







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 651 号	氏 名	所 征 範
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	波多野 豊	
	副査氏名	井原 健一	
	副査氏名	新宮 千尋	
<p>論文題目 α-Tocopherol Suppresses Hepatic Steatosis by increasing CPT-1 Expression in a Mouse Model of Diet-induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease (食餌誘導性 NAFLD モデルマウスにおいて、α-Tocopherol は CPT-1 の発現を増加させ肝脂肪化を抑制する)</p> <p>論文掲載雑誌名 Obesity Science & Practice</p> <p>論文要旨</p> <p>様々な臨床試験において、non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)に対するビタミンEによる抗酸化療法の有効性が示されているが、適切な投与量やそのメカニズムについては依然不明な点がある。本研究では、食餌誘導性 NAFLD モデルマウスにおけるα-tocopherol (α-Toc)の脂肪肝抑制効果を評価した。その結果、①High-fat (HF)群で認められた肝臓内の脂肪蓄積や血清 ALT 濃度の増加ならびに肝臓内 CPT-1 蛋白質発現の低下が、HF + low dose α-Toc 群では有意に抑制されていたが、HF + high dose α-Toc 群ではこのような抑制作用が認められなかった。また CPT-1 以外の脂肪酸酸化および fatty acid synthase (FAS)などの脂肪酸合成に関与する蛋白質発現に有意な変化はみられなかった。② HF + low dose α-Toc 群に特異的 CPT-1 阻害薬である 2-tetradecylglycidic acid (TDGA)を投与すると、肝臓内 CPT-1 蛋白質発現の低下とともに、肝臓内の脂肪蓄積や血清 ALT 濃度が増加した。更に、肝細胞における CPT-1 蛋白質発現に対するα-Tocの影響を、培養 HepG2 細胞を用いて検討したところ、1μM までのα-Tocの添加では CPT-1 蛋白質の発現が増加傾向であったが、1μM 以上では減少傾向であった。</p> <p>以上の結果から、α-Toc の NAFLD に対する抑制作用は、低用量の場合にのみ認められ、容量非依存性であることが推測された。更に、そのα-Tocによる NAFLD 抑制作用は、NAFLD 発症過程で低下が認められた CPT-1 蛋白質の上昇を介していることが示唆された。</p> <p>本研究は、既に報告されている低用量と高用量で2相性を示すビタミンEによる脂肪肝改善効果を再現することにより、NAFLD に対して臨床的に有効なビタミンEの投与量が容量依存性ではない可能性をあらためて示唆するのみでなく、ビタミンEによる NAFLD 抑制効果が、CPT-1 蛋白レベルの上昇を介した作用で有る可能性を示した。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験

の結果の要旨

~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第651号	氏名	所 征 範
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	波多野 豊	
	副査氏名	井原 健二	
	副査氏名	新宮 千尋	

学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

1. Non-alcoholic脂肪肝とalcoholic脂肪肝は臨床的或いは病態的にどのように違うのか？
2. CPT1は肝臓の他にどのような臓器、或いは細胞で発現しているのか？
3. 雄を使用したのは何故か？雌では不都合なことがあるのか？
4. Alpha-tocophenolのマウスでの投与量や投与後の血中濃度は、人での投与量と同等と考えられる量なのか？同様に培養実験での投与量はどうか？
5. 高用量のalpha-tocophenol群では、NASHの改善効果が認められなかったにもかかわらず、抗酸化活性は高かった。これは、本研究モデルにおけるoxidative stressの関与に疑問を投げかけるものなのか？
6. CPT-1特異的に影響する因子としてはどのようなものが想定されるか？
7. 高脂肪食でなぜCPT1の発現レベルが低下するのか？
8. ビタミンEはどのようにCPT1の機能に関わるのか？
9. CPT1阻害剤のTDGAはどのようにCPT1機能を特異的に抑制するのか？遺伝子発現レベルなのか？それとも酵素に結合し分解を誘導するのか？
10. CPT1機能低下を証明する場合には、遊離アシルカルニチンやアシルカルニチン分画などを測定して生化学的にも確認したほうが良いと思います。
11. マウスはビタミンEを体内で産生することができるが、ヒトはできない。このように、内因性のビタミンEが存在する種としない種で、CPT-1の発現の仕方に差があるのだろうか？
12. 本研究でのビタミンEの効果は、NASHの発症機序における1stヒットと2ndヒットのどちらに作用したのか？
13. HepG2細胞を用いた実験で、mRNAレベルの検討や細胞のviabilityや増殖への影響を確認したか？
14. HF群では肝臓内のTG蓄積量が多いが血清では差が無いことの意味は何か？実臨床での所見と一致するか？
15. ビタミンEの投与量によって、その効果が二相性になると結論付けているが、二相性になる原因と、高容量になると有害事象が生じる原因はどのように考えているか？

