

論文の内容の要旨

論文題目 ホルモン感受性リパーゼ(HSL)欠損マウスのストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルにおける、インスリン枯渇状態下での脂質代謝・糖代謝に関する研究

指導教員 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

高梨幹生

ホルモン感受性リパーゼ(HSL)はマクロファージ、副腎、精巣および卵巣などでコレステロールエステル(CE)を加水分解する主要な酵素であるが、同時に脂肪組織や骨格筋で中性脂肪を加水分解する酵素としても機能している。HSLの制御に関わるホルモンは複数知られているが、このうち、カテコラミン、ACTH、グルカゴンなどはHSLの活性を促進し、逆にインスリンは活性を抑制する。野生型のラットにおいてストレプトゾトシンにより糖尿病を誘発したモデルでは、HSLの発現量や活性が増加することがすでに報告されている。しかし、HSL欠損動物を用いてストレプトゾトシンにより糖尿病を誘発したモデルでの検討はこれまで報告例がなく、HSLが存在せず且つインスリンが枯渇した条件下での脂質代謝・糖代謝については未解明となっていた。

HSL欠損マウスのストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルにおける、脂肪組織や肝臓、筋肉などでの組織学的検討や、中性脂肪・遊離脂肪酸・ケトン体など各種血清データの比較検討をすることで、HSLの生体内における機能に新たな知見を加えること、またそれを通して脂質代謝のカスケードやインスリン抵抗性のメカニズム、ケトアシドーシスの成因などに対して新たな知見を加えることを目的に本研究を行った。

HSL欠損マウスは当研究室で作成され、C57B6/Jをback groundとし、10回以上戻し交配されたものを用いた。週令10~13週のオスの野生型マウス、HSL欠損マウスについて、それぞれストレプトゾトシン投与群と非投与群の計4群に分けて研究を行った。

ストレプトゾトシンは24時間の絶食とした後、100 $\mu\text{g/g}$ body weight腹腔内投与した。投与後は再び自由摂食とした。これを1日おいて2回行った。2回目の投与の翌日までに随時血糖が350 mg/dlを超えた個体を糖尿病マウスとして選別した。ストレプトゾトシンは投与する直前に50 mmol/lのクエン酸ナトリウム溶液(pH : 4.5)に5 mg/mlとなるように溶解してから使用し、対照のための非投与群には溶媒のみの投与を行った。

ストレプトゾトシンへの感受性、体重の推移、血糖の推移などについては野生型マウスとHSL欠損マウスの間で有意差は認めなかった。

7日目に解剖して各種臓器を摘出した。ストレプトゾトシン投与群では非投与群に対し、野生型マウスでは白色脂肪組織の重量が約90%減少したが、HSL欠損マウスでは50~60%の減少に留まった。ストレプトゾトシン投与群における野生型マウスとHSL欠損マウスの比較では、皮下白色脂肪組織(p=0.02)、精巣周囲白色脂肪組織(p=0.03)、褐色脂肪組織(p=0.02)いずれも有意にHSL欠損マウスで重量が重かった。また、組織標本像の観察からは、ストレプトゾトシン投与群において野生型マウスでは小型の細胞が著しく増加しており、細胞径の平均は約40%減少したのに対し、HSL欠損マウスでは約20%の減少に留まることが確認された。

ストレプトゾトシン投与前(day0)と、day13を比較すると、遊離脂肪酸は野生型マウスでは 577.1 ± 208.2 mEq/mlから 1330.6 ± 259.5 mEq/mlと約2.3倍に増加したのに対し、HSL欠損マウスでは 293.1 ± 20.4 mEq/mlから 544.9 ± 120.4 mEq/mlと約1.9倍の増加に留まった。中性脂肪は野生型マウスでは 80.2 ± 3.8 mg/dlから 305.0 ± 123.6 mg/dlと約3.8倍に増加したのに対し、HSL欠損マウスではday13までは変化はなく、その後day22までに増加を認めるものの 96.8 ± 29.5 mg/dlから 177.5 ± 6.6 mg/dlと約1.8倍の増加に留まった。しかしその後、数ヶ月経過すると野生型マウスでは次第に遊離脂肪酸・中性脂肪がいずれもHSL欠損マウスと同程度まで減少する様子が観察された。ケトン体の主

要成分である β ヒドロキシ酪酸は、野生型マウスでは $135.2\pm 9.0 \mu\text{mol/l}$ から $475.9\pm 51.5 \mu\text{mol/l}$ と約 3.5 倍に増加したのに対し、HSL 欠損マウスでは $133.6\pm 20.4 \mu\text{mol/l}$ から $373.7\pm 167.2 \mu\text{mol/l}$ と約 2.8 倍の増加に留まった。

