

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790178

研究課題名(和文) フィブラート薬物による PPAR 非依存的な中性脂肪低下作用の総括的分子機構解明

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanisms of PPARalpha-independent triglyceride-lowering effects of fibrate drugs

研究代表者

中島 岳郎 (NAKAJIMA, Takero)

信州大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30581011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、フィブラート薬物を脂肪肝状態マウスに臨床用量相当で投与し、肝臓脂質代謝への薬効を調べた。低用量フィブラートは、PPAR 活性化と異なる機構により、肝臓のミトコンドリア 酸化機能を高め、脂肪肝軽減作用を示した。この新たな薬理作用は、酸化蛋白の安定化によるものと考えられ、これにはミトコンドリア蛋白の安定性および機能性に重要な内膜リン脂質：カルジオリピンの増加が関与していると推察された。これらの薬理作用は、従来のげっ歯類試験で問題視されていた肝肥大などの非生理的現象を伴っておらず、当該薬物のヒトにおける薬理作用を理解する上で有用と思われる。

研究成果の概要(英文)：This study examined the effects of clinically relevant low doses of fibrate drugs on hepatic lipid metabolism in mice having diet-induced hepatosteatosis. Low-dose fibrates reduced steatosis through an enhancement of hepatic mitochondrial fatty acid beta-oxidation function, which was not due to known PPARalpha activation. This novel pharmacologic action seemed to be associated with increased protein stability of beta-oxidation enzymes, and this was possibly due to increased contents of cardiolipin, a mitochondria-specific phospholipid important in stability/functionality of mitochondrial proteins. These effects were not accompanied by non-physiological phenomena such as hepatomegaly. Thus, these findings may be useful for better understanding fibrate action in humans.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：脂質代謝 脂肪酸代謝 ミトコンドリア 酸化 臨床用量

1. 研究開始当初の背景

フィブラート系薬物は高中性脂肪血症の代表的治療薬である。近年、ある種の胆汁うっ滞性肝障害や脂肪肝疾患において、本薬物の有用性を示唆する研究報告がなされている。フィブラート薬物の新たな活用が注目されつつある。

フィブラート薬物の薬効の一部は、肝臓での脂肪酸代謝機能の亢進に起因すると考えられる。この薬理作用は、核内受容体：型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)の活性化と、それに伴う脂肪酸異化酵素、特にミトコンドリア酸化系酵素の遺伝子発現レベルでの誘導によるものとされる。この薬理機構は、多くのげっ歯類動物試験により証明されてきた。

しかし、げっ歯類肝臓における PPAR 活性化は、著しいペルオキシソーム増殖や肝細胞増殖を生じ、著明な肝腫大をもたらす。これらの現象は、フィブラート服用患者には一切確認されない。また、細胞や細胞内小器官の増殖には多量のエネルギーや基質が必要であり、細胞内では脂肪酸代謝を含む様々な代謝機能が変動し得る。従って、PPAR が高度に活性化されたげっ歯類肝臓には、複雑かつ非生理的な現象が混在しており、そこからヒトにみられるような薬理作用を理解することは困難である。

2. 研究の目的

過去のほとんどのげっ歯類・フィブラート試験の投薬量は、臨床での使用量に比べて極めて過剰であり、上記の肝毒性の原因と推察される。

本研究では、フィブラート薬物を臨床用量相当でマウスに投与し、肝臓脂質代謝への改善作用を検証した。具体的には、脂肪肝状態マウスに対して、フェノフィブラート・クロフィブラート・ゲムフィブロジル・ベザフィブラートを $2.5 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10$ mg/kg/day の投与量で各々投与し、脂肪肝軽減作用を確認した後、肝臓 PPAR とミトコンドリア酸化への

影響を調べた。これらの試験から、当該薬物に関する生理的に妥当な薬理作用ならびにその作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス飼育とフィブラート投与

