

博士論文（要約）

脂肪肝におけるホルモン感受性リパーゼの病態生理学意義

-遺伝子改変マウスを用いた解析-

李 騁騁

脂肪肝は肝細胞内に中性脂質が過剰に蓄積した状態であり、メタボリックシンドロームと関連した非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の増加や、それに続発する肝硬変や肝癌の発症は、重要な医療課題である。発症機序は従来、ツーヒット説（two-hits hypothesis）が提唱されてきた。即ち、まず中性脂肪（TG）などの脂肪が肝臓に蓄積し、さらに、炎症刺激、小胞体ストレス、酸化ストレスなどが加わることにより、NASH に進展すると考えられてきた。最近では、多重並行ヒット説（multiple parallel-hits hypothesis）も提唱され、脂肪毒性、腸や脂肪組織由来のシグナル、遺伝など多様な要因が、NASH の誘発因子として挙げられてきているが、不明な点はまだ多い。NASH の特効薬は未だになく、さらなる分子機序解明と治療薬開発が求められている。

肝臓に蓄積する脂質としては、TG 以外にコレステロールも病態生理的に重要である可能性が指摘されている。例えば、遊離コレステロール（FC）は炎症反応を惹起し、NASH 形成を促進すると言われている。ヒトでも、単純な脂肪肝の患者と比べ、NASH の患者では FC 含量が増加していると報告されている。肝臓内の TG だけでなく、総コレステロール（TC）・コレステロールエステル（CE）・FC 含量がどのように調整されているのか、その分子機序の解明は重要な課題である。

細胞内の中性脂質（TG、CE）を水解する酵素としては、従来、ホルモン感受性リパーゼ（HSL）が主要とされてきた。HSL は多機能酵素であり、多くの

組織に発現しているが、HSL の脂肪肝における生理的役割は *in vivo* では十分に明らかでない。ヒトにおいては、HSL 欠損は、脂肪肝、脂質異常症、インスリン抵抗性、糖尿病などのリスクとなることが知られている。そこで本研究では、HSL 欠損マウスを用いて、様々な脂肪肝を誘発する食事（高コレステロール食、各種高炭水化物食、高炭水化物・高コレステロール食）を用いて、脂肪肝を誘発し、HSL の脂肪肝における病態生理学的意義を探求することを目的とした。

その結果、HSL 欠損マウス (*Lipe*^{-/-}) では、脂肪肝を誘発する様々なダイエット（高コレステロール食、高炭水化物食、これらの組み合わせ）において、肝臓にコレステロールが蓄積することが分かった。これらの食事負荷の際に、肝臓内 FC 含量はほぼ一定で顕著な変化を認めなかったが、肝臓内 CE は HSL 欠損で著しく増加した。高炭水化物食の場合には、高グルコース食、高スクロース食、高フルクトース食の順に増加する傾向を認めた。高フルクトース食においては長期投与での検討も行なったが、高フルクトース食による肝臓内 CE 蓄積は長期投与では短期投与よりも顕著であった。この際に、HSL 欠損では野生型マウスと比べて、肝臓の脂質代謝系の遺伝子発現には変化を来たさなかったことから、CE 蓄積は HSL の欠損による CE 水解活性の低下に起因する可能性が高いと考えられた。また、少なくとも今回の実験条件では、HSL 欠損に伴う肝臓への CE 蓄積は、糖代謝など脂肪肝に関連するその他の代謝異常には影

