

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591354

研究課題名(和文) 肝臓脂肪毒性における肝臓リポ蛋白リパーゼ及びリポ蛋白リパーゼ調節因子の意義

研究課題名(英文) The roles of hepatic lipoprotein lipase and its regulating factors on the hepatic lipotoxicity

研究代表者

野牛 宏晃 (Yagyu, Hiroaki)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60348018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓特異的LpL欠損(L-LpLKO)マウスに、肝臓の脂肪酸合成及びLpL発現を誘導するT0901317を2週間投与した。L-LpLKOマウスでは対照に比べ肝臓LpL活性が45%抑制したが、骨格筋、心筋、脂肪組織及び血清のLpL活性は差がなかった。VLDL-TG増加はL-LpLKOマウスでより著明に認められたが、HDL増加は対照のみで認められた。VLDL産生は両群で差がなかった。T0901317は肝臓のTG蓄積を誘導するが、両群で差を認めなかった。結論として、肝臓LpLの脂肪肝への関与は更なる検討が必要であるが、肝臓LpLはVLDL及びHDL代謝に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Floxed LpL mice used as control and liver specific LpL knockout (L-LpLKO) mice were fed with the diets containing T0901317 for 2 weeks to induce the lipogenesis and the expression of LpL in the liver. T0901317 led to a significant 45% decrease of hepatic LpL activity in L-LpLKO mice compared to control mice. The LpL activities in the skeletal muscle, heart, adipose tissue and plasma were not influenced by T0901317 and those activities were similar between two types of mice. Although T0901317 increased VLDL-TG in both mice, L-LpLKO mice had more VLDL-TG than control mice. T0901317 increased HDL in control mice, but not L-LpLKO mice. VLDL production was similar in both mice. T0901317 induced TG accumulations in the liver, with no significant difference between two types of mice. In conclusion, although further investigation should be considered to determine the role of hepatic LpL on the fatty liver, hepatic LpL could be involved in VLDL and HDL metabolisms.

研究分野：糖・脂質代謝

キーワード：リポ蛋白リパーゼ 肝臓 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白リパーゼ(LpL)は、カイロミクロン(CM)や超低比重リポ蛋白(VLDL)中のトリグリセライド(TG)を水解すると共に脂肪酸を産生することにより、血清リポ蛋白代謝及び組織への脂肪酸供給を担う酵素である。血清リポ蛋白代謝では特に、CM、VLDLのクリアランス促進とHDL形成に関与している。LpLは主に骨格筋、心筋、脂肪組織において産生・分泌され、その後これら臓器の血管内皮上に移動し発現している。血清LpL活性の大部分は、これら臓器により産生されたLpLが反映していると考えられている。LpLが欠損した病態は、I型高脂血症として知られ、著明な高CM血症を来し、急性膵炎を併発することが知られている。

TGの水解により産生された脂肪酸は骨格筋、心筋ではエネルギー源として利用される一方、脂肪組織では再度TGとして合成され蓄積される。近年過剰な脂肪の蓄積が臓器障害を来すことが報告され、脂肪毒性として注目されてきた。私達も、実験動物において心臓にLpLを過剰に発現させると心筋障害を来すことを報告しており、また他のグループからは骨格筋でLpLを過剰発現させると筋障害が起こることが報告されており、LpLが脂肪毒性に関与している可能性が考えられる。

更にLpLは動脈硬化にも関連している。LpLの血清リポ蛋白代謝への作用はアポ蛋白B含有リポ蛋白のクリアランス促進及びHDLの形成であり、この作用は抗動脈硬化と捉えられている。一方、マクロファージに発現するLpLはむしろ泡沫化を促進させる。変性リポ蛋白をマクロファージが取り込む際に、マクロファージLpLが取り込みを促進させる。私達はマクロファージ特異的LpL欠損マウスでは、マクロファージの泡沫化が抑制され、動脈硬化病変が減少することを報告してきた。

