the liver, which led to increased expression of lipogenic genes. Inactivation of PPAR γ 2 may improve fatty liver induced by saturated fat. Postprandial hypertriglyceridemia in mice is induced by decreased LPL activity after fat load and is associated with obesity induced by a high-fat diet.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：生活習慣病、脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪型肥満に加え、高血糖、高血圧、脂質異常のうちいずれか2つ以上をあわせ持った状態はメタボリックシンドロームと呼ばれるが、メタボリックシンドロームは、動脈硬化を進行させ、心臓病や脳卒中といった病気を急速に招くことから、早期に対策を講じることが必要である。

高脂肪食摂取による肥満発症の際、peroxisome proliferator-activated

receptor (PPAR) γ は脂肪組織において重要な役割を果たす。高脂肪食を摂取すると PPAR γ が活性化され脂肪細胞が肥大化し、インスリン感受性ホルモン分泌低下、インスリン抵抗性が生じる。

一方、NAFLD は可逆性があるがゆえに良性疾患と考えられてきたが、メタボリックシンドローム発症にも関係し、臨床的に重要な疾患として認識されつつある。さらに、肝臓でも転写因子 PPAR γ が脂質代謝調節において

重要な働きをしている。

転写因子 PPAR には、 α 、 β/δ 、 γ の3つのサブタイプがあり、PPAR α は肝臓、PPAR γ は脂肪組織が主要発現組織で、PPAR β/δ はほぼすべての組織に発現している。PPAR α は脂肪酸 β 酸化を、PPAR γ は脂肪蓄積を担う分子をコードする遺伝子をそれぞれ標的遺伝子としている。

PPAR γ の標的遺伝子の一つに fatty acid binding protein (aP2) がある。脂肪組織で PPAR γ が活性化されると aP2 の発現が増加する。しかし、肝臓では高脂肪食摂取によって PPAR γ が活性化されても aP2 の発現はほとんど増加しない。また、PPAR γ と PPAR α は同時に活性化される場合もある。このように、転写因子 PPAR は複雑な制御を行っていると考えられるが、その詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、メタボリックシンドロームの鍵分子と考えられる PPAR の組織特異的、サブタイプ特異的な転写活性調節について解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食摂取による PPAR γ 発現変化

エネルギー比 60% の脂肪を含む高脂肪食を飽和脂肪酸を多く含むものと不飽和脂肪酸を多く含むものの2種類作成し、マウスに投与した。投与終了後に解剖を行い、肝臓、筋肉、脂肪組織より RNA を精製しリアルタイム PCR、あるいはマイクロアレイを用いて遺伝子発現について解析を行った。

(2) 肝臓における PPAR γ 発現ノックダウン

PPAR γ 2 mRNA 発現をノックダウンする shRNA をデザインし、shRNA を発現するアデノウイルスを作製した。静脈注射によりマウス肝臓特異的にアデノウイルスを発現させ、(1)と同様にマウスの解析を行った。

(3) 血中リポタンパク質の解析

ゲル濾過法により血中脂質の解析を行った。

(4) LPL 活性測定

組織より lipoprotein lipase (LPL) を遊離させ、キットを用いて LPL 活性を測定した。また、マウスにヘパリンを投与し、血清中 LPL 活性についても同様に測定を行った。

(5) PPAR 遺伝子上流の発現調節領域の解析

マウス PPAR γ 2 遺伝子上流約 4kb をクローニングし、マウス肝培養細胞を用いて Luc アッセイを行い、牛血清アルブミン結合脂肪酸に対する反応性からマウス系統による反

応性の違いについて解析した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食摂取による PPAR γ 発現変化

飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食、あるいは不飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食をマウスに食べさせると、投与開始してから4週間後に飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食を食べたマウスは肝臓で PPAR γ 2 の発現が上昇し脂肪肝を発症することがわかった。肝臓では PPAR γ 2 の標的遺伝子 CD36 や ADRP の発現も増加していたが、sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c やその標的遺伝子の発現に変化は見られなかった。そこで、マウスに4週間飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食、あるいは不飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食を食べさせたのち、PPAR γ 2 mRNA 発現をノックダウンする shRNA を発現するアデノウイルスを発現させ、肝臓特異的に PPAR γ 2 の発現を減少させたところ、肝臓 PPAR γ 2 の発現減少とともに、脂肪肝を改善することができた。同様に、マウスに大豆タンパクを高脂肪食とともに摂取させた場合、肝臓における PPAR γ 2 の発現を減少させるとともに脂肪肝発症を予防することができた。さらに、長期にわたって高脂肪食を摂取させ、脂肪肝および肥満を発症させたマウスの各組織から RNA を精製し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化について解析を行った結果、肝臓のみならず、脂肪組織、筋肉でも種々の遺伝子発現が変化していたが、肝臓における遺伝子発現変化が最も大きいことがわかった。これらの結果から、肝臓における PPAR γ 2 の発現増加は脂肪肝発症に大きく関係していることが明らかになった。

