

## 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24年 6月 7日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780287

研究課題名（和文） 猫の肝リピドーシスにおける脂肪酸代謝解析と PPARs リガンドによる治療効果の検討

研究課題名（英文） Analysis of fatty acid metabolisms and assessment of therapeutic efficacy of PPARs ligands in feline hepatic lipidosis

研究代表者

西飯 直仁（NISHII NAOHITO）

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：20508478

研究成果の概要（和文）：高脂肪食給餌後の体重減少によって猫の肝リピドーシス（脂肪肝）を実験的に作成し、クリノフィブラート投与の効果調べた。本研究では猫の肝臓における脂肪酸代謝に関わる8分子について塩基配列を明らかにし、遺伝子発現の定量法を確立した。そしてクリノフィブラート投与によって肝臓への脂肪蓄積が増加することが明らかとなった。このことから体重減少中の猫におけるクリノフィブラート投与の危険性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Experimental hepatic lipidosis was induced in cats by rapid weight reduction, and therapeutic efficacy of PPARs ligand was assessed. In this study, base sequences of eight molecules that are involved in fatty acid metabolism were determined, and the quantitative method for their expression was established. Administrations of clinofibrate increased hepatic lipid accumulation. This result warns about the danger of clinofibrate use in weight-reducing cats.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：内科

## 1. 研究開始当初の背景

猫の肝リピドーシスは肝臓への中性脂肪（TG）の沈着を特徴とする疾患であり、猫の臨床において最も重要な疾患のひとつである。肥満の猫における食欲不振で発生することが多く、輸液、強制給餌、アミノ酸補給などの治療を行っても、その死亡率は20～50%

と非常に高い。

肝臓へのTGの蓄積の原因には、肝臓での脂肪酸消費（ $\beta$ 酸化）の低下、超低比重リポ蛋白（VLDL）分泌によるTG輸出の低下、肝臓への脂肪酸の供給過剰などの可能性が挙げられる。肝臓における脂肪酸の $\beta$ 酸化はミ

トコンドリアおよびペルオキシソームで行われ、多くの酵素が関与する。これらの酵素群、特に律速酵素であるカルニチンパルミトイル転移酵素や、ペルオキシソームの $\beta$ 酸化酵素のプロセッシングを行う Tysnd1 の活性低下は肝臓の脂質蓄積を悪化させ、また逆に活性の増加は脂質蓄積を軽減する。肝臓からの TG 輸出に重要である VLDL 合成には、ステアリン酸 CoA 脱飽和酵素などの酵素や VLDL の構成成分であるアポリポ蛋白 B100 (apoB100) が重要な働きをすることが知られている。また肝臓へ流入する脂肪酸は、食餌または脂肪組織由来であるが、肝リポドーシスの発生には食欲不振が関わるため、脂肪組織における脂質分解が重要な病態であると考えられる。しかし肝リポドーシスの猫において、血中リポ蛋白濃度の報告はあるが、肝臓での $\beta$ 酸化、VLDL 合成、肝臓への脂肪酸供給など脂質代謝に関する詳細な研究は行われていない。

## 2. 研究の目的

上記のような脂質代謝の調節に最も重要な因子が PPARs である。PPARs はリガンド依存性の核内受容体型転写因子であり、サブタイプのうち、特に $\alpha$ と $\gamma$ が脂質代謝に重要である。PPAR $\alpha$ は $\beta$ 酸化経路の酵素群の発現を増加させ、 $\beta$ 酸化を亢進する。また申請者の研究で PPAR $\gamma$ は脂肪細胞の分化と脂質蓄積に重要であったことから、脂肪組織の脂質分解と肝臓への脂肪酸の供給に深く関わると考えられる。またこの両者はステアリン酸 CoA 脱飽和酵素発現を調節すると同時に、アディポネクチン分泌を介してインスリン感受性を増加させ、肝臓での VLDL の合成を促進する。齧歯類の PPAR $\alpha$ または PPAR $\gamma$ の欠損により脂肪肝が発生することからわかるように、肝臓の脂肪蓄積の病態には重要な分子である。

