

## 論文内容の要旨

### 論文題目：高脂肪食給餌によって誘発された BALB/c マウスの脂肪肝の性状

氏名：西川 智美

非アルコール性脂肪肝とは、アルコール非摂取者においてアルコール性脂肪肝と同様の病態を示す肝臓の病態のことである。発生率は10～24%であるが、肥満者においては75%と高く、肥満と密接な関係にあると考えられている。食生活の欧米化に伴い肥満は増加傾向にあり、それに伴って非アルコール性脂肪肝の発生も増加している。また、非アルコール性脂肪肝は脂肪肝炎や肝臓に進展することもあり、近年とくに注目されている。脂肪肝に至るプロセスを解明するため多くの臨床研究がなされてきたが、脂肪肝の発生・進展には長い月日がかかるために均質なデータをとることが困難である。そのため、動物における脂肪肝モデルの作製とそれを用いた脂肪肝発生における機序解明を目指した実験的研究が遂行されている。

非アルコール性脂肪肝のモデルとしては、食事性あるいは遺伝子変異性肥満に伴う脂肪肝、脂質代謝関連遺伝子の欠損による脂肪肝などがある。これらのうち、ヒトの肥満に伴う脂肪肝をよく反映しているのは、高脂肪食給餌によって作出された肥満動物の脂肪肝と考えられる。しかし、これまで高脂肪食誘導性肥満動物の脂肪肝についてヒト脂肪肝のモデルとしての詳細な検討はなされていない。

肥満に影響する因子にはマウスの系統、性別、年齢が考えられ、脂肪肝の発生も同様に系統、性別、年齢の影響を受けることが考えられる。系統については、高脂肪食給餌によ

り肥満になりやすい系統（C57BL/6J, DBA/2J）と抵抗性の系統（SWR/J, A/J），およびこれらの中間の系統（BALB/cByJ, C3H/HeJ）があり，現在では肥満モデルとして C57BL/6J が多く使用されている．また，性別については，げっ歯類では高脂肪食給餌による肥満の特徴が雄と雌で異なるという報告がある．さらに，老化に伴ってエネルギー消費が減少しエネルギー摂取調節能力が衰えてくるので，肥満は年齢の影響も受けることが報告されている．

本研究では，肥満に伴う脂肪肝の発生機序について調べるために，高脂肪食を給餌したマウスを用いて，脂肪肝発生における系統・性別・年齢の影響，エネルギー状態の影響，給餌期間の影響を，遺伝子発現解析および病理組織学的検索によって比較した．

第 1 章では，高脂肪食給餌による肥満と脂肪肝の特徴について，マウスの系統，性別，週齢による差異を検討するため，5 週齢の C57BL/6J マウス（B6）雌雄，5 週齢の BALB/cA マウス（BALB/c）雌雄，および 54 週齢の B6 雌雄を用いて 9 週間高脂肪食給餌を行った．その結果，5 週齢から給餌を行った BALB/c の雄と B6 の雄では，高脂肪食群で摂取エネルギー，体重，体脂肪量，血中コレステロールの増加，肝の脂肪滴増加が認められた．BALB/c の雄と B6 の雄の高脂肪食群での体脂肪量の増加は同程度であるのに対して，肝の脂肪滴増加は，B6 に比べ BALB/c で顕著であり，系統差があることが示された．また，性差については，BALB/c の雌では摂取エネルギーの増加が認められず，雄で認められた体重増加，体脂肪量の増加，耐糖能の悪化や肝の脂肪滴増加は程度が低いかあるいは認められなかった．週齢差については，54 週齢から高脂肪食給餌した B6 の方が 5 週齢から給餌した B6 より体脂肪量の増加の程度が大きく，肝の脂肪滴増加も顕著であった．肝の脂肪滴増加について系統差，性差，週齢差が認められたが，性差と週齢差については，肥満の程度の違いに伴って脂肪肝の程度も変化したと考えられた．一方，B6 と BALB/c では肥満の程度が同じであったことから，肝の脂質代謝に違いがあることが考えられた．これまでは B6 マウスが肥満モデルとして一般的に使われていたが，むしろ BALB/c の脂肪肝について注目すべきと思われた．

