

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 荒生 祥尚
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 954 号
学位授与の日付 令和2年9月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Effect of methionine/choline-deficient diet and high-fat diet-induced steatohepatitis on mitochondrial homeostasis in mice
(メチオニン・コリン欠乏食、高脂肪食による脂肪性肝炎マウスにおけるミトコンドリア恒常性への影響)

論文審査委員 主査 教授 神吉 智丈
副査 教授 若井 俊文
副査 准教授 小林 隆

博士論文の要旨

【背景と目的】

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH ; non-alcoholic steatohepatitis) は世界的に増加傾向のある疾患で、臨床経過や病態、代謝状態、組織学変化は多様性に富んでいる。その原因の一つとして酸化ストレス (ROS : reactive oxygen species) のミトコンドリアの機能異常への影響が推測される。それは、ミトコンドリア DNA がヒストンを欠いているため、ROS により障害されやすく、ミトコンドリア DNA コピーナンバー (mtDNA copy number) は変化するためである。従って、NASH 研究では適切な動物モデルの使用が必須で、今日までにメチオニン・コリン欠乏食 (MCD : methionine/choline-deficient diet) や高脂肪食 (HFD : high-fat diet) 投与マウスが使われてきた。しかしながら、これらのモデルの肝病態や代謝状態はヒトにおける NASH とは異なり、研究対象と目的に応じたモデルマウスを使用する必要がある。そこで、申請者らは、このモデルマウスの肝細胞に対する変化をミトコンドリアの恒常性に着目し、明らかにすることで、適切なモデルマウスを用いるための基盤を確立することを本研究の目的とした。具体的には、MCD、HFD を投与したマウスの肝臓における mtDNA copy number の変化と、ミトコンドリアの生合成に関わる遺伝子発現や蛋白発現、ROS の産生量の違いを検証した。

【方法】

1. MtDNA copy number、ミトコンドリアの生合成・分解に関わる遺伝子・蛋白発現、ROS の評価 6 週齢の C56BL/6N マウスを購入し、通常食、MCD、HFD を 2 週、6 週、10 週投与した群を作成した。また 6 週 HFD 投与した後に通常食を 4 週投与した群を食事改善群 (HFD-R) とした。マウス培養細胞からゲノム DNA を抽出し、希釈系列を作成し、各系列で mtDNA 上の遺伝子 Nd1 と nDNA 上の遺伝子 Actb のリアルタイム PCR を行い、各々検量線を作成して標準曲線として用い、各検体から抽出された DNA を鋳型とし、Nd1 と Actb のリアルタイム PCR から得られた Ct を標準曲線にプロットし、mtDNA と nDNA の初期鋳型量を求め、mtDNA 量/nDNA 量を算出した。培養細胞の mtDNA 量/nDNA 量を標準として、各検体の mtDNA 量/nDNA 量との比を mtDNA

コピー数の指標とした。また肝組織から RNA を抽出し、cDNA を合成し、生合成系に関わる特定の遺伝子発現（合成系：Pparg1a, Tfam, Nrf1, Nrf2, Keap1、分解系：Lc3b, Prkn, Pink1）を RT-qPCR で評価した。また各群の PGC-1 α 、LC3B-II をウエスタンブロッティングで評価した。ROS の評価として 8-OHdG を免疫蛍光染色で評価した。

2. それぞれの食餌が肝組織に及ぼす影響の評価

HE 染色、Sirius Red 染色で肝組織の脂肪化・線維化を評価した。また透過電子顕微鏡でミトコンドリアの形態を評価した。

3. それぞれの食餌が血液生化学的に及ぼす影響の評価

体重や空腹時血糖値を測定し、ALT や TG は ELISA で測定した。

【結果】

1. MtDNA copy number は HFD 群（6 週 13,047 \pm 3,308, 10 週 12,288 \pm 1,325）と比較して MCD 群（6 週 6,417 \pm 1,979, 10 週 5,961 \pm 1,642）で有意に低かった（ $p < 0.01$ ）。RT-qPCR では HFD 群と比較して MCD 群では合成系（Pparg1a, Tfam, Nrf1, Nrf2, Keap1）、分解系（LC3B, Pink1）の遺伝子発現が亢進していた（ $p < 0.05$ ）。ウエスタンブロッティングでは 6 週における LC3B-II が遺伝子発現の結果と一致していた。8-OHdG は MCD 群、HFD 群ともに通常食群と比較すると亢進していたが、MCD 群と HFD 群の間で有意な差は認めなかった。HFD-R 群では HFD 群と比較すると有意に 8-OHdG は減少していた。以上より、mtDNA は HFD 群では維持され、MCD 群ではターンオーバーの亢進により減少することが推測された。また食事介入により HFD 群における酸化ストレスは可逆性であることが示唆された。

2. 組織像では、MCD 群、HFD 群ともに脂肪沈着を認め、MCD 群でのみ線維化を認めた。透過型電子顕微鏡では、MCD 群、HFD 群ともにメガミトコンドリアを認めたが、HFD-R 群でもメガミトコンドリアを認めた。

3. 体重は MCD 群で減少し、HFD 群で有意に増加していた。空腹時血糖値は MCD 群で有意に低く、ALT は MCD 群で有意に上昇し、経時的にも増加していた。TG は特徴的な変化は認めなかった。

【考察、結論】

MCD 群においては HFD 群と比較して有意に mtDNA copy number が減少し、生合成系の遺伝子発現も亢進していた。このことにより、これまで同じように用いられてきた NASH モデルマウスの違いを明らかにすることができた。この成果は、今後の NASH 研究において、対象を適切に選択することで、ヒトの NAFLD の病態に応じた治療法の確立のための正確な結果を求めるための基盤となる。今後、申請者らは mtDNA copy number の変化に基づく NASH バイオマーカーの確立を目指している。

審査結果の要旨

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）を研究する動物モデルとして、メチオニン・コリン欠乏食（MCD：methionine/choline-deficient diet）や高脂肪食（HFD：high-fat diet）投与マウスが使われてきた。しかしながら、これらのモデルの肝病態や代謝状態はヒトにおける NASH とは異なり、研究対象と目的に応じたモデルマウスを使用する必要がある。本研究では、これらのモデルマウスの肝細胞のミトコンドリア恒常性の違いを解明し、適切なモデルマウスを用いるための基盤を確立することを目的とした。

mtDNA コピー数は HFD 群と比較して MCD 群で有意に低下していた。またミトコンドリア生合成および分解に関わる遺伝子発現は、HFD 群と比較して MCD 群で亢進していた。一方で、mtDNA の酸化傷害は、MCD 群、HFD 群ともに通常食群と比較すると亢進していたが、MCD 群と HFD 群の間で有意な差は認めなかった。組織像では MCD 群、HFD 群ともにメガミトコンドリアを認めた。

これらの結果から、NASH モデル動物と考えられてきた MCD 群と HFD 群のミトコンドリア恒常性を解析す

ると明らかな違いがあると結論づけた。

NASH モデル動物の MCD 群と HFD 群のミトコンドリア恒常性を解析し、両群に明らかな違いがあることを明らかにした点に学位論文としての価値を認める。