



Title	Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model
Author(s)	新堂, 修康
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54183
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	新 堂 修 康
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 6 3 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model (Microsomal triglyceride輸送蛋白の非アルコール性脂肪肝炎への関与：新たな自然発症モデルにおける検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 楽 木 宏 実 (副査) 教 授 林 紀 夫 教 授 下 村 伊 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

近年増加している非アルコール性脂肪肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis: NASH)は進行性であり、肝細胞癌を発症しうる。その動物モデルとしてこれまで環境因子によるものと遺伝子改変モデルが検討されてきたが、自然発症モデル動物が存在せずNASHへの進展機序を含めた病態解明が進まないことが問題であった。

我々は近交系脂肪肝モデル動物Fatty Liver Shionogi (FLS)マウスに注目し、本動物が耐糖能障害・インスリン抵抗性を示すことを見出ししてきた。本研究においてはFLSマウスのNASH自然発症モデルとしての評価とその分子メカニズムの検討、さらに重要と推察された分子をベクターにて導入し肝病変・耐糖能異常への関与の検討を行った。

〔 方 法 〕

雄性FLSおよびC57BL/6(B6)マウスを対象とし、BMI、肝重量、肝内トリグリセライド(TG)量を測定、血清生化学検査(AST, ALT, γ -GTP, TNF- α)および肝の組織学的検討を行った。肝からの脂質放出能について、LPL阻害剤を投与後の血清TG濃度変化とその際の血清リポ蛋白プロファイルを高速度液体クロマトグラフィー(HPLC)によって解析することで評価した。肝臓の遺伝子発現について、脂質代謝・炎症・線維化・インスリン抵抗性に関わる遺伝子群をRT-PCR法にて解析した。遺伝子発現低下が著明であったmicrosomal triglyceride transfer protein (MTP)については蛋白発現についてもWestern blot法にて検討した。

さらにpcDNA3.1/CT-GFP-TOPOベクターを用いてMTP発現ベクター(以下MTPベクター)とコントロールベクターを作成し、28週齢FLSマウス(各5匹)に対して、毎週1回4週間にわたりhydrodynamics-based transfection法にて投与し、発現誘導を行った。その後、肝の組織学的検討、脂質放出能の評価、遺伝子発現解析、さらに耐糖能評価、HOMA-R測定を行った。

〔 成 績 〕

FLSマウスは、B6マウスと比較してBMIでは差を認めなかったが、肝重量と肝内TG量は、16週齢(肝重量; $p=0.009$ 、肝内TG量; $p=0.021$ vs. B6, respectively)、48週齢(肝重量; $p=0.006$ 、肝内TG量; $p=0.024$ vs. B6, respectively)ともに高値を示した。血清生化学検査では、16週齢FLSマウスは、 γ -GTP、TNF- α が高値であり(γ -GTP; $p=0.019$ 、TNF- α ; $p=0.011$ vs. B6, respectively)、48週齢FLSマウスは、血清ALT、 γ -GTP、TNF- α がいずれも高値であった(ALT; $p=0.004$ 、 γ -GTP; $p=0.025$ 、TNF- α ; $p=0.007$ vs. B6, respectively)。

組織学的検討では、B6マウスでは異常所見を認めなかったが、FLSマウスは16週齢肝小葉中心付近に軽度の脂肪蓄積を示し、さらに48週齢では、著明な肝脂肪蓄積に加え肝細胞のブルーニング、マクロファージ浸潤による肝小葉内炎症巣と中心静脈周囲・類洞周囲の線維化を呈し、NASH activity scoreでは、 5.4 ± 0.5 点(vs. 0.0 点, B6)とNASHに合致する所見(5点以上)を示した。