次いで第 2 章では、空腹・満腹といったエネルギー状態の違いが 9 週間高脂肪食給餌した BALB/c と B6 の肝での脂質代謝にどのような影響を与えるかを明らかにするために、絶食時と非絶食時の肝における遺伝子発現および肝への脂質蓄積の程度を比較した。その結果、BALB/c は絶食・非絶食時とも顕著な肝の脂肪滴沈着を示したのに対し、B6 では非絶食時には著しい肝の脂肪滴沈着を示したが、絶食すると脂肪滴は減少した。RT-PCR 法による遺伝子発現解析の結果、BALB/c では絶食によって減少すると考えられている *acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (Acaca)*, *malic enzyme*, *fatty acid synthase (Fasn)* などの脂肪酸合成関連遺伝子や、これらの転写因子である *sterol regulatory element binding factor 1 (Srebp1)* の減少が B6 に比べて軽度であった。また、B6 ではトリグリセリド合成関連遺伝子である *glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (Gpam)* の発現が減少したが、BALB/c では変動しなかった。以上のことから、高脂肪食給餌した BALB/c では、通常は絶食によって抑制される脂肪酸合成やトリグリセリド合成が、絶食しても亢進することが明らかになり、このことが B6 と BALB/c の肝の脂肪滴増加の差に関連していると考えられた。

第 3 章では、高脂肪食による BALB/c の脂肪肝進展機序を詳細に検討するため、高脂肪食あるいは通常食を 1 週間、4 週間、9 週間給餌した BALB/c および 9 週間給餌した B6 について、マイクロアレイ解析によって遺伝子発現の変化を調べた。その結果、1 週間または 4 週間給餌した BALB/c では肝の脂肪滴増加はごく軽度であった。1 週間の高脂肪食給餌ではケトン体の合成関連遺伝子の発現が増加、脂肪酸合成関連遺伝子の発現が減少しており、脂肪酸異化の亢進、脂肪酸合成の抑制が起こっていると考えられた。これに対し、4 週間の高脂肪食給餌では遊離脂肪酸の取り込みに関連する遺伝子の発現増加が認められたが、軽度であった。9 週間高脂肪食を給餌した BALB/c は、顕著な肝の脂肪滴増加を示し、遊離脂肪酸の取り込みに関連する遺伝子である *Cd36*, および脂肪酸合成関連遺伝子である *Acaca*, *ATP-citrate lyase (Acly)*, *Fasn* の発現が増加していた。また、これらの転写因子である *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )* や *Srebp1* の発現も増加しており、*Acaca*, *Acly*, *Fasn*, *Cd36* の発現増加との関連が考えられた。一方、9 週間給餌した B6 では肝の脂

脂肪滴増加はごく軽度であり、遺伝子発現においては高脂肪食群と通常食群で著しい差は認められなかった。よって、BALB/c の脂肪肝発生の一因としては、遊離脂肪酸の取り込みおよび脂肪酸合成の亢進が重要であることが示唆された。

以上の結果から、マウスの高脂肪食給餌による脂肪肝発生の際には、系統差があり、BALB/c は絶食の有無に関わらず脂肪肝が維持されるのに対し、B6 では絶食により脂肪肝が改善することが明らかになった。BALB/c では、絶食状態で *Acaca*, *Me*, *Fasn* の発現減少が軽度であったこと、および *Gpam* が減少しなかったことから、絶食による脂肪酸合成やトリグリセリド合成の減少が生じないことが B6 との系統差の一因と考えられた。また、1 週間、4 週間、9 週間給餌した BALB/c と 9 週間給餌した B6 の肝組織像、および遺伝子解析の結果から、BALB/c の高脂肪食給餌脂肪肝では通常食給餌肝に比べて *Cd36* などの遊離脂肪酸の取り込み関連遺伝子および *Acaca*, *Acly*, *Fasn* などの脂肪酸合成関連遺伝子の発現が上昇していることが示され、脂肪酸の取り込みと合成の亢進が脂肪肝発生の一因と考えられた。

本研究の成果は、通常は肥満の実験モデル動物としては用いられない BALB/c が、これまで用いられてきた B6 よりも脂肪肝になりやすいこと、およびその脂肪肝発生机序として肝での脂肪酸合成関連遺伝子の発現異常が関連することを指摘した点で非常に重要であると考えられた。