

平成21年5月1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～ 2008
 課題番号：19790476
 研究課題名 (和文)：PPAR α ノックアウトマウスを用いたアルコール性肝障害の病態解析と治療法の開発
 研究課題名 (英文)：Analysis of pathogenesis of alcoholic liver disease and development of novel therapies using PPAR α -null mice
 研究代表者：田中 直樹 (TANAKA NAOKI)
 信州大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：80419374

研究成果の概要：

アルコール性肝障害は我が国において増加の一途を辿っているが、その病態や新規治療法に関する知見は少ない。我々はヒトでのアルコール性肝障害に類似した病像を呈する PPAR α ノックアウトマウスを用い、その病態を解析した。本マウスでは酸化ストレス産生亢進に伴い肝炎・肝線維化が生じていた。脂肪肝の治療薬であるポリエンフォスファチジルコリン (PPC) は、酸化ストレス産生亢進を緩和することにより本マウスでの肝炎を軽減させた。これらの結果はアルコール性肝障害における酸化ストレスの重要性とともに、PPC の新規治療薬としての可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

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：栄養学・ストレス・病理学・内科・アルコール

1. 研究開始当初の背景

PPAR α ノックアウトマウスはヒトでのアルコール性肝障害と類似した病像を呈するが、その発生機構は不明である。

2. 研究の目的

(1) 本マウスを用いて、アルコール性肝障害の発症機構を炎症性サイトカイン、酸化ストレス、門脈内エンドトキシン血症などの観点から解析する。

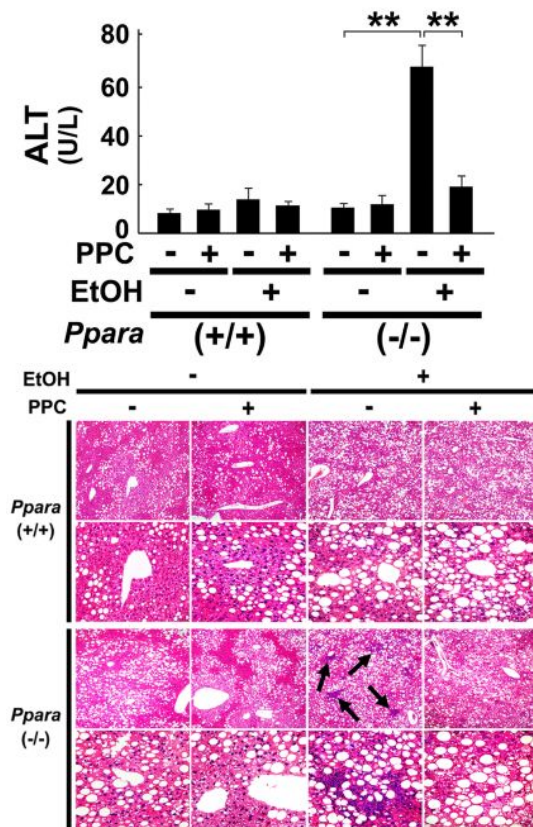
(2) 本マウスを用いて、アルコール性肝障害の予防法の開発に努める。

3. 研究の方法

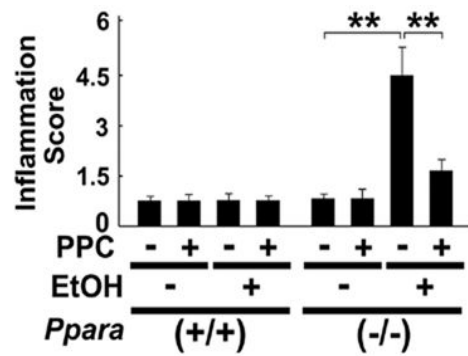
- (1) 8 週齢・オスの野性型 (+/+)・PPAR α ノックアウト (-/-) マウスをコントロール群・4%エタノール投与群に分け、6ヶ月間飼育した。
- (2) 6カ月に肝臓を採取し、病理組織学的検査に供した。また肝臓の遺伝子発現を定量PCR法、イムノブロット法にて解析した。
- (3) 細胞膜保護作用を有するとされるポリエンフォスファチジルコリン (PPC) を4%エタノール含有食に混合し、その効果を調べた。