以上のようにLpLは、血清リポ蛋白代謝、臓器での脂肪酸代謝、動脈硬化と様々な病態に関連している。

2. 研究の目的

肝臓における脂肪酸代謝異常は脂肪毒性による臓器障害の一つとして脂肪肝を来し、糖尿病やメタボリック症候群に伴うインスリン抵抗性、血清リポ蛋白異常と関連している。これまでob/obマウスでは野生型と比べ肝臓のLpL遺伝子の発現が増加していること、またヒトの脂肪肝においても肝臓LpLの発現が増加していることが報告されてきたが、肝臓LpLと脂肪肝あるいはそれに伴う脂質異常症との関連は明らかではない。そこで本研究では、肝臓特異的LpL欠損マウスを用いて、脂肪肝及びそれに伴う脂質異常症との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肝臓特異的LpL欠損マウスの作製

既に私達はflox LpLマウスを作成し、臓器特異的LpL欠損マウスの作製に有用であることを報告してきた。今回の研究では、Flox LpLマウスとアルブミンプロモーターによりcreを過剰発現しているalb-creマウスを交配し、肝臓特異的LpL欠損マウス(L-LpLK0)を作成する。LpL欠損については、肝臓についてreal-time PCRによりLpL mRNAを、^[13H]trioleinを器質として用いてLpL活性を測定することにより確認する。また、主たるLpL産生臓器である骨格筋、心筋、脂肪組織についても同様にLpL mRNA及び活性を測定し、肝臓LpL欠損による他臓器のLpL発現への影響を検討する。更にヘパリン(50U/mouse)投与後の血清を用いてLpL活性を測定する。

本研究では8-9週齢のマウスを用いる。更にT0901317は肝臓のLXRの誘導を介してSREBP1cによる脂肪酸合成を促進し誘導すると共に、肝臓LpLの発現を誘導することから、T0901317を通常食に0.015%含有した餌を2週間投与し実験を行う。

(2) 血清脂質、リポ蛋白代謝の検討

非絶食下で採血し、血清脂質を酵素法により測定する。また血清リポ蛋白については、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて解析する。

(3) 肝臓VLDL分泌の検討

肝臓LpL欠損によるリポ蛋白合成への影響を検討するため、Triton WR 1339(500mg/kg)を静脈注射後1時間置きに4時間後まで採血し、血清TGを測定することによりVLDL分泌を検討する。

(4) 肝臓における遺伝子発現の検討

LpLの転写後の調節に関わるApoAV、glycosylphosphatidyl inositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1(GPIHBP1)、angiopoietin-like protein 1(ANGPTL)-3,-4、更にTG合成に関与するfatty acid synthase(FAS)、HDL代謝に重要なapoA1、ATP-binding cassette transporter 1(ABCA1)、Phospholipid transfer protein(PLTP)、hepatic lipase(HL)、endothelial lipase(EL)などの遺伝子発現をreal-time PCRにより検討する。

(5) 肝臓脂質含量の測定

通常食及びT0901317投与後において、Folchの方法に準じて肝臓の脂質を抽出する。肝臓の脂質含量を測定し肝臓LpL欠損の影響を検討する。

(6) 統計

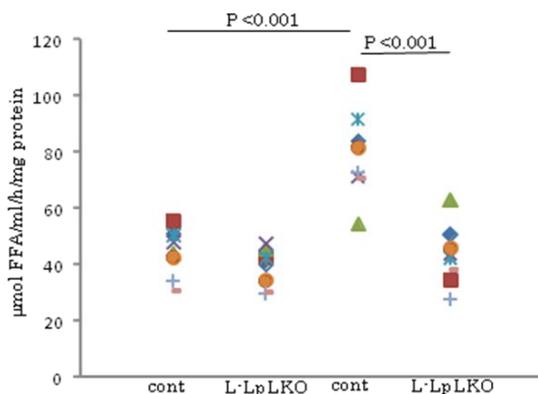
データは平均±標準誤差で示す。また2群間の平均の有意差検定にはStudent t-testを