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 所 征 範

論 文 題 目

α-Tocopherol Suppresses Hepatic Steatosis by increasing CPT-1 Expression in a Mouse Model of Diet-induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease (食餌誘導性 NAFLD モデルマウスにおいて、*α-Tocopherol* は CPT-1 の発現を増加させ肝脂肪化を抑制する)

要 旨

ア. 緒 言 (目的)

様々な臨床試験で NAFLD に対するビタミン E による抗酸化療法の有効性が示されているが、適切な投与量やそのメカニズムについては依然不明な点がある。そこで食餌誘導性 NAFLD モデルマウスにおける *α-tocopherol* (*α-Toc*) の脂肪肝抑制効果を評価した。

イ. 研究対象及び方法 (材料を含む)

I) 雄 C57B6/J マウス (8 週齢) を 4 群に分けて以下の食餌を自由摂食させた。(1) 通常餌 (Standard 群)、(2) 高脂肪餌 (HF 群)、(3) 50mg/kg の *α-Toc* を配合した高脂肪餌 (HF + low dose *α-Toc* 群)、(4) 200mg/kg の *α-Toc* を配合した高脂肪餌 (HF + high dose *α-Toc* 群)。肝組織は HE 染色で評価した。血清 ALT 濃度および肝組織の中性脂肪含有量を測定した。また carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1) などの脂肪酸酸化または fatty acid synthase (FAS) などの脂肪酸合成に関与するタンパク質の肝臓内発現を Western Blotting 法で評価した。

II) 雄 C57B6/J マウス (8 週齢) を以下の 5 群に分けた。(1) Standard 群、(2) HF 群、(3) HF 群に特異的 CPT-1 阻害薬である 2-tetradecylglycidic acid (TDGA) を投与した群 (HF+ TDGA 群)、(4) HF + low dose *α-Toc* 群、(5) HF + low dose *α-Toc* 群に TDGA を投与した群 (HF + low dose *α-Toc* + TDGA 群)。肝組織、血清 ALT 濃度、肝の中性脂肪含有量および CPT-1 の発現を評価した。

III) 1mM のオレイン酸で脂肪負荷した 1% FCS/RPMI-1640 培地で HepG2 細胞を培養し、0 - 50 μ M の種々の濃度の *α-Toc* を加えた。細胞を回収し CPT-1 を Western Blotting 法で評価した。

ウ. 結 果

I) HF 群で認められた肝臓内の脂肪蓄積や血清 ALT 濃度の増加ならびに肝臓内 CPT-1 発現の低下が、HF + low dose α -Toc 群では有意に抑制されていたが、HF + high dose α -Toc 群ではこのような抑制作用が認められなかった。また CPT-1 以外の脂肪酸酸化および FAS などの脂肪酸合成に参与するタンパク質発現に有意な変化はみられなかった。

II) HF + low dose α -Toc 群に TDGA を投与すると、肝臓内 CPT-1 発現が低下するとともに、肝臓内の脂肪蓄積や血清 ALT 濃度が増加した。

III) HepG2 細胞における実験では 1 μ M までの α -Toc の添加では CPT-1 の発現が増加傾向であったが、1 μ M 以上では減少傾向であった。

エ. 考 察

本研究ではビタミン E の 8 つのアイソフォームのうち最も抗酸化作用が強い α -Tocopherol (α -Toc) を NAFLD の研究によく用いられる肥満モデル動物に投与し肝臓の脂肪蓄積が抑制されるかを検討した。高脂肪餌に低用量の α -Toc を投与すると、脂肪肝を改善させ肝臓内 CPT-1 発現の低下も抑制させた。興味深いことに、高用量の α -Toc 投与では上記のような変化がみられなかった。以上より α -Toc の NAFLD に対する作用は、CPT-1 を介しているものの容量非依存性であることが推測された。さらに特異的 CPT-1 阻害薬である TDGA は低用量の α -Toc による脂肪肝の改善効果を抑制したことから、 α -Toc は CPT-1 を介して NAFLD の進展を軽減させる可能性が示唆された。CPT-1 はミトコンドリアの膜上にあるタンパク質で、 β 酸化を行うミトコンドリア内への脂肪酸を輸送する際に重要な酵素である。CPT-1 ノックアウトマウスでは肝の重篤な脂肪蓄積および炎症が観察されることが報告されており、CPT-1 と NAFLD の密接な関連が示唆されている。最後に、CPT-1 活性に関する α -Toc の効果が用量依存的でないという我々の推測を確認するために *in vitro* での研究を行った。HepG2 細胞においても低用量の α -Toc では CPT-1 発現が増加するが、高用量になるにしたがって再度 CPT-1 発現が低下する傾向にあった。本研究の結果は、高用量のビタミン E において脂肪肝改善が抑制されるという既報と矛盾しない。

オ. 結 語 (まとめ)

α -Toc は肝臓における CPT-1 の発現に対して 2 相性の作用を有していると推測された。NAFLD に対して臨床的に有効なビタミン E の投与量は容量依存性ではない可能性が示唆された。