肝からの脂質放出について、FLSマウスはLPL阻害剤投与後の血清TG上昇反応が16週齢(6時間値; $p<0.05$ 、24時間値; $p<0.05$ vs. B6, respectively)、48週齢(6時間値; $p<0.05$ 、24時間値; $p<0.05$ vs. B6, respectively)とも低下していた。血清リポ蛋白プロファイル解析結果よりこのTG上昇反応の低下が主に肝からのVLDL放出抑制によることが示された。

肝での遺伝子発現に関しては、FLSマウスのVLDL放出に関与するMTP、ApoBの発現低下が16週齢(MTP; $p<0.01$ 、ApoB; $p<0.05$ vs. B6, respectively)、48週齢(MTP; $p<0.0001$ 、ApoB; $p<0.05$ vs. B6, respectively)ともにみられ、特に律速蛋白MTPの遺伝子発現低下が著明であった。Western blot法による検討でもFLSマウスの肝臓でのMTPの発現低下が示された。また、48週では炎症関連遺伝子MCP-1、F4/80、TNF- α および線維化関連遺伝子TGF- β の遺伝子発現亢進(MCP-1; $p<0.0001$ 、F4/80; $p<0.05$ 、TNF- α ; $p<0.0001$ 、TGF- β ; $p<0.05$ vs. B6, respectively)を認めた。

FLSマウスの肝臓ではVLDL放出とMTP発現が低下していたため、次にMTPの発現ベクターを作製し、28週齢のFLSマウスに発現誘導を行った。4週間(週1回)にわたるベクター投与の結果、組織学的検討で肝脂肪蓄積の軽減と肝小葉内炎症巣の減少、さらに線維化の抑制が示され、NASH activity scoreも 0.7 ± 0.4 点(vs. 3.7 ± 0.4 点, controlベクター投与群)と低値であった。またMTPベクター投与FLSマウスは、LPL阻害剤投与後の血清TG上昇がみられ(6時間値; $p<0.05$ 、24時間値; $p<0.05$ vs. controlベクター投与群, respectively)、血清リポ蛋白プロファイル解析によりこの上昇がVLDL上昇によることが示された。さらにMTPベクター投与群は、炎症関連遺伝子MCP-1、F4/80の肝臓での遺伝子発現が抑制されており($p<0.05$ 、 $p<0.05$ vs. controlベクター投与群, respectively)、耐糖能の改善(ipGTT, 60分値; $p<0.05$ 、90分値; $p<0.01$ 、120分値; $p<0.01$ vs. controlベクター投与群, respectively)とHOMA-Rの低下($p<0.05$ vs. controlベクター投

与群) も認められた。

〔 総 括 〕

今回の検討より、FLSマウスの肝臓では著明な脂肪蓄積と炎症・線維化病変が観察され、肝VLDL放出と肝MTPの発現が低下しており、ベクターを用いてMTPを発現誘導したところ肝からの脂質放出能とNASH様肝病変、さらには耐糖能異常の改善が認められた。

以上より、FLSマウスがMTP発現低下と肝VLDL放出不全を基盤にNASHを自然発症するモデル動物であること、MTPの発現低下がNASHとNASH関連耐糖能障害の発症・進展に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は自然発症モデル動物が存在せずその病態が解明されていない。本研究は耐糖能異常を示す近交系 Fatty Liver Shionogi (FLS) マウスに注目し、肝病変の評価とその発症メカニズムについて検討したものである。本マウスの肝病変が NASH に合致し、肝からの脂質放出の律速蛋白 MTP の遺伝子発現が低下していること、さらに MTP の発現誘導により肝病変の改善のみならず耐糖能も改善することを見出し、本マウスが NASH の自然発症モデルマウスであることと、MTP が NASH 様肝病変と耐糖能障害に関与することを明らかにした。

以上の知見は本研究で初めて得られたもので、NASHの自然発症モデルマウスの確立およびその肝病変と耐糖能障害の発症・進展におけるMTPの関与について示し、NASHの病態解明さらには新たな治療法開発にも寄与する情報を提供するものであり、学位の授与に値するものと認める。