用いる。経時的な測定値を2群間で比較した場合には、two-way repeated-measures ANOVAを用いる。

4. 研究成果

(1) L-LpLKOの作製

L-LpLKOの肝臓LpL mRNAは対照であるfloxedLpLマウス(cont)に比べ83%抑制されていたが、肝臓LpL活性は両群間で差を認めなかった。一方T0901317を2週間投与後は、contでは肝臓LpL mRNA発現が11倍に増加したが、L-LpLKOでは3.2倍の増加に留まった。肝臓LpL活性についてもT0901317投与によりcontでは77%増加するが、L-LpLKOでは11%の増加であり、その結果contに比べ45%有意に抑制されていた($p < 0.001$)。



一方、LpLの主要な産生臓器である骨格筋、心筋、脂肪組織のLpL活性を測定したが、contに比べL-LpLKOにおいて有意な変化は無く、またT0901317投与後では両群共にこれらの臓器で活性増加を認めず、また両群間で差も認めなかった。更に血清LpL活性についても、T0901317前後で両群間に有意な変化は認められなかった。

従って、L-LpLKOではcre-loxPシステムにより肝臓LpL mRNAの発現が抑制されていたが、通常食飼育では肝臓LpL活性はcontと比べ有意に低下を認めなかった。一方T0901317によりLpL活性を誘導することにより、L-LpLKOはcontと比べて有意な肝臓LpL活性の低下を認めた。また、骨格筋、心筋、脂肪組織及び血清のLpL活性はL-LpLKOとcontでは同等であり、これら臓器のLpL活性は肝臓のLpL欠損による影響を受けないことが明らかとなった。

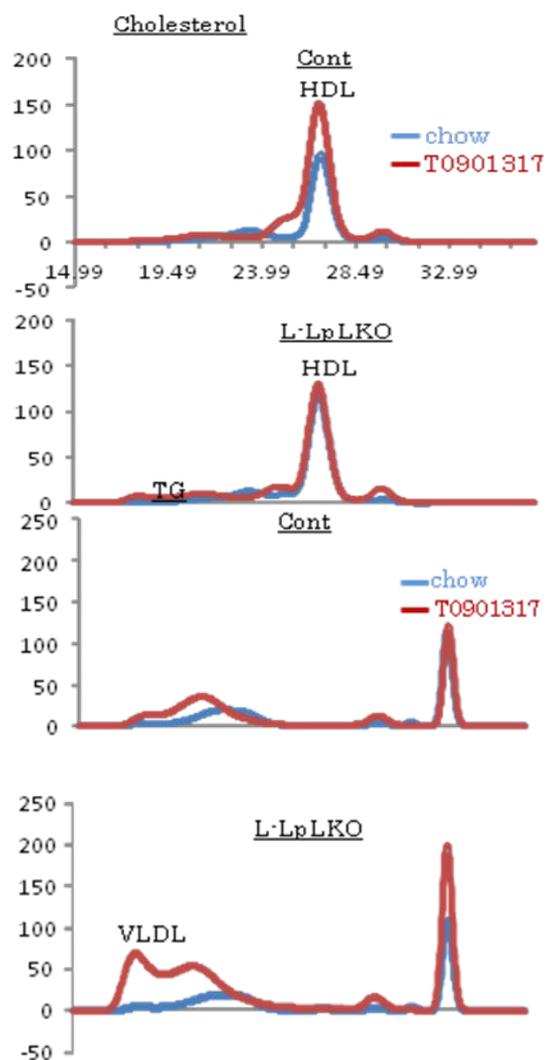
(2) 血清脂質への影響

血清脂質については、通常食飼育で総コレステロール(TC)はcont: 82.5 ± 3.1 mg/dl、L-LpLKO: 94.9 ± 3.0 mg/dl (各群とも $n=8$) であり、L-LpLKOで有意に血清コレステロールが増加していた($p < 0.01$)。TGについては、cont: 92.8 ± 7.2 mg/dl、L-LpLKO: 91.2 ± 9.9 mg/dl であり両群間で差を認めなかった。HDL-Cについては、cont: 42.9 ± 1.9 mg/dl、L-LpLKO: 52.9 ± 2.0 mg/dl であり、L-LpLKOにおいて、

