

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	井上充貴
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Increased expression of PPARγ in high fat diet-induced liver steatosis in mice (高脂肪食誘導マウス脂肪肝における PPARγ の発現に関する研究)</p> <p>Takaaki Ohtake, Wataru Motomura, Nobuhiko Takahashi, Yayoi Hosoki, Shigeki Miyoshi, Yasuaki Suzuki, Hiroyuki Saito, Yutaka Kohgo, Toshikatsu Okumura と共著</p> <p>Biochem Biophys Res Commun. 336(2005)215-222</p> <p>研 究 目 的</p> <p>ペルオキシソーム増殖活性化受容体γ (PPARγ) は、レチノイド X 受容体と複合体を形成するリガンド活性化転写因子で、主に脂肪組織に発現するが、肝臓を含め他の組織でも少なからず発現している。PPARγ は、脂質代謝に重要で、糖代謝、炎症反応、血管新生、癌細胞増殖などに関与していることが報告されている。肥満・糖尿病モデルマウス ob/ob、A-ZIP、aP2/DTA などでは脂肪肝を発症するが、これら脂肪肝では PPARγ の発現が亢進し、ob/ob マウスで PPARγ を肝臓特異的に破壊すると脂肪肝が改善することが示され、PPARγ が肝脂質蓄積と密接な関連があることが明らかとなった。一般的に脂肪肝は肥満と糖尿病患者に見られ、高脂肪食は両者発症の重要な因子である。しかし、高脂肪食が肝臓の PPARγ 発現を誘導し、肝臓に脂質を蓄積させるか否かについては明らかではない。本研究では、マウスに高脂肪食を负荷した脂肪肝モデルを作成して、肝細胞内脂肪蓄積における PPARγ 発現の意義とその調節機構を明らかにすることを目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1.動物

9週齢の雄性 C57Bl/6Ncrj マウスに、脂質として 82.0%のカロリーを含む高脂肪食または 13.2%のカロリーを含む通常食を自由摂取、脂肪負荷後 2、4、6、12 週後に屠殺、体重測定後、心臓穿刺による採血し、肝臓と精巣上体の脂肪を採取、重量を測定した。

2.生化学的分析

血糖値、総コレステロール、HDL、LDL、トリグリセリド、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) などを測定した。

3. 病理学的評価

肝組織はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色及び凍結切片の Oil Red O 染色で検討した。

4.免疫組織染色

PPAR γ と cAMP response element-binding protein (CREB) の免疫組織染色は ABC 法で行った。

5.マイクロアレイ

高脂肪食 4 週の肝組織 RNA から cDNA を合成、それを鋳型としてビオチン標識 cRNA を作成、Panorama Mouse Micro Array (シグマ・アルドリッチジャパン) にハイブリダイズした。反応 cRNA の蛍光を ScanArray Lite でスキャン、DNASIS Array で分析した。

6.リアルタイム PCR

肝組織 RNA から 1 μ g の cDNA を作成。PPAR γ 、CD36 は SYBR Green を使用し LightCycler システム(Roche Molecular Biochemicals)で検出した。

7.ウェスタンブロット解析

10% SDS-PAGE で分離、PVDF 膜に転写後、抗ヒト CREB ポリクローナル抗体(Cell Signaling Technology)、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG と反応後、ECL 法で検出した。

成 績

1.高脂肪食による肥満および脂肪肝の誘導

高脂肪食を負荷したマウスでは体重、脂質重量、肝重量が負荷期間依存的に増加し、高脂肪食負荷 12 週後の肝臓は肉眼的に脂肪肝を呈した。肝組織の Oil red 染色では、高脂肪食負荷後 2 週で、肝細胞内にトリグリセリドの蓄積を認め、脂肪滴の割合はその後、負荷期間依存的に増加した。生化学的分析では、高脂肪食を負荷したマウスで血清総コレステロールが 2 週間後で有意に高かった。一方、4 週間の時点で血清トリグリセリド、空腹時血糖値はいずれの群でも差がなかった。高脂肪食群では 12 週間後に空腹時血糖値の上昇が観察された。

2. 肝臓の遺伝子プロファイリング

高脂肪食負荷 4 週間の肝臓から単離した RNA を用い、全転写プロファイリングを行った。遺伝子発現亢進または低下のカットオフレベルを 2 倍としたとき、高脂肪群では 639 遺伝子が亢進、1407 遺伝子が低下した。その中で脂質代謝関連遺伝子に注目すると、脂肪酸酸化に関与する PPAR α 、アシル CoA シンターゼ、CPT-1、UCP-2 など、脂肪酸合成に関与する SREBP-1、脂肪酸シンターゼ、GPAT などの遺伝子に有意な発現変化は認められなかった。一方、PPAR γ 、CD36、脂肪酸結合タンパク質などの mRNA は増加し、これらは脂肪生成関連遺伝子であった。

3. 肝臓の PPAR γ mRNA とタンパク質の発現

マイクロアレイ解析で増加した PPAR γ と CD36 mRNA 発現の経時的変化をリアルタイム PCR で検討した。両者とも高脂肪食群で 2 週間から亢進し時間依存的に上昇した。12 週間高脂肪食を負荷したマウスの肝組織では肝細胞核に PPAR γ が同定された。

4. 肝臓における CREB タンパク質発現

PPAR γ の発現を制御する上流分子とされる CREB タンパク質発現をウエスタンブロットで検討すると、4 週間の高脂肪食で発現が抑制された。免疫組織染色でも、2 週間および 4 週間の時点で CREB の免疫反応性が時間依存的に弱くなっていた。