12週齢の C57BL/6 オスマウスを高飽和脂肪食(13.5%硬化ヤシ油ベース)で10週間飼育した後、フィブラート投与群4群とコントロール群に群分けした。各フィブラート投与群には、既述の薬物4種を記載の投与量で各々2週間経口投与した。フィブラートは1%メチルセルロース水溶液に懸濁したものを投与液として用いた。コントロール群には1%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。なお、投与期間中も高飽和脂肪食で継続飼育した。投与終了後、血液・肝臓を採取した。

(2) 各種解析

トリグリセリド・遊離脂肪酸・ケトン体含量は、市販の酵素試薬を用いて測定した。肝臓中の脂質は、解析に先立ち、有機溶媒により組織から抽出した。肝臓の遺伝子および蛋白発現変動解析は、それぞれ定量 PCR 法およびイムノプロット法により行った。

4. 研究成果

(1) 低用量フィブラートの脂肪肝軽減作用

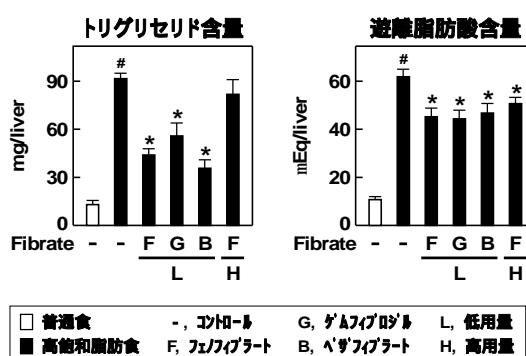


図1: マウス肝臓中のトリグリセリド・遊離脂肪酸含量(平均値±標準誤差)。肝臓全体に対する含量として算出した。#、普通食群に

対する有意差 ($P < 0.05$)。*、高飽和脂肪食コントロール群に対する有意差 ($P < 0.05$)。

本研究では、マウスを高飽和脂肪食で継続飼育し、脂肪肝状態を作製後、低用量フィブラートによる脂肪肝改善作用を検証した。

図1に示したように、高飽和脂肪食飼育により、マウス肝臓には著しいトリグリセリド及び脂肪酸蓄積が生じた。フェノフィブラート・ゲムフィプロジル・ベザフィブラートの低用量投与群では、肝臓内に蓄積したトリグリセリド及び脂肪酸含量は有意に少なく、これら薬物による脂肪肝軽減作用が認められた。また、図示していないが、低用量クロフィブラート投与群にも、ゲムフィプロジル投与群と同程度の脂肪肝軽減作用が確認された。

図1には、従来の高用量フェノフィブラート投与 (25 mg/kg/day) の結果も載せた。高用量群の肝臓トリグリセリド含量は、単位重量あたり (mg/g liver tissue) では激しく減少していたが、肝臓全体で換算するとほとんど減少していなかった。これは高用量投与により著しい肝臓肥大が生じたためであった。一方、低用量投与では、いずれの薬物においても肝臓肥大は生じておらず、生理的環境下で肝臓脂質代謝を改善したと考えられた。

以上の結果を踏まえ、低用量フィブラートによる脂肪肝軽減作用の薬理機序の詳細を調べるため、マウス肝臓を用いて PPAR とミトコンドリア酸化への影響を調べた。

(2) PPAR 活性化への影響

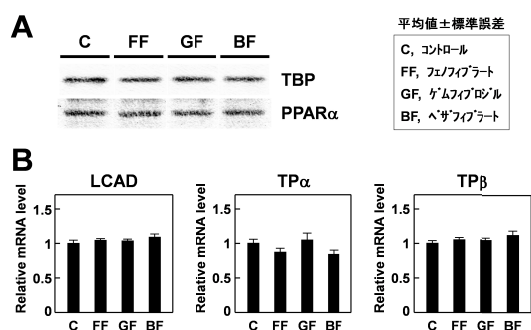


図2：肝臓の PPAR 核内蛋白量 (A) と PPAR

標的遺伝子の mRNA 発現量 (B)。

PPAR 活性化が生じると、PPAR の核内蛋白量は増え、標的遺伝子の mRNA 発現量は顕著に増加する。

図2Aに示したように、低用量フィブラート群の肝臓には、PPAR の核内蛋白量の増加は確認されなかった。また、図2Bに示した分子は PPAR の代表的な標的遺伝子であるが、同マウス群ではそれらの mRNA 量の増加も認められなかった。また、図示していないが、低用量クロフィブラート投与の場合も、同様の結果が得られた。以上から、低用量フィブラートによる脂肪肝軽減作用には、肝臓 PPAR の活性化は寄与していないと考えられた。