HDL-Cの有意な上昇を認めた($p < 0.01$)。HPLCによる結果から、L-LpLKOにおけるTCの増加はHDL-Cの増加によるものと考えられた。L-LpLKOにおける通常食飼育でのHDL-Cの増加機序については不明であり、今後検討が必要である。

T0901317投与により肝臓でのlipogenesisを誘導した結果、contに比べL-LpLKOにおいて血清TGの増加がより著明であった。HPLCによる検討では、このTG増加は主にVLDL分画におけるTG増加であった。一方血清HDL-Cについては、T0901317投与によりcontにおいてはHDL-Cが増加する一方、L-LpLKOではHDL-C増加反応が認められなかった。

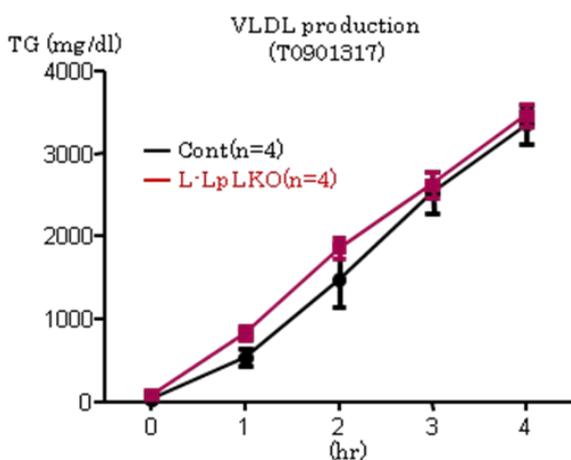
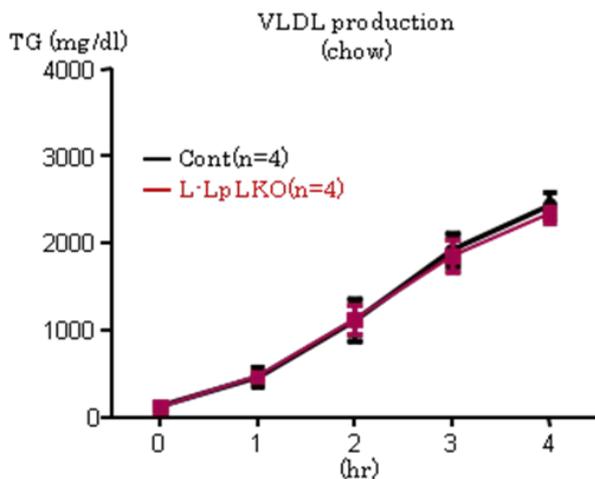
従ってT0901317投与によりcontでは血清TG及びHDL-C共に増加するが、L-LpLKOでは血清TGが更に増加する一方、HDL増加は認めなかった。



(3) 肝臓におけるVLDL合成の検討

T0901317投与で、contに比べL-LpLKOでよりVLDL-TG増加したことから、肝臓におけるVLDL分泌をTriton WR 1339投与下で検討した。通常食飼育におけるVLDL分泌に両群間で差を認めなかった。またT0901317により

cont 及び L-LpLKO 共に肝臓での VLDL 分泌は増加するが、両群で差は認めなかった。従って、T0901317 により cont に比べ L-LpLKO でより著明に VLDL-TG が増加する機序として、VLDL 分泌亢進の差は関連していないと考えられた。