人の非アルコール性脂肪肝では、このようなメカニズムに基づき、PPAR $\alpha$ および $\gamma$ に着目した治療法が検討されている。猫は肉食動物であり、コレステロールエステル転送蛋白活性が非常に低いなど、人や齧歯類とは脂質代謝の面で大きく異なるが、猫の肝リポドーシスにおいても PPARs を標的とした治療は検討の価値がある。本研究では猫の肝リポドーシスにおける脂肪酸および TG 代謝の病態について調べるとともに、PPARs を標的とした新規治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Real-time RT-PCR 測定系の確立

$\beta$ 酸化および脂肪酸代謝に関わる分子 (図

2) の mRNA 発現量の Real-time RT-PCR による測定法 1 を確立する。猫の PPAR $\gamma$  (Genbank accession no. EU288191) は申請者によりクローニングされているが、目的の分子のほとんど (12 分子) で塩基配列が不明であるため、他動物種の塩基配列およびネコゲノム配列を利用し、塩基配列を決定する。Real-time RT-PCR では、感度および特異性の問題を解決するために Taqman 法および SYBRgreen 法を適宜検討する。内部標準物質として、GAPDH または $\beta$ アクチンを使用する。

### (2) 臨床例でのサンプリング

鳥取大学附属動物病院および研究協力者 (松田和義、湯木正史、他) の動物病院に来院し、肝リポドーシスと診断された猫において行われた肝生検サンプル (RNAlater およびホルマリン浸漬) を収集するとともに、血清サンプルを冷凍保存する。肝リポドーシスは、臨床症状、肝酵素値の上昇、画像診断に加えて、肝生検材料の組織検査により 80%以上の細胞への脂肪滴蓄積により診断する。

### (3) 肝リポドーシスモデル猫の作成およびサンプリング

高脂肪食自由摂取による体重増加 (理想体重の 130~140%) の後、食事制限により 7~10 週をかけて体重を減少させることで猫に過剰な負担をかけずに異化亢進状態を作成し 3、肝リポドーシスモデルとする。食事制限時の処置により、無処置群、PPAR $\alpha$ リガンド投与群、PPAR $\gamma$ リガンド投与群 (各 6 頭) に分ける。この肝リポドーシスモデルにおいて麻酔下で肝臓の生検サンプル、末梢血および門脈血サンプルを収集、保存する。

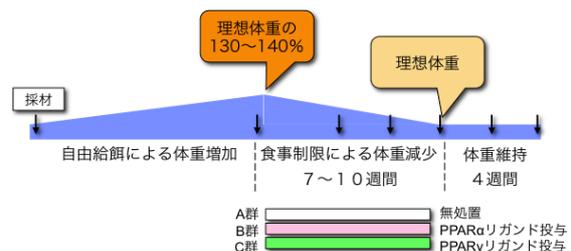


図 1. 体重減少による肝リポドーシス誘導

### (4) $\beta$ 酸化および VLDL 代謝に関わる分子の測定

得られた肝臓サンプルより mRNA を抽出し、Real-time RT-PCR により $\beta$ 酸化および VLDL 合成に関わる分子の mRNA 定量を行う。また肝臓サンプルでは HE 染色による組織の観察

を行う。末梢血および門脈血サンプルを用いて血液生化学試験と脂肪酸およびリポ蛋白の定量を行う。これらの結果について肝リピドーシスモデルと臨床例において比較を行い、肝リピドーシスモデルの有用性について検証する。また肝リピドーシスモデルにおいてPPARsリガンド投与による各パラメータの変化を比較し、治療効果について検討する。肝リピドーシスモデルの作成およびPPARsリガンド投与量、投与間隔の決定については、十分な予備試験を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 猫の $\beta$ 酸化および脂肪酸代謝に関わる分子のうち、8分子(PPAR $\gamma$ 、PPAR $\alpha$ 、ステアリン酸CoA脱飽和酵素1、ミクロソームトリグリセリド転移蛋白、ApoB100、極長鎖アシルCoA脱水素酵素、二機能性酵素、TYSND)の塩基配列についてシーケンスを行い、塩基配列を部分的に決定した。決定された塩基配列に基づいてプライマーを作成し、SYBRgreen法を用いたReal-time PCRによる発現量の解析系を確立した。

8分子のうち、1分子を除いた7分子は、これまでに猫では塩基配列が明らかとなっておらず、全く新規の知見である。これらの塩基配列データおよびReal-time PCRに用いるプライマーなどの情報は、猫の脂質代謝に関する研究を促進しうる成果である。