(3) ミトコンドリア酸化への影響

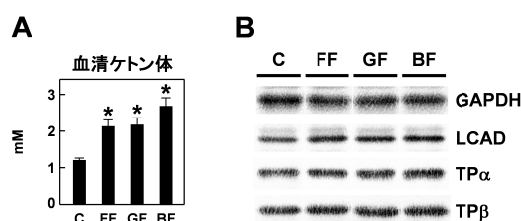


図3：血清ケトン体濃度 (A) と肝臓ミトコンドリア酸化酵素の蛋白発現量 (B)。データ表示は図2を参照。*、コントロール群に対する有意差 ($P < 0.05$)。

ケトン体は肝臓のミトコンドリア酸化により生じ、血中を介して肝外組織へ運ばれ利用される。従って、血中ケトン体量の増加は、肝臓におけるミトコンドリア酸化機能の亢進を反映する。

低用量フィブラート群の血清を用いてケトン体：ヒドロキシ酪酸の濃度を測定したところ、顕著に増加していた (図3A)。続いて、これらのマウスの肝臓におけるミトコンドリア酸化酵素の蛋白レベルの発現量を調べた。図3Bに示したように、主要酵素である長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (LCAD) および三頭酵素 (TP および) の蛋白量は、低用量フ

ィブラート投与群で増加していた。この現象は、図2の結果から、遺伝子発現レベルの誘導によるものではないと考えられた。同様の蛋白レベルの増加は、極長鎖および中鎖アシル CoA 脱水素酵素においても観察された。以上から、低用量フィブラート投与群の肝臓では、ミトコンドリア 酸化を担う多くの酵素の蛋白量が増加しており、これにより 酸化機能が亢進し、脂肪肝軽減に至ったと推察された。

一方、低用量クロフィブラート投与群には、肝臓のミトコンドリア 酸化亢進を示唆する変化はみられなかった。これは、本薬物が他3種と異なる機構により、肝臓の脂質代謝改善に作用したことを示唆している。本研究では、このクロフィブラート特異的な薬理作用の機構解明には至らなかった。

(4) ミトコンドリア特異的機能への影響

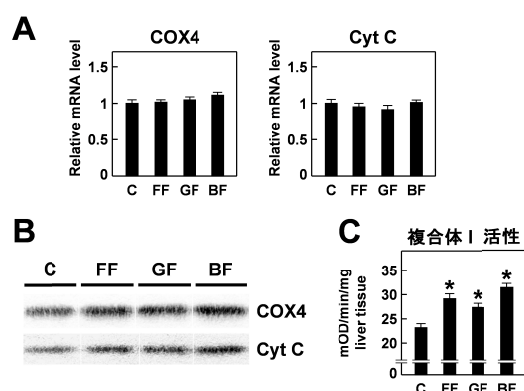


図4：ミトコンドリア呼吸鎖成分。データ表示は図2を参照。*、コントロール群に対する有意差 ($P < 0.05$)。

低用量フィブラートによる肝臓ミトコンドリア機能への影響をさらに調べた。呼吸鎖成分であるシトクロム c (Cyt C) ならびにシトクロム c オキシダーゼ (COX4) に関して、mRNA および蛋白発現レベルの解析を行った。その結果、低用量フィブラート群では、これらの蛋白が mRNA 発現誘導を伴わずに増加していることが判明した (図4A, B)。加えて、呼吸鎖複合体 I 活性の増加も確認された (図