(4) 肝臓における遺伝子発現の検討

肝臓において、LpL の翻訳後調整に関する蛋白、TG 合成に関連する蛋白、HDL 代謝に重要な蛋白の遺伝子発現を real-time PCR により検討した。T0901317 により cont では著明に LpL mRNA が増加する一方で、L-LpLKO マウスでは軽度の増加に留まった(既述)。LpL 活性の調節に重要な LMF1、ANGPTL-3、-4、GPIHBP1、apoAV については、T0901317 により発現が誘導されることはなく、また cont 及び L-LpLKO 間で発現量の差も認めなかった。SREBP1c、FAS は T0901317 により発現が誘導されるが、両群間で差を認めなかった。HDL 代謝に重要な apoA1、HL、EL は、T0901317 により発現は誘導されず、両群間で差は認められなかった。一方 ABCA1、PLTP は T0901317 による発現誘導を認めるが、両群間で差は認めなかった。

従って、肝臓における TG 及び HDL 代謝、LpL 調節に関連する蛋白の遺伝子発現は両群で

同等であり、L-LpLKO において認められる LpLmRNA 抑制以外に両群間で発現が異なる遺伝子は認められなかった。

(5) 肝臓脂質含有量の検討

通常食飼育においては、TG: cont 4.0 ± 0.3 mg/g tissue、L-LpLKO 5.5 ± 0.7 mg/g tissue、TC: cont 3.0 ± 0.2 mg/g tissue、L-LpLKO 3.8 ± 0.1 mg/g tissue であり、TG 及び TC 共に両群間で差を認めなかった。T0901317 を 2 週間投与後の脂質含有量は、TG: cont 14.3 ± 0.7 mg/g tissue、L-LpLKO 15.9 ± 1.0 mg/g tissue、TC: cont 3.0 ± 0.1 mg/g tissue、L-LpLKO 3.0 ± 0.1 mg/g tissue であった。T0901317 は cont 及び L-LpLKO 共に肝臓に TG 蓄積を誘導するが、両群間で差を認めなかった。一方、T0901317 は肝コレステロール蓄積を誘導せず、また両群間でも差を認めなかった。

(6) 結果のまとめ

Cre-loxP システムにより肝臓 LpL を欠損させると、肝 LpLmRNA では著明な発現抑制を認めるが、LpL 活性は cont と同程度に認めた。T0901317 投与により肝臓での lipogenesis 及び LpL 発現を誘導した結果、cont に比べ L-LpLKO で有意に LpL 活性の上昇が抑制された。血清脂質では T0901317 により L-LpLKO において VLDL-TG の増加が著明となる一方、HDL 増加が抑制された。肝臓における VLDL 分泌は両群で差を認めなかった。血清、骨格筋、心筋、脂肪組織の LpL 活性は両群間で同等であった。さらに肝臓において、TG 合成に関する蛋白、LpL の翻訳後調節に関わる蛋白、HDL 代謝に関連する蛋白の遺伝子発現を検討したが、T0901317 投与前後共に両群間に差を認めなかった。以上の事から、T0901317 で L-LpLKO で認められた VLDL-TG 増加及び HDL 増加抑制の機序として、肝臓の LpL が直接 VLDL-TG を水解し、HDL 産生に関与していることが想定される。一方、T0901317 は肝臓への TG 蓄積を誘導するが、両群間では差を認めなかった。今後、フルクトースやスクロース食などを用いて脂肪肝を誘導し、肝臓 LpL の役割を検討予定である。

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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野牛 宏晃 (Yagyu Hiroaki)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60348018

(2)研究分担者

岡崎 啓明 (Okazaki Hiroaki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80610211

(3)連携研究者

高橋 学 (Takahashi Manabu)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：70406122

(4)連携研究者

永島 秀一 (Nagashima Syuichi)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：30406136

(5)連携研究者

石橋 俊 (Ishibashi Shun)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：90212919