4. 研究成果

- (1) 野生型マウス (+/+) では4%エタノール含有食を6ヶ月間投与しても肝臓に大きな変化が見られなかった。一方、PPAR α ノックアウトマウス (-/-) では肝機能異常 (ALT 上昇) が見られ、組織学的にも肝炎、肝細胞傷害が認められた。PPCはこれらの変化を有意に抑制した。

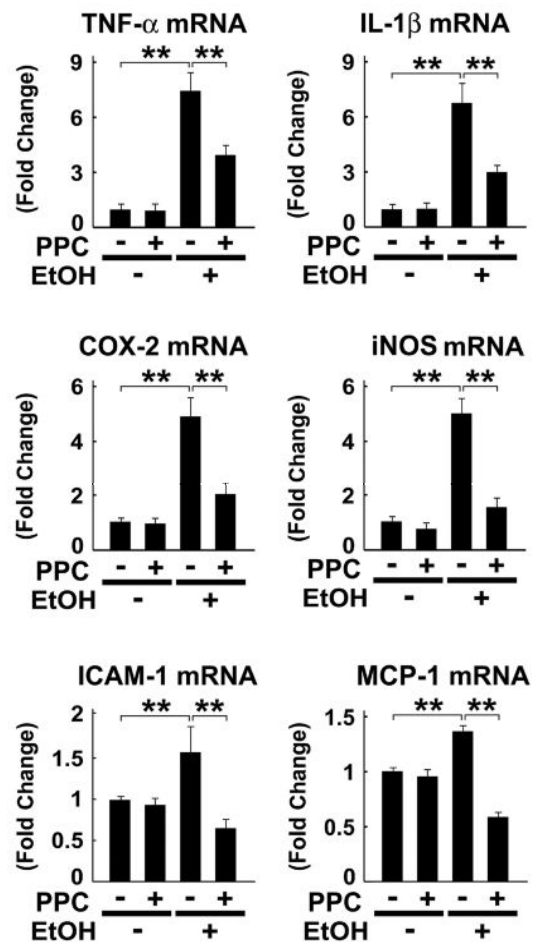


HE染色、→は炎症細胞浸潤。

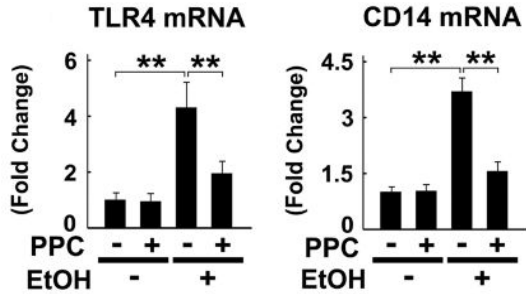


肝炎の強さをスコア化したもの。

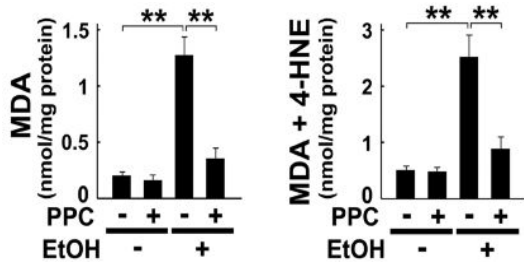
- (2) エタノールを6ヶ月間投与した PPAR α ノックアウトマウスの肝臓では、炎症性サイトカイン・ケモカインの著明な発現増加が見られたが、PPCはその増加を有意に抑制した。



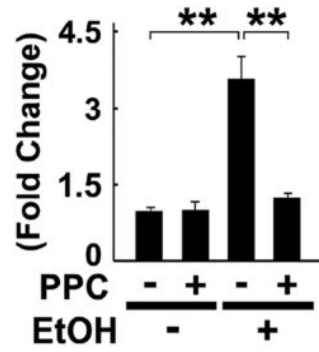
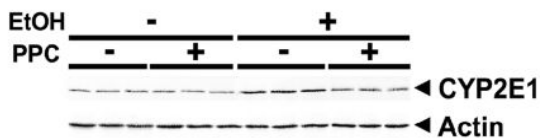
(3) エタノールを6ヶ月間投与した PPAR α ノックアウトマウスの肝臓では、Toll 様受容体 4 とその関連分子 CD14 の著明な発現増加が見られたが、PPC はその増加を有意に抑制した。



