

氏 名	宮 崎 敬 士
(ふりがな)	(みやざき ひろし)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	乙 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 26 年 7 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 名	The $\alpha$ -tocopherol status and expression of $\alpha$ -tocopherol-related proteins in methionine-choline deficient rats treated with vitamin E (ビタミン E 投与メチオニン-コリン欠乏ラットにおける $\alpha$ -トコフェロール動態と $\alpha$ -トコフェロール関連タンパク質の発現)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 矢 野 貴 人 教授 林 秀 行 教授 朝 日 通 雄

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 《背 景》

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は先進国でよくみられる肝疾患であり、その発症率は増加している。NAFLD は、単純性脂肪肝から肝細胞癌へ進行しうる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) まで幅広い代謝性脂肪性肝疾患を含んでおり、メタボリック症候群、2 型糖尿病、心血管疾患を含めた生活習慣病に密接に関係している。ビタミン E は脂溶性抗酸化物質であり、8 つのサブタイプの中で $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -Toc) は、最も強い脂質過酸化抑制能を有する。酸化ストレスは NAFLD の病因の 1 つであり、 $\alpha$ -Toc が NASH の治療に効果的であるが、その機序に関しては未だ不明である。

## 《目 的》

この研究において、我々は NAFLD ラットモデルでのビタミン E 療法において $\alpha$ -Toc 動態と $\alpha$ -Toc 関連タンパク質の遺伝子発現を評価した。

## 《方 法》

NAFLD の実験モデルとしてメチオニン-コリン欠乏 (MCD) ラットを用いた。4 週齢の雄性 Wistar ラットを 4 群に分けて、以下の食餌を 4 週間自由摂取させた。(1)  $\alpha$ -Toc (20 mg/kg 飼料) を含む標準食 (Cont 群)、(2) メチオニン-コリン欠乏食 (MCD 群)、(3) 高用量 $\alpha$ -Toc (500 mg/kg 飼料) を加えた標準食 (Cont+Vit E 群)、(4) MCD と高用量 $\alpha$ -Toc 併用食 (MCD+Vit E 群)。ビタミン E の動態は血漿および肝臓 $\alpha$ -Toc 濃度と肝臓での $\alpha$ -Toc 関連タンパク質の発現を検討することにより評価した。血漿および肝臓 $\alpha$ -Toc 濃度は高速液体クロマトグラフィーで測定した。ラット肝より RNA を抽出し、 $\alpha$ -tocopherol 輸送タンパク質 ( $\alpha$ -TTP)、cytochrome P450 4F2 (CYP4F2)、ATP-binding cassette transporter protein 1 (ABCA1)、 $\beta$ -actin 遺伝子の発現を real-time PCR で分析した。ビタミン E の過酸化脂質障害に対する効果の評価として、肝臓の 4-hydroxynonenal (4-HNE) -ヒスチジン付加物を測定した。ラット肝での抗酸化酵素の発現に対する $\alpha$ -Toc の効果を評価するため、immunoblotting にて Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) と CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD) のタンパク質発現を、real-time PCR にて glutathione peroxidase (GPx) の遺伝子発現を評価した。さらに、肝組織切片で 4-HNE 修飾タンパク質と $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の免疫染色を行った。

## 《結 果》

MCD+Vit E 群において、MCD 群と比較すると過酸化脂質障害は抑制されたが、肝臓病理組織所見 (炎症細胞浸潤、脂肪蓄積、線維化) は改善されなかった。MCD 群および MCD+Vit E 群の Mn-SOD、CuZn-SOD、GPx の発現は、Cont 群と比べて有意に抑制されていた。MCD+Vit E 群ラットの肝臓中 $\alpha$ -Toc 濃度は、Cont+Vit E 群と比べて有意

に上昇していた。MCD+Vit E 群の $\alpha$ -TTP の発現は、MCD 群に比べて有意に抑制されていた。 $\alpha$ -Toc の代謝と輸送に関与する *Cyp4f2* と *Abca1* 遺伝子発現はそれぞれ Cont 群と比較して Cont+Vit E 群で上昇していたが、MCD 群および MCD+Vit E 群において有意に抑制されていた。