考 案

高脂肪食は脂肪肝発症の重要な因子であることが知られている。近年、PPAR γ が脂肪肝の病態生理において重要な役割を果たしていることが明らかになったが、PPAR γ が高脂肪食による脂肪肝形成のプロセスにどのように関与しているかは明らかではない。これまで使用されたマウスの脂肪肝のモデルでは、脂肪肝だけではなく肥満と糖尿病を同時に発症しているため、肥満と糖尿病の効果を除外することが難しかった。本研究で、まず、高脂肪食が肝臓の脂質蓄積を誘導する動物モデルを確立した。本モデルは、肥満と糖尿病が発症する前に脂肪肝が誘導され、高脂肪食で誘導される脂肪肝の最初の段階を解析する良いモデルになると考えられた。

次に、高脂肪食がマウスで脂肪肝を誘導するメカニズムについて、DNA チップを利用して遺伝子発現プロファイリングを分析した。脂質代謝関連遺伝子のうち、PPAR γ や CD36 などの脂肪生成関連遺伝子は亢進されるが、脂肪酸の酸化・合成に関与する遺伝子は高脂肪食で制御を受けなかった。これらの結果は、脂肪酸の酸化・合成よりも、脂肪生成が高脂肪食誘導性脂肪肝に重要な役割を果たしている可能性を示している。さらに、高脂肪食は早期に PPAR γ と CD36 の発現を亢進させた。PPAR γ タンパク質の発現は肝細胞核に同定されるとともに、PPAR γ の下流標的遺伝子である CD36 の遺伝子発現も亢進させ、PPAR γ の亢進が機能的に重要

であることが示された。

最後に、肝臓で PPAR γ の発現が亢進される上流のメカニズムを解明した。CREB は糖新生に関与する転写因子で、Herzig らは dominant negative CREB 発現アデノウイルスベクターを用い、CREB が PPAR γ を介して肝臓の脂質代謝をコントロールしているという仮説を立てている。我々の検討では、肝 CREB の低下は高脂肪食後 2 週間ですでに観察され、高脂肪食による肝臓の CREB の抑制が肝細胞 PPAR γ の亢進に関与していることが示唆された。

結 論

高脂肪食による新規マウス脂肪肝モデルを確立した。このモデルを用いて高脂肪食により肝臓の CREB 抑制を介した PPAR γ の亢進が脂肪肝の形成に重要であると考えた。

引 用 文 献

[1] Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture, *Cell* 84: 377-389, 1996.

[2] Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 60:5558-64, 2000.

[3] Herzig S, Hedrick S, Morante I, Koo SH, Galimi F, Montminy M. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma, *Nature.* 426:190-193, 2003.

参考文献

[1] Suzuki Y, Fujimoto Y, Hosoki Y, Suzuki M, Inoue M, Sakurai S, Ohtake T, Ohhira M, Saito H, Kohgo Y. Usefulness of contrast-enhanced wide-band Doppler ultrasonography to diagnose alveolar echinococcosis of the liver and evaluate the effect of the treatment. *Eur J Radiol.* 48:305-11, 2003.

[2] Inoue M, Ohhira M, Ohtake T, Matsumoto A, Kawashima T, Fujimoto Y, Hasebe C, Ono M, Kohgo Y. Hepatocellular carcinoma developed in a patient with chronic hepatitis C after the disappearance of hepatitis C virus due to interferon therapy. *Hepato-Gastroenterology.* 46:2554-60, 1999.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	井上 充貴
<p>審査委員長 羽 田 勝 計 ㊞</p> <p>審査委員 高 後 裕 ㊞</p> <p>審査委員 奥 村 利 勝 ㊞</p> <p>審査委員 谷 口 隆 信 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Increased expression of PPARγ in high fat diet-induced liver steatosis in mice (高脂肪食誘導マウス脂肪肝における PPARγの発現に関する研究)</p> <p>脂肪肝を発症する遺伝子改変・変異マウスでは、脂肪肝発症に肝組織の核内転写因子 PPARγ発現亢進が関与している可能性が指摘されている。論文申請者である井上氏は、高脂肪食摂取による脂肪肝モデルマウスを作成し、脂肪肝発症機序を検討した。</p> <p>研究結果として、まず、高脂肪食で飼育したマウスにおいて、2週目から肝の脂肪蓄積を認めると共に、肝より抽出したRNAのマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行い、発現が亢進している遺伝子として、PPARγ、およびその標的遺伝子の一つであるCD36に着目した。リアルタイムPCR法においてもPPARγ、CD36 mRNAの発現が高脂肪食摂取2週目より亢進すること、肉眼的にも脂肪肝を呈した12週間後の免疫組織化学的検討でも、PPARγ発現が肝細胞の核で増強していることを見出した。さらに、PPARγの発現抑制因子と考えられているCREBの発現が、高脂肪食によって抑制されていることも確認している。以上の成績から、高脂肪食負荷による脂肪肝の発症に、CREB-PPARγシグナリング経路が関与していることが示唆された。</p> <p>本研究は、遺伝子改変モデルマウスではなく、通常のマウスを用いた脂肪肝発症モデルにおける検討であり、今後の治療戦略を立案する上でも重要な研究であると考えられる。</p> <p>尚、諮問審査においても、本論文とその関連領域に関して十分な知識を有することが確認できた。よって、本論文を、医学博士の学位論文に値するものと判断した。</p>			