響を及ぼさなかった。

HSL 以外の CE 水解酵素として、所属研究室は新規 CE 水解酵素 1 (Neutral cholesterol ester hydrolase 1 (NCEH1; マウス遺伝子は *Nceh1*)) を同定している。NCEH1 は細胞内の CE の加水分解に重要な役割を果たしており、例えばマクロファージにおいては HSL に匹敵する中性 CE 水解酵素 (nCEH) 活性を持っており、NCEH1 は動脈硬化病変のマクロファージ泡沫化に重要な役割を持っている。肝臓においては、HSL 欠損 (*Lipe*^{-/-})、NCEH1 欠損 (*Nceh1*^{-/-})、NCEH1・HSL 両欠損マウス (*Lipe*^{-/-}; *Nceh1*^{-/-}) での検討から、酵素活性レベルでは、肝臓の細胞内 CE 水解酵素活性の約 70%は HSL に、約 20%は NCEH1 に起因することを報告している。しかし、脂肪肝の病態における NCEH1 の寄与は明らかではない。そこで、*Nceh1*^{-/-}や *Lipe*^{-/-}; *Nceh1*^{-/-}を用いて、食事性脂肪肝における糖脂質代謝の解析を行なった。その結果、NCEH1 の欠損は、脂肪肝や関連代謝指標に有意な変化をきたさないこと、肝臓内 CE 蓄積においても、NCEH1 の有意な寄与はなく、HSL の寄与が大きいことが明らかとなった。

中性脂質の蓄積メカニズムを検討する際には、中性脂質の各組織への運搬の役割も検討する必要がある。中性脂質は外因性経路と内因性経路の2つのリポ蛋白運搬経路により、体内の組織に運搬されている。外因性経路では、食事由来の脂質は小腸からカイロミクロン (CM) の形で分泌される。内因性経路では、食事由来の炭水化物などをもとに肝臓で合成された TG が VLDL として分

泌される。食事性脂肪肝においては、これらの CM や VLDL の代謝が重要な役割を果たす可能性があるが、その寄与は完全に明らかでない。

この CM と VLDL の代謝には、アポリポ蛋白 A-V (apoA-V) が重要な役割を果たしている。apoA-V は、肝臓から分泌されるアポリポ蛋白で、TG 含有リポ蛋白 (TG-rich lipoprotein (TRL)) 代謝を促進する。そのメカニズムとして、TRL 中の TG を水解する酵素であるリポ蛋白リパーゼ (LPL) の活性を促進する、TRL の細胞内への取り込みを TRL の受容体のリガンドとして働くことにより促進する、肝臓の細胞内の油滴形成を促進し VLDL 中への TG 分泌を抑制する、などが知られている。apoA-V がヒトにおいて重要な役割を果たすことは、apoA-V 遺伝子 (APOA5) の欠損が CM や VLDL の増加を伴う重度高 TG 血症の原因となることから明らかとなった。マウスにおいても、apoA-V 欠損マウス (*Apoa5*^{-/-}) は、血漿中 TG 濃度が増加するとともに、ヒト apoA-V 遺伝子の過剰発現マウス (*Apoa5* Tg) では、血清 TG 濃度が 70%減少する。申請者の所属の研究室では、*Apoa5*^{-/-}を用いて、その高 TG 血症発現のメカニズムを解析しており、これまでに、*Apoa5*^{-/-}は、ヒトの重度高 TG 血症の良いモデルとなること、特に、加齢や高炭水化物食 (高フルクトース食) により重度高 TG 血症 (TG~6,000 mg/dL) を来たすことを見出している。

そこで、この病態生理的な高 TG 血症 (CM、VLDL 代謝異常) のモデルマウスである、apoA-V 欠損マウスを用いて、CM、VLDL 代謝が障害されている

場合の、脂肪肝での代謝異常、肝臓内脂質蓄積について検討した。具体的には、apoA-V 欠損マウス (*Apoa5*^{-/-}) と HSL 欠損マウス (*Lipe*^{-/-}) の交配により HSL・apoA-V 両欠損マウス (*Lipe*^{-/-}; *Apoa5*^{-/-}) を樹立し、高フルクトース食の影響を検討した。