精巣周囲白色脂肪組織でのノーザンブロットからは、HSL 欠損マウスでは HSL と並んで中性脂肪を分解する主要な酵素である *adipose triglyceride lipase* (ATGL) の発現が低下していること、DGAT-1、FAS、SCD-1 などの脂肪合成系酵素の発現も弱いことが確認された。

インスリン耐性試験(ITT)では、ストレプトゾトシン投与前では、0 分値は野生型マウス : $170.4\pm 24.8 \text{ mg/dl}$ 、HSL 欠損マウス : $183.1\pm 29.7 \text{ mg/dl}$ であり有意差は認めなかった($p=0.23$)。インスリン投与後、血糖は速やかに低下し、いずれも 30 分値の野生型マウス : $101.8\pm 17.7 \text{ mg/dl}$ 、HSL 欠損マウス : $103.4\pm 21.1 \text{ mg/dl}$ が最低値となった。最低値は両群間に有意差は認めなかった($p=0.83$)。しかしその後血糖が回復する際に、野生型マウスでは 120 分値が $181.0\pm 34.7 \text{ mg/dl}$ とインスリン投与前の値に回復したのに対し、HSL 欠損マウスでは 120 分値は $146.0\pm 31.2 \text{ mg/dl}$ であり、最低値から 53% の回復に留まった($p=0.01$)。これは、ストレプトゾトシン投与後の試験でも同傾向であり、ストレプトゾトシンの投与の前後で両遺伝子型間での血糖推移の傾向に変化は認めなかった。

脂肪組織内での遊離脂肪酸は ATGL や HSL が 1 分子のトリアシルグリセロール(TG)をそれぞれ 1 分子のジアシルグリセロール(DG)と遊離脂肪酸に分解することでまず生じるが、野生型マウスでは次いで HSL が 1 分子の DG をそれぞれ 1 分子のモノアシルグリセロール(MG)と遊離脂肪酸に分解する工程が進行し、ここでも遊離脂肪酸が生じる。脂肪組織において DG の分解活性を持つ酵素は HSL のみであることが知られており、従って HSL 欠損マウスでは DG を分解することができず、脂肪細胞内に蓄積していくこととなる。

インスリン枯渇条件下では糖の正常な代謝ができないことを受けて脂質の利用が亢進するが、野生型マウスでは脂質の利用が比較的円滑に進むのに対し、HSL 欠損マウスでは DG を分解できないために貯蔵脂肪の利用が進まず、脂肪組織重量が保たれたと考えられる。一方で、HSL 欠損マウスでは ATGL の発現が低下していたことから、このために TG を分解する能力が弱く、貯蔵脂肪の利用が進まない可能性も考えられた。ATGL の関与については今後さらに検

討を加える必要があると考えられた。

ストレプトゾトシンを投与した HSL 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて遊離脂肪酸や中性脂肪、ケトン体の量が少ないことについては、第一義には脂肪細胞における脂質分解が進まず、遊離脂肪酸が生じにくいことが理由であると考えられる。しかし一方で、解剖所見からは day7 には、野生型マウスにおける脂肪組織はすでに著しく萎縮していたが、この時期を過ぎても遊離脂肪酸や中性脂肪は高値を維持していた。これらは day186 までには HSL 欠損マウスと同程度にまで改善して来るが、ケトン体は高値を持続した。仮にこれらの一連の物質の濃度上昇の大部分が貯蔵脂肪の分解に由来すると考えた場合、day7 までに脂肪組織がほとんど萎縮してしまっていることと矛盾が生じる。解剖学的な脂肪組織の萎縮と、生化学的な血清中の中性脂肪や遊離脂肪酸、ケトン体の上昇との間に時間差があることから、数ヶ月に渡って持続するこれらの物質の濃度上昇は、脂肪組織からの流入というよりは、インスリン枯渇に伴う lipoprotein lipase(LPL)活性の低下など他の要因が関与しているものと考えられた。

ITT において、後半の血糖回復期に野生型マウスと HSL 欠損マウスで差が生じることは、今回の研究で明らかとなった。HSL 欠損マウスでは副腎において、ACTH 刺激によるコルチコステロンの合成が低下していることが知られている。HSL 欠損マウスで血糖の回復が遅れることは、コルチコステロンによる糖新生の量に差が生じ、これが血糖の差となって現れたものと推測された。

今後検討を加え、HSL 欠損マウスにおけるインスリン枯渇下での脂肪組織重量の減少抑制、中性脂肪やケトン体の上昇抑制のメカニズムを解明することにより、インスリン依存状態の糖尿病患者のケトアシドーシスや脂質異常症の新たな治療法に繋がられるものと期待された。また、HSL 欠損マウスで血糖回復が遅れることから、この現象とコルチコステロン量、あるいはコルチコステロンによる糖新生量との関連が証明されれば、ステロイド糖尿病の治療に繋がられるものと期待された。