

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700776

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝発症における PEX11a l p h a 遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Clarify the role of the Pex11a gene in nonalcoholic fatty liver

研究代表者

翁 華春 (WENG, Huachun)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：80598053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：Pex11a遺伝子は脂肪酸代謝を行う細胞内の小器官であるペルオキシソームの増殖に関与することが知られている。本研究では、Pex11a欠損マウスを用いて、Pex11a遺伝子の機能を解析した。欠損マウスは肥満や脂肪肝になりやすく、その背景には肝臓のペルオキシソームの減少、脂肪酸代謝関連遺伝子の発現の低下、小さくて丸い、機能を持たないペルオキシソームの増加がある。フェノフィブレードの投与により、ペルオキシソームの数及び代謝関連遺伝子が増加し、体重が減少した。以上の結果から、Pex11a遺伝子はペルオキシソーム増殖及び脂肪酸代謝に関与し、肥満や脂肪肝の治療ターゲットとなる可能性があると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peroxisomes have many important functions in lipid metabolism, including fatty acid beta-oxidation. Pex11a is a Pex gene factor required for peroxisome biogenesis. To examine the functions of the Pex11a gene, we disrupted this gene in mice. Pex11a knock out (KO) mice showed significantly higher body weights and hepatic triglyceride (TG) concentrations than wild type (WT) mice fed a normal diet or a high-fat diet. Hepatic TG in fasted KO mice was significantly higher than those in fasted WT mice. KO mice exhibited fewer irregular and functional peroxisomes than WT mice. Fenofibrate increased peroxisome abundance and decreased body weight. mRNA levels of peroxisomal fatty acid oxidation-related genes were significantly higher in WT mice than KO mice. Our results demonstrated that Pex11a is involved in peroxisome proliferation and fatty acid beta-oxidation, and activation of Pex11a and/or the peroxisomes might be an excellent therapeutic strategy against non-alcohol fatty liver.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：ペルオキシソーム 脂肪肝 脂肪酸 代謝 肝臓

1. 研究開始当初の背景

肥満及び脂肪肝は日本だけではなく世界的な問題となっている。近年、非アルコール性脂肪肝の原因の解明が注目されている。76%の肥満患者は非アルコール性脂肪肝であることが報告されている。カロリー摂取量がPPAR α 経路の脂肪酸代謝能力を超え、肝臓に大量の脂肪が蓄積することが原因の一つだと考えられる。脂肪酸の代謝において、ミトコンドリアが注目されている。一方、脂肪酸の β 酸化に関与するペルオキシソームの代謝機能の研究は比較的少ない状態である。ペルオキシソームの増殖及び代謝酵素の欠損は様々な難病と関連することが知られている。そこで、本研究はペルオキシソームの増殖に関与する *Pex11a* 遺伝子の機能を解析し、肥満や脂肪肝の発症のメカニズムの解明及びその治療法の探索を検討した。

2. 研究の目的

Pex11a 遺伝子はペルオキシソームの増殖及び脂肪酸代謝に関与するか、*Pex11a* 欠損により肥満や脂肪肝になりやすいか、*Pex11a* 遺伝子あるいはペルオキシソームは肥満や脂肪肝の治療ターゲットになりうるかについて調べることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究室で作製された *Pex11a* 欠損マウスを用いて研究を行った。

(1) 欠損マウスは肥満・脂肪肝になりやすいかの解明

欠損マウスと対照の野生型マウスに普通食と高脂肪食を12週間摂取させた。週1回体重を測定し、12週間後、血液・肝臓サンプルを採取した。また、絶食実験を行い、絶食24時

間後の血液・肝臓サンプルを採取した。血清中の遊離脂肪酸、トリグリセライド及び β -ヒドロキシ酸及び肝臓中のトリグリセライドの濃度を測定した。また、肝臓をOil Red O染色した。

(2) インスリン抵抗性

絶食6、12、24および48時間の血糖値を測定し、糖負荷試験を行った。

(3) 超低密度リポタンパク質産出試験

欠損マウスと野生型マウスを16時間絶食し、500 mg/kg のチロキサポール(リポ蛋白リパーゼ抑制剤)を腹内投与した後1、2、4時間の時点で採血した。血中のトリグリセライドの濃度を測定した。

(4) 肝臓のペルオキシソームの数及び形態の評価

ペルオキシソームの膜蛋白70 (PMP70) 及びペルオキシソームの基質タンパクであるカタラーゼを用いて蛍光免疫染色及び免疫電子染色が行い、ペルオキシソームの数及び形態を評価した。