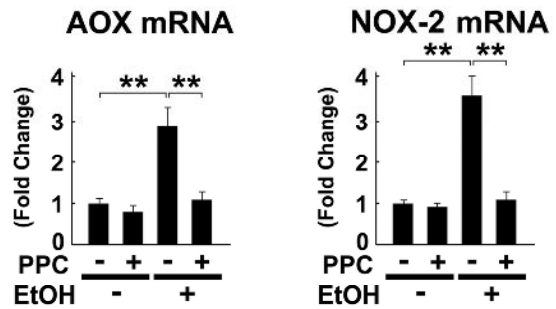
(4) エタノールを6ヶ月間投与した PPAR α ノックアウトマウスの肝臓では、酸化ストレスにより産生される過酸化脂質 (MDA、4-HNE) の増加が見られたが、PPC はその増加を有意に抑制した。



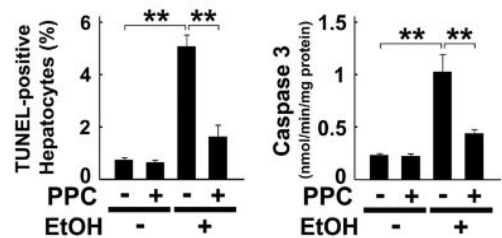
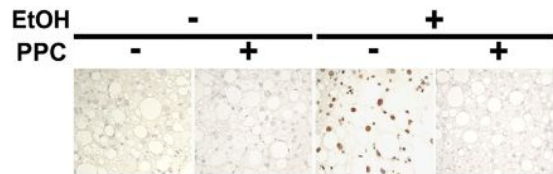
(5) 酸化ストレス産生・消去酵素の発現をさらに調べたところ、PPCによる過酸化脂質減少作用は、酸化ストレスを産生するサイトクローム P450 2E1、アシル CoA オキシダーゼ (AOX)、NADPH オキシダーゼ (NOX) の発現抑制に関連していることが判明した。これが PPC の肝庇護作用の中核であると考えられた。