(2) Zini E.らの報告(Horm Meatb Res, 42, 340-347, 2010)で脂肪製剤の投与によって肝リピドーシスが誘導されたことから、脂肪製剤を投与して肝臓の変化と糖脂質代謝の異常について解析を行った。その結果脂肪製剤投与によってインスリン感受性が有意に低下し、高脂血症や肝リピドーシスと糖代謝異常の深い関連が示唆された。

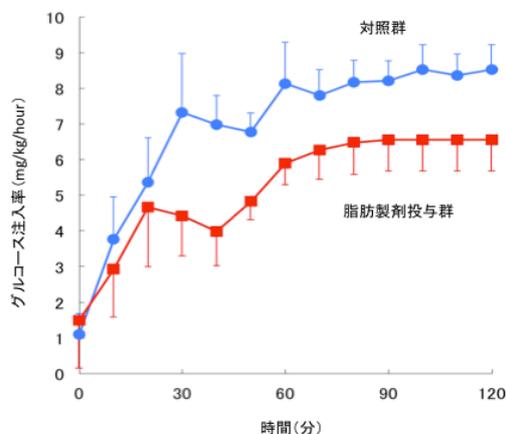


図2. 脂肪製剤投与によるインスリン感受性の低下

(3) 肥満させた猫について10週間の食事制限を行った。高脂肪食の自由給餌により、猫の体重は平均26.2%増加した。その後の食事制限により、猫の体重は7週間で平均21.4%減少した。PPAR $\alpha$ リガンドであるクリノフィブラート投与群と対照群において体重の変化に有意な差はみられなかった。血液検査では黄疸など明らかな肝不全の徴候はみられなかったが、BCAA/チロシン比の低下より肝機能の低下が示唆された。食事制限後の血液生化学検査ではクリノフィブラート投与群は対照群と比較してGPTおよびGOTが有意に高かった。

脂肪肝の誘導効果について調べるため、肝臓のトリグリセリド含有量をTru-cut生検材料を用いて測定した。肝臓からの抽出液は蛋白濃度をBCA法によって測定し、トリグリセリド濃度を蛋白濃度で除して標準化した。肝臓のトリグリセリド含量は対照群では有意な変化がみられなかった。いっぽう、クリノフィブラート投与群では117%の有意な増加がみられた。

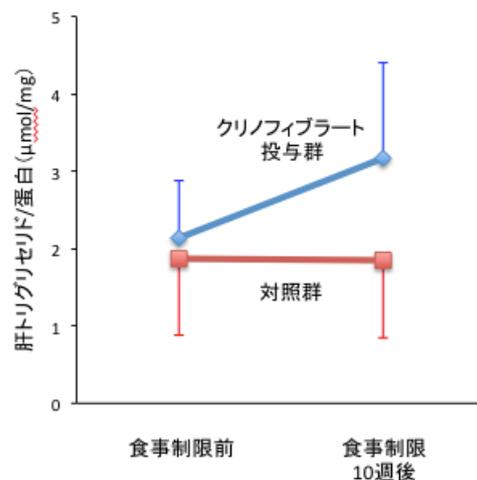


図3. 体重減少による肝トリグリセリド蓄積

本研究で用いた脂肪肝誘導法では対照群で明らかな脂肪肝誘導が得られず、手法として不十分であると考えられた。しかし、クリノフィブラート投与群では同様の方法で明らかな脂肪の蓄積がみとめられたことから、クリノフィブラートには肝臓へのトリグリセリド蓄積作用があることが示唆された。

当初の仮説とは逆の結果となったが、クリノフィブラート投与による脂質代謝の変化について同時に採取した肝臓サンプルを用いて組織学的および分子生物学的に解析中

である。これにより、体重減少中の猫におけるクリノフィブラート投与の危険性とそのメカニズムが明らかとなることが期待される。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Nishii N, Maeda H, Murahata Y, Matsuu A and Hikasa Y. Experimental hyperlipemia induces insulin resistance in cats. J Vet Med Sci. 74, 267-269, 2012, 査読有  
DOI: 10.1292/jvms.11-0266

〔学会発表〕(計1件)

- ① 西飯直仁, 前田晴香, 松鶴彩, 日笠善朗.  
脂肪乳剤がネコのインスリン感受性に与える影響. 第150回獣医学会学術集会、帯広、2010年9月17日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西飯 直仁 (NISHII NAOHITO)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：20508478