(5) ペルオキシソームの機能の評価

密度勾配遠心法を用いて、ペルオキシソームを分離し、Western blot法によりペルオキシソームのPMP70及びカタラーゼ蛋白発現量を測定した。

(6) ペルオキシソームの脂肪酸代謝関連酵素遺伝子の発現

リアルタイムRT-PCRを用いて、ペルオキシソームの脂肪酸代謝関連酵素遺伝子(ABCD2、ACOT3及びACOX1等)の発現量を調べた。

(7) フェノフィブレート(ペルオキシソーム生成促進物質)の投与効果

フェノフィブレートの投与を行い、体重やペルオキシソームの脂肪酸代謝関連酵素の発現及びペルオキシソームの数を測定した。

4. 研究成果

(1) Pex11a 欠損マウスは肥満や脂肪肝になりやすい

普通食や高脂肪食の摂取後、欠損マウスの体重は野生型マウスより有意に重かった (図 1)。

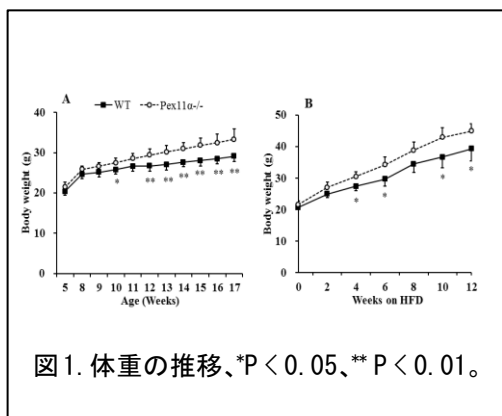


図 1. 体重の推移、*P < 0.05, ** P < 0.01。

欠損マウスの血清中のトリグリセライド濃度は野生型マウスと差が認められなかったが、普通食、高脂肪食、絶食のいずれにおいても、欠損マウスの肝臓中のトリグリセライド濃度は野生型マウスより有意に高いことが分かった (図 2A と 2B)。

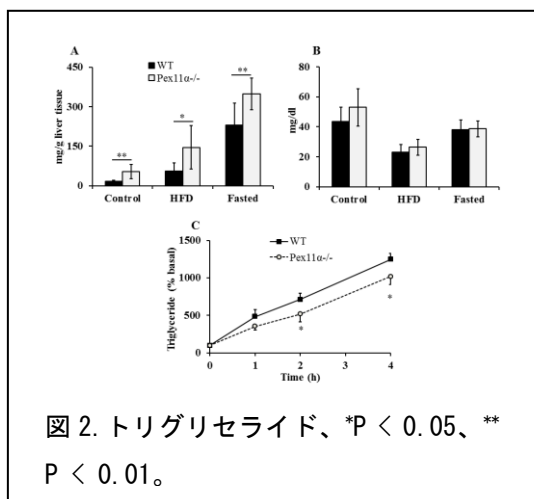


図 2. トリグリセライド、*P < 0.05, ** P < 0.01。

Oil Red O 染色により、絶食あるいは高脂肪食投与後、欠損マウスの肝臓に中性脂肪が蓄積しやすいことが分かった (図 3)。野生型マ

ウスと比較して、欠損マウスにおいて、絶食 12 時間後の血清中 β -ヒドロキシ酸濃度は低く、絶食 24 時間後の遊離脂肪酸濃度は高いことが分かった。

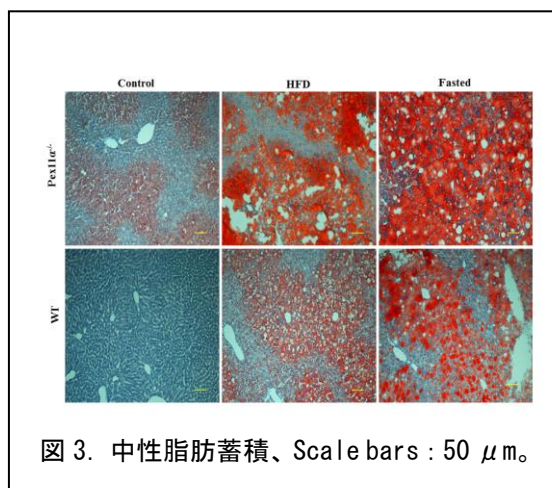


図 3. 中性脂肪蓄積、Scale bars : 50 μ m。

(2) 肝臓からトリグリセライドの分泌能の評価

チロキサポール投与後 2 および 4 時間では、欠損マウスの血漿中のトリグリセライド濃度は野生型マウスより有意に低かった。即ち、欠損マウスの肝臓から超低密度リポタンパク質 (トリグリセライドを含んでいる) の排出能は低下し (図 2C)、脂肪肝になる原因の一つと考えられる。