#### 《考 察》

本研究においてビタミン E 投与は NAFLD ラットモデルの脂質過酸化を改善したが、組織学的変化を防ぐことはできなかった。ビタミン E は NAFLD モデルの病理組織学的変化の改善やアポトーシスメディエーター発現を減少させるとの報告がある。本研究での結果が既報と異なる原因としてビタミン E の投与量・投与期間の違いや齧歯類モデルの種類による反応性の違いが考えられる。MCD ラットの肝臓では、酸化ストレスを示す過酸化脂質が増加し、抗酸化酵素の発現が減少し、 $\alpha$ -TTP の発現は抑制されていた。一方、過酸化脂質障害を伴う 2 型糖尿病モデルラット (Goto-Kakizaki ラット) では肝臓 $\alpha$ -TTP 発現は上昇することが報告されている。この矛盾した結果は、異なる病理学的状態によりもたらされる酸化ストレスに対する、肝臓 $\alpha$ -TTP 発現の多様性を示しているのかもしれない。以下、我々はビタミン E 投与 NAFLD ラットモデルでの $\alpha$ -Toc 代謝という観点から研究結果を考察した。MCD ラットにおける $\alpha$ -TTP 発現の抑制がビタミン E 投与による肝臓 $\alpha$ -Toc 濃度の上昇をもたらしている可能性がある。ビタミン E 過剰投与はそれ自身の代謝酵素とトランスポーター遺伝子発現を上昇させ、ビタミン E の代謝および分泌を誘導すると考えられる。標準食ラットでは CYP4F2 発現はビタミン E 投与により増加したが、MCD ラットではビタミン E を投与しても CYP4F2 発現が増加しなかった。ABCA1 は細胞内 $\alpha$ -Toc の HDL 経路への分泌を仲介しており、肝細胞外への $\alpha$ -Toc 分泌に関与している。標準食ラットへのビタミン E 投与により肝臓 ABCA1 発現は増加するが、MCD ラットにビタミン E を投与しても肝臓 ABCA1 は抑制されたままであった。以上の結果より、MCD ラットに対するビタミン E 投与においては、肝臓での $\alpha$ -Toc 代謝と肝臓からの $\alpha$ -Toc 分泌・輸送が抑制されることで肝臓 $\alpha$ -Toc 濃度が増加し、MCD により引き起こされる肝臓での過酸化脂質

障害に対して防御的に働いているのかもしれない。

#### 《結 論》

MCD ラットにおいて、ビタミン E 療法は肝臓 $\alpha$ -Toc 関連タンパク質の発現を変化させることで肝臓中の $\alpha$ -Toc 動態に影響を及ぼし、肝臓の過酸化脂質障害を抑制する可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は生活習慣病に密接に関係した、先進国でよくみられる肝疾患であり、単純性脂肪肝から肝細胞癌へ進行しうる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) まで幅広い代謝性脂肪性肝疾患を含んでいる。ビタミン E は脂溶性抗酸化物質であり、そのサブタイプの中で $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -Toc) は、最も強い脂質過酸化抑制能を有する。酸化ストレスは NAFLD の病因の 1 つであり、 $\alpha$ -Toc が NASH の治療に効果的であるが、その機序に関しては未だ不明である。本研究において、申請者は NAFLD の実験モデルとしてメチオニン-コリン欠乏 (MCD) ラットを用いて、ビタミン E 療法における $\alpha$ -Toc 動態と $\alpha$ -Toc 関連タンパク質の発現を評価した。MCD ラットの肝臓では酸化ストレスにより過酸化脂質が増加し、抗酸化酵素の発現が減少し、 $\alpha$ -Toc 輸送タンパク質 ( $\alpha$ -TTP) の発現は抑制されていた。ビタミン E 投与 MCD ラットの肝臓では、 $\alpha$ -TTP の発現はさらに低下し、 $\alpha$ -Toc が著明に上昇していた。ビタミン E はビタミン E 関連タンパク質の発現に影響を与えることが報告されており、ビタミン E 過剰投与はそれ自身の代謝酵素とトランスポーター遺伝子発現を上昇させ、ビタミン E の代謝および分泌を誘導すると考えられる。ビタミン E の代謝と肝外への分泌に関与する肝臓 *Cyp4f2* と *Abca1* 遺伝子発現は、標準食ラットへのビタミン E 投与により増加するが、ビタミン E 投与 MCD ラットでは両者ともに低下していた。以上の結果より、申請者は、ビタミン E 療法は $\alpha$ -Toc の肝臓での代謝と肝外への分泌・輸送を抑制することで肝臓 $\alpha$ -Toc 濃度を増加させ、MCD により引き起こされる肝臓での過酸化脂質障害を抑制するという合目的的な機構を見出した。これら結果は、NAFLD や他の酸化ストレス関連疾患に対する抗酸化物質に基づく治療戦略の発展に寄与するものと思われる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

The Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 54(3): 190-197, 2014