4C)。以上から、低用量フィブラート群の肝臓では、酸化に加え呼吸鎖の機能も高まった状態にあることが分かった。

一方、ミトコンドリアバイオジェネシスを示す変化 (PGC-1 \cdot ミトコンドリア転写因子 A \cdot ミトコンドリア遺伝子産物の mRNA 発現量の増加、および、ミトコンドリア DNA 量の増加) は、低用量フィブラート群の肝臓には認められなかった。従って、酸化酵素ならびに呼吸鎖成分の蛋白レベルの増加は、それら蛋白の安定化に起因する可能性が考えられた。

(5) ミトコンドリア特異的リン脂質への影響

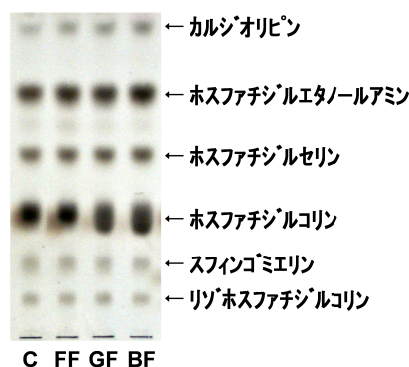


図5：肝臓リン脂質の薄層クロマトグラフィー分析。

低用量フィブラートの脂肪肝軽減作用に関する新規の情報を得るため、マウス肝臓中に含まれる脂質の組成を調べた。リン脂質に対する薄層クロマトグラフィー分析を行ったところ、低用量フィブラート群において、ミトコンドリア内膜に特異的に存在するカルジオリピンの含量が増加していることが分かった。本リン脂質は、呼吸鎖成分など、ミトコンドリア内膜性蛋白の安定化および機能発現において、重要な役割を担うことが報告されている。従って、このカルジオリピン含量の増加は、低用量フィブラート群に生じたミトコンドリア蛋白量の遺伝子発現誘導に依らない増加をサポートする有用な結果と思われる。

(6) 総括

本研究では、脂肪肝状態マウスを用いて、フィブラート薬物の臨床用量投与下における肝臓脂質代謝への薬効を調べた。その結果、以下の結論を得た。

フェノフィブラート・ゲムフィブロジル・ベザフィブラートは、肝臓のミトコンドリア酸化機能を高めることにより、脂肪肝軽減作用を示した。

この薬理作用は、酸化蛋白の安定化に起因すると推察された。従来のPPAR活性化を介する作用とは異なっていた。

酸化蛋白の安定化には、ミトコンドリア内膜リン脂質：カルジオリピンの量的増加が関与していると考えられた。

クロフィブラートは、上記およびPPAR活性化と異なる作用機序により、脂肪肝軽減作用を示した。

カルジオリピンによる酸化酵素の安定化を証明した研究報告はないが、多くのミトコンドリア内膜結合型蛋白（呼吸鎖成分など）は本脂質の存在下で安定化され、機能的に活性化されることが示されている。酸化酵素のうち数種（極長鎖アシル CoA 脱水素酵素、TP など）は内膜性である。また、一連の酸化反応は、巨大な酵素複合体中で連続的に起こる。加えて、酸化反応で生じた還元当量は速やかに呼吸鎖に運ばれ利用される必要があるため、反応系は呼吸鎖システムと位置的に近くなければならない。これらを総合すると、酸化酵素の巨大複合体は、ミトコンドリア内膜に接した形で機能すると想像され、カルジオリピンとの相互作用が期待される。この点に関しては、カルジオリピン量が増加する分子機序と共に、さらなる調査が必要と考えている。

今回新たに見出したフィブラートの薬理作用は、従来研究で問題とされていた肝肥大などの肝毒性を伴っておらず、生理的に妥当な生体環境において観察された現象といえる。従って、本研究成果は、当該薬物のヒトにおける薬理作用をより良く理解するために有用

と思われる。本研究成果が、脂質代謝異常を伴う肝臓疾患あるいはその他の疾患に対する新たな薬物療法の開発に役立つものとなれば幸いである。現在、この新規薬理作用に関する研究論文の執筆を進めている。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中 篤 岳 郎 （NAKAJIMA, Takero）

信州大学・医学系研究科・助教

研究者番号： 30581011