(2) 高脂肪食摂取による PPAR サブタイプ発現及び組織による発現の違い

高脂肪食を長期投与したマウスは普通食を摂取したマウスに比べ、肝臓では脂肪が蓄積し、PPAR γ 2 の発現が3倍に増加し、標的遺伝子である CD36 の発現も3倍に増加していた。しかし、同じ標的遺伝子である aP2 の発現は変化しなかった。PPAR γ 1 の発現にも変化がみられなかった。また、違う系統のマウスを用いて同様に高脂肪食を摂取させた場合は、肝臓での PPAR γ 2 の発現が少ないにもかかわらず脂肪が蓄積していた。PPAR α に関しては両マウスともに発現変化はみられなかったが、標的遺伝子のうち MCAD の発現は増加していた。また、両マウスともに脂肪組織では PPAR γ 1 及び 2 の発現に変化はみられなかった。LPL も PPAR の標的遺伝子であり PPRE の存在も知られている。LPL 発現量が多きくとも全ての組織において少ないマウスは、脂肪を摂取しても PPAR γ の発現が増加するにもかかわらず LPL の発現が増えず、血中中性脂肪濃度が食後に非

常に高い濃度に増加することが明らかになった。リポ蛋白質解析したところ、キロミクロンとVLDLに分画される画分が増加していた。このLPL発現が少ないマウスは、高脂肪食を摂取させるとより肥満になりやすく、皮下脂肪、腸間膜脂肪組織、肝臓重量が増加し、肝臓脂肪もより蓄積することがわかった。他の系統のマウスについても脂肪摂取による血中中性脂肪濃度増加について調べたが、これほど増加を示すマウスは無く、脂肪摂取により高脂血症を呈すよいモデルマウスになると考えられた。

(3) PPAR活性化が異なるマウスにおける解析及び反応性の違い

マウス肝培養細胞を用いた研究から、肝臓におけるPPAR γ 2活性化による脂肪蓄積には、PPAR γ 2遺伝子上流の領域(約4kb)が関与していることがわかった。この部分はマウスの系統によっても違いがみられた。PPAR γ 2が活性化されやすいマウスは、脂肪食摂取後に血中脂質濃度が増加した。これらのマウスの各組織のLPL活性について調べた結果、筋肉、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓の全てにおいてコントロールマウスに比べ活性が低かった。LPL活性が低いために脂肪摂取後の血中キロミクロン濃度が高くなっているものと推察された。さらに、LPL遺伝子の塩基配列のうち2箇所が異なっていた。このマウスは、コントロールマウスに比べ、高脂肪食投与によって肥満しやすいことがわかった。

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5件)

① Yamazaki T, Kishimoto K, Ezaki O. The ddY mouse: a model of postprandial hypertriglyceridemia in response to dietary fat. *J Lipid Res*: 53(10): 2024-2037, 2012. 査読有
DOI: 10.1194/jlr.M023713.

② Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S, Ezaki O. Dietary β -conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 protein. *J Nutr. Biochem*: 23(2):123-132, 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.11.006.

③ Ehara T, Kamei Y, Takahashi M, Yuan X, Kanai S, Tamura E, Tanaka M, Yamazaki T, Miura S, Ezaki O, Suganami T, Okano M, and Ogawa Y. Role of DNA methylation in the regulation of lipogeniclycerol-3-phosphate

acyltransferase 1 gene expression in the mouse neonatal liver. *Diabetes*: 61(10): 2442-2450, 2012. 査読有

DOI:10.2337/db11-1834

④ Yamazaki T, Shiraiishi S, Kishimoto K, Miura S, Ezaki O. An increase in liver PPAR γ 2 is an initial event to induce fatty liver in response to a diet high in butter: PPAR γ 2 knockdown improves fatty liver induced by high-saturated fat. *J Nutr. Biochem*: 22(6):543-553, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.04.009.

⑤ 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*:13(3):294-307, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.cmet.2011.01.018.

[学会発表] (計6件)

① 山崎 聖美、江崎 治。魚油と大豆タンパクの体内脂肪蓄積予防機序の違い。第33回日本肥満学会、2012.10.11. ホテルグランヴィア京都(京都)

② 山崎 聖美、江崎 治。大豆蛋白質 β -コングリシニンの高脂肪食による脂肪肝発症予防機序。第33回日本肥満学会、2012.10.12. ホテルグランヴィア京都(京都)

③ 江原 達弥、亀井 康富、高橋 真由美、袁 勳梅、金井 紗綾香、田村 江梨奈、田中都、山崎 聖美、三浦 進司、江崎 治、菅波 孝祥、岡野 正樹、小川 佳宏。マウス新生仔の肝臓における脂肪合成酵素GPAT1のDNAメチル化による遺伝子発現制御。第33回日本肥満学会、2012.10.11. ホテルグランヴィア京都(京都)

④ 亀井 康富、江原 達弥、高橋 真由美、袁 勳梅、金井 紗綾香、山崎 聖美、江崎 治、菅波 孝祥、岡野 正樹、小川 佳宏。マウス新生仔肝臓の脂肪合成遺伝子のDNAメチル化制御。第66回日本栄養・食糧学会大会、2012.5.19. 東北大学(仙台)

⑤ 亀井 康富、江原 達弥、高橋 真由美、袁 勳梅、金井 紗綾香、山崎 聖美、江崎 治、菅波 孝祥、岡野 正樹、小川 佳宏。新生仔肝臓の脂肪合成遺伝子のDNAメチル化制御。日本農芸化学会2012年度大会、2012.3.25. 京都女子大学(京都)

©山崎 聖美、江崎 治. 飽和脂肪酸過剰摂取による脂肪肝発症は肝臓PPAR γ 2発現ノックダウンにより予防できる. 第31回日本肥満学会、2010.10.2.前橋テルサ(群馬)

[図書] (計1件)

① Yamazaki T, Ezaki O. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs). Humana Press, 2013, 343 (pp. 99-116)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 聖美 (TOMOMI YAMAZAKI)

独立行政法人 国立健康・栄養研究所・基礎栄養研究部・室長

研究者番号：00218439