(3) インスリン抵抗性の評価

絶食 6、12、24 および 48 時間後や糖負荷後の血糖値は、野生型マウスと欠損マウスの間に差が認められなかった。

(4) ペルオキシソームの数や形態の評価

PMP70 とカタラーゼの 2 重蛍光染色により、欠損マウスでは、未熟なペルオキシソーム (膜蛋白の PMP70 を含んでいるが、基質蛋白のカタラーゼを含んでいない空のペルオキシソーム) が多いことが明らかになった (図 4)。また、PMP70 の免疫電顕の解析により、欠損マウスでは、小さい、真ん丸いペルオキシソ

ムが多いことが分かった。以上の結果から、Pex11a 欠損により、ペルオキシソームの伸長が障害され、増殖能は低下し、代償的に小胞体由来のペルオキシソームが増加することが示唆された (図 5)。

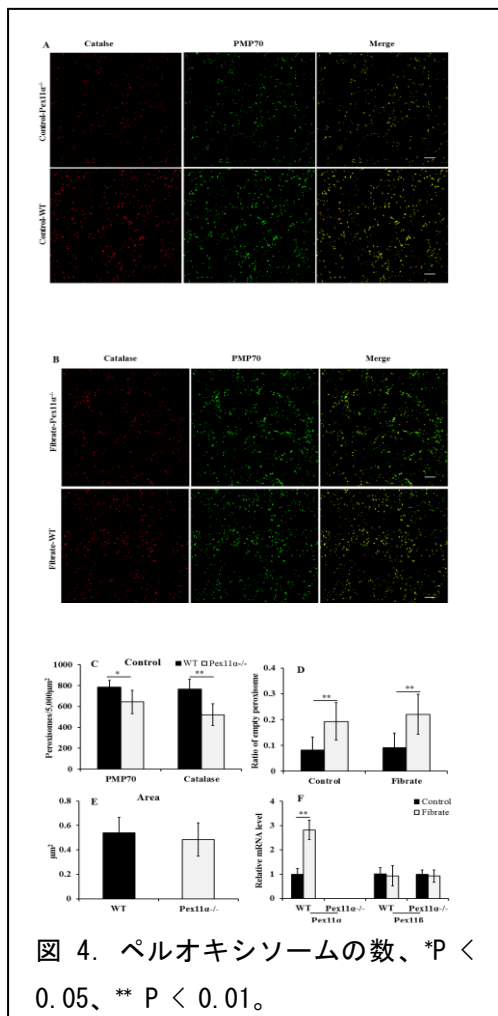


図 4. ペルオキシソームの数、*P < 0.05、** P < 0.01。

(5) ペルオキシソームの機能の評価

分離したペルオキシソームの蛋白量の分析により、欠損マウスのカターゼ/PMP70 の比率は野生型マウスより低かった。この結果は組織学的観察で認められた欠損マウスの未熟な空のペルオキシソームが多いことと一致した (図 6)。

(6) ペルオキシソームの脂肪酸代謝関連酵素の発現量

コントロール状態では、ACOX1 の発現は欠損マウスが野生型マウスとの差が認められなかったが、欠損マウスの ABCD2 と ACOT3 の発現が野生型マウスより有意に低かった (図 7)。