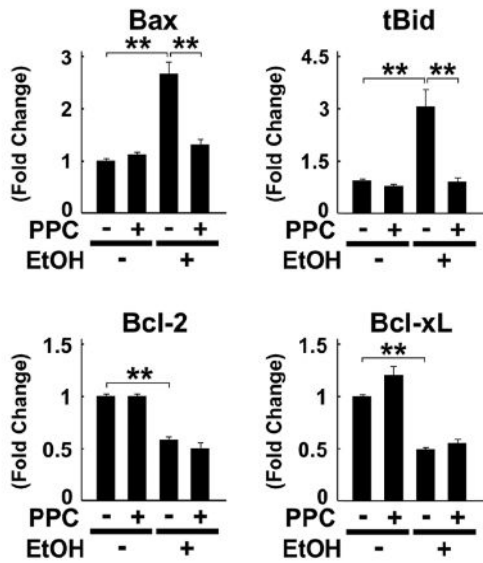
CYP2E1 の発現



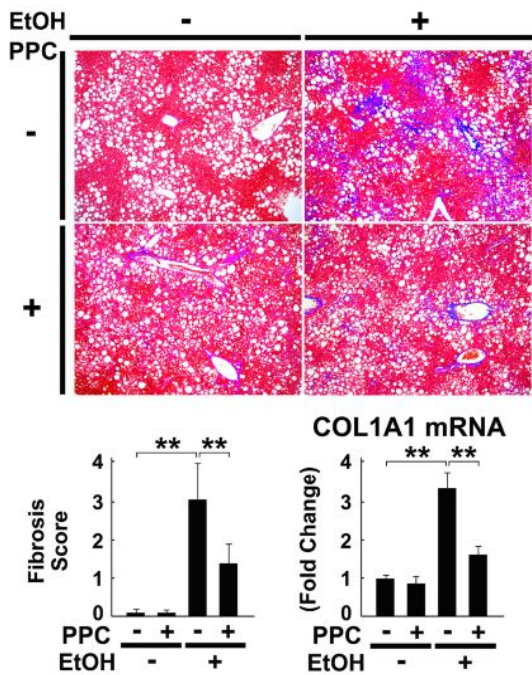
(6) PPC はアポトーシス促進因子である Bax、tBid の発現を抑制することにより、アルコール摂取による肝細胞アポトーシス、caspase 3 の上昇を抑制した。アポトーシス阻害因子である Bcl-2 や Bcl-xL の発現は増加させなかった。



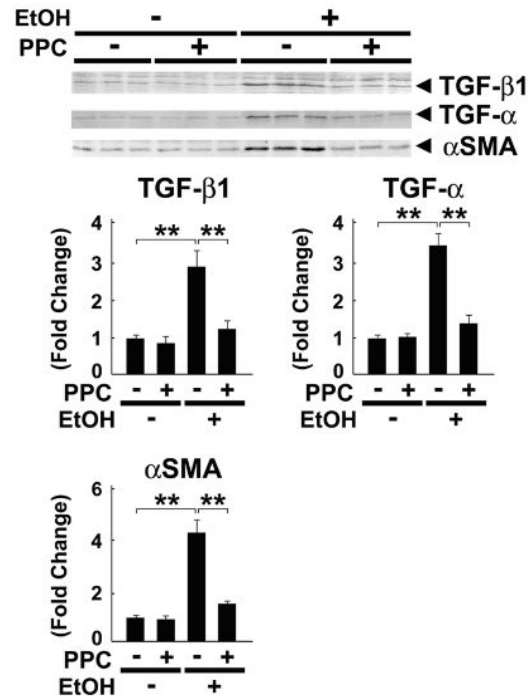
TUNEL 染色 (上段) と caspase 3 活性 TUNEL 染色ではエタノール投与にてアポトーシスに陥った肝細胞の核が茶色に染色されている。



(7) PPCはTGF- β 、 α 平滑筋アクチン(α SMA)の発現を抑制することにより、アルコール摂取による肝線維化、コラーゲン(COL1A1)の発現を抑制した。



上段はAzan-Mallory染色。線維成分が青く染色される。



(8) PPCは酸化ストレス産生酵素(CYP2E1、AOX、NOX)の発現を抑制することにより酸化ストレスを軽減し、抗炎症・抗アポトーシス・抗線維化作用を発揮した。

(9) アルコール性肝障害に対するPPCの効果は今までも報告が散見されるが、その詳細な分子機構は不明であった。本研究では、PPCの抗酸化剤としての分子薬理機構を初めて明らかにすることができた。

(10) PPCの抗酸化作用の分子機構は酸化ストレス産生系酵素の発現亢進の是正であり、既存の抗酸化剤であるビタミンEやS-アデノシルメチオニンのそれとは全く異なっていた。

(11) 現在、PPCは脂肪肝に対する保険適応がある。C型慢性肝炎や非アルコール性脂肪肝炎もアルコール性肝炎と同様、酸化ストレスの関与が報告されている。本研究で得られた結果は、これら酸化ストレスに関連した慢性肝疾患に対するPPCの有用性を示唆するものであり、今後の臨床応用が期待される。

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2件)

- (1) Tanaka N, Okiyama Y, Aoyama T : Polyenephosphatidylcholine prevents alcoholic liver disease in PPARalpha-null mice through attenuation of increases in oxidative stress. 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 2009/Feb/14, Hong Kong
- (2) 田中直樹、小松通治、青山俊文 : アルコール性肝炎に対するポリエンフォスファチジルコリンの有用性. 第12回日本病態栄養学会学術集会、2009年1月11日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 直樹 (TANAKA NAOKI)
信州大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 80419374