これまでの apoA-V 欠損マウスにおける高フルクトース食投与の結果と一致して、*Apoa5*^{-/-}では高フルクトース食により血漿 TG と血漿 TC が有意に増加した。一方、*Lipe*^{-/-}; *Apoa5*^{-/-}では、*Apoa5*^{-/-}と比較して、高フルクトース食による血漿 TG 増加は同程度であるものの、血漿 CE は減少の傾向、血漿 FC は有意に増加していた。*Apoa5*^{-/-}における TG の増加は、主に TG 含有リポ蛋白 (TRL) の増加に由来しており、*Apoa5*^{-/-}における血漿 TC の増加はその TRL に含まれる CE・FC に由来していることを考えると、HSL 欠損では CE 含量の少ない VLDL が分泌されている可能性が示唆された。一般に、肝臓内の TG の水解 (lipolysis) は、TG 再合成 (re-esterification) を介して VLDL-TG 分泌を促進すると言われているが、同様の lipolysis/re-esterification のメカニズムが CE の場合にも働いている可能性が考えられた。すなわち、HSL は肝臓に蓄積した CE を水解 (lipolysis) することにより、CE 再合成 (re-esterification) を介して VLDL-CE 分泌を亢進させている可能性がある。

Apoa5^{-/-}と *Lipe*^{-/-}; *Apoa5*^{-/-}との間で、肝臓の脂質含量については、肝臓 TG、FC 含量に変化はなかったが、HSL 欠損マウスで認めた肝臓 CE 含量の増加は、

apoA-V 欠損バックグラウンドでは消失していた。また、野生型マウス (WT) との比較においても、apoA-V の欠損 (*Apoa5*^{-/-}) により、肝臓の細胞内 CE 含量は減少していた。以上から、食事性脂肪肝での肝細胞内の CE 蓄積においては、HSL よりも上流の因子として、apoA-V が必要であることが分かった。すなわち、食事性脂肪肝では、apoA-V の作用で、食事由来の脂質や炭水化物由来の CM・VLDL の取り込みを介して CE 蓄積が蓄積すること、蓄積した CE の水解には HSL が必要であることが示唆された。

以上まとめると、各種遺伝子欠損マウスを様々な脂肪肝誘発ダイエットで解析した今回の研究から、様々な脂肪肝を誘発するダイエットによる生理的な脂肪肝のモデルにおいて、HSL 欠損は肝臓内 CE 蓄積をもたらすこと、HSL は肝臓内 CE 制御に必須な役割を果たすことが明らかとなった。そのメカニズムとして、肝臓遺伝子発現の検討から、この HSL 欠損での肝臓内 CE 蓄積は、他の脂質代謝系遺伝子の発現変化を介してではなく、HSL の CE 水解酵素活性の低下自体に起因する可能性が高いことが示唆された。また、HSL は CE 水解を介して、VLDL 中への CE 分泌を促進する可能性が示唆された。NCEH1 欠損マウスでの検討からは、食事性脂肪肝における CE 蓄積において、HSL 以外のリパーゼ (NCEH1) の寄与は少ないことが示唆された。最後に、apoA-V 欠損マウスでの検討から、野生型マウスや HSL 欠損マウスでの食事性脂肪肝における肝臓内 CE 増加には、apoA-V が必要であり、apoA-V に依存した肝臓への CM

や VLDL などの TRL 取り込みが必要である可能性が示唆された。

食事由来の脂肪肝では、apoA-V を介した食事由来の栄養素の肝臓への取り込みと CE 蓄積、HSL による CE 水解が重要であること、HSL による CE 水解に伴って VLDL-CE が分泌されている可能性が示唆されたが、このようなコレステロール代謝が、食事由来の栄養素の代謝や、脂肪肝の病態において、どのような役割を担っているのか、今後さらに検討する必要がある。また、このような CE 代謝が破綻したとき、例えば遊離コレステロールが増加するなどして脂肪肝が悪化するのかなど、今後の課題である。HSL 欠損はヒトにおいて、脂肪肝、脂質異常症、糖尿病、インスリン抵抗性のリスクとなることが知られており、また肝臓へのコレステロール蓄積は NASH の炎症惹起に重要とも言われている。これらの分子機構を今後さらに解明し、脂肪肝の新たな治療標的の同定につなげていきたい。