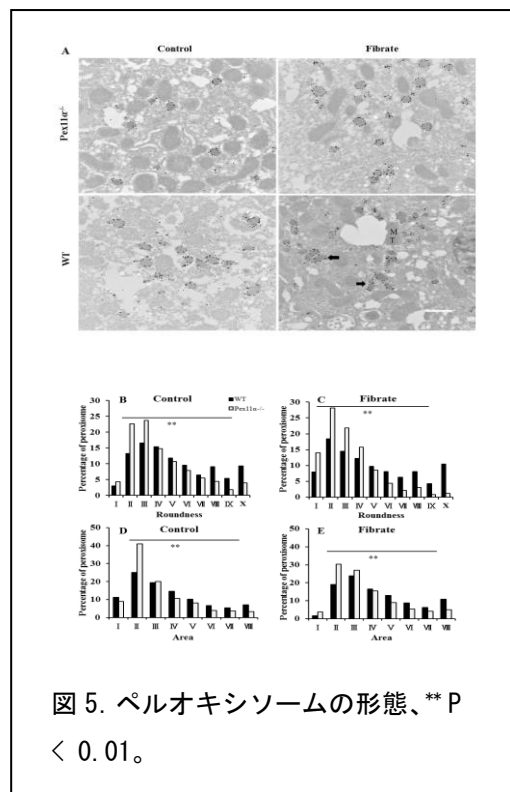


図 5. ペルオキシソームの形態、** P < 0.01。

(7) フェノフィブレードの効果

フェノフィブレード投与により、欠損マウスは野生型マウスとともに体重増加が抑制され、ペルオキシソームの数及び脂肪酸代謝関連酵素が増加した。

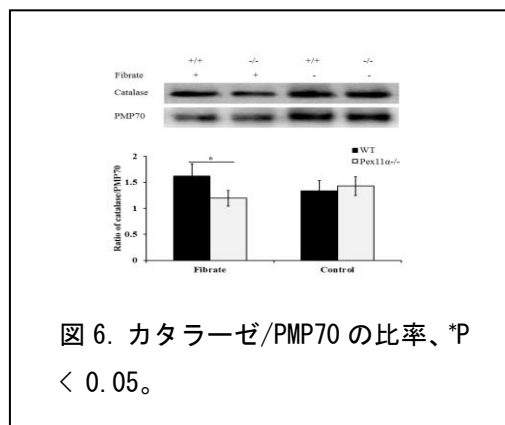


図 6. カターゼ/PMP70 の比率、*P < 0.05。

(8) まとめ

Pex11a 欠損により、ペルオキシソームの増殖伸長が障害し、ペルオキシソームの数は減少することが分かった。小胞体から代償的にペルオキシソームが増加したが、小胞体由来のペルオキシソームは成熟ペルオキシソームになるまで時間がかかるので、機能を持たないペルオキシソームが多くなった。従って、欠損マウスの肝臓の脂肪酸代謝機能が弱くなり、脂肪蓄積が誘導されやく脂肪肝になると考えられる。また、Pex11a 及びペルオキシソームをターゲットとした、肥満や脂肪肝に対する新規候補薬となる可能性が示唆された。

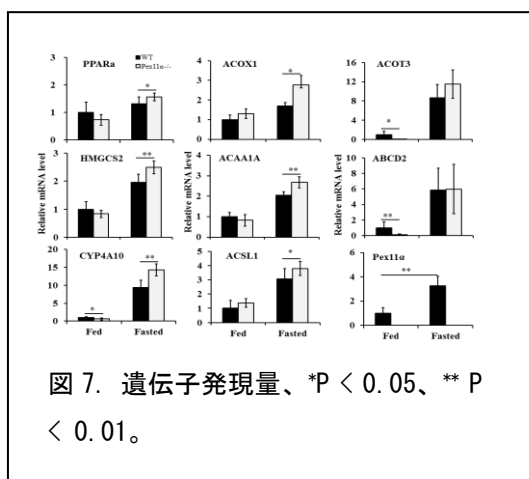


図 7. 遺伝子発現量、*P < 0.05、** P < 0.01。

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 Weng H, Ji X, Naito Y, Endo K, Ma X, Takahashi R, Shen C, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Pex11a deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to non-alcohol fatty liver in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 304(2): E187-96. 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

① 翁華春、内藤 由紀子、岩井 直温 Pex11a deficiency impairs energy expenditure and contributes to obesity 第 78 回日本循環器学会（東京）2014 年 3 月

② 翁華春、紀 旭、遠藤 恒介、内藤 由紀子、岩井 直温 A new mouse model for obesity and steatosis 第 37 回国際生理学会（イギリス）2013 年 7 月

③ 翁華春、紀 旭、遠藤 恒介、内藤 由紀子、岩井 直温 Pex11a deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to non-alcohol fatty liver in mice 第 77 回日本循環器学会（横浜）2013 年 3 月

④ 翁華春、紀 旭、遠藤 恒介、内藤 由紀子、岩井 直温 Pex11a deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to non-alcohol fatty liver in mice 第 35 回日本分子生物学会（福岡）2012 年 12 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

翁華春 (WENG Huachun)

国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：80598053

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし