

綜 説

α 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR α): 脂肪肝疾患との関連

田中直樹* 青山俊文

信州大学大学院医学系研究科加齢適応医科学系独立専攻代謝制御学分野

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPAR α): The Association with Pathogenesis of Fatty Liver Disease

Naoki TANAKA and Toshifumi AOYAMA

*Department of Metabolic Regulation, Institute of Aging and Adaptation,
Shinshu University Graduate School of Medicine*

Key words: nuclear receptor, mitochondrial β -oxidation, oxidative stress, steatohepatitis, hepatitis C virus

核内受容体, ミトコンドリア β 酸化, 酸化ストレス, 脂肪肝炎, C型肝炎ウイルス

はじめに

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor: PPAR) はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内受容体の一つであり, α , β (δ), γ の3型が存在する¹⁾²⁾。ペルオキシソームは極長鎖脂肪酸の β 酸化や胆汁酸合成を司る細胞小器官であるが, 様々な化学物質 (フィブラート系抗高脂血症剤, フタル酸エステル類, 除草剤, 脂肪酸, アセチルサリチル酸など) の投与によりペルオキシソームが増殖することが古くから知られていた (図1)。これらのペルオキシソーム増殖剤をマウスやラットに投与すると肝腫大が生じ, 肝臓の様々な遺伝子の発現や酵素活性, 代謝状態が急速かつ劇的に変化する。さらに年余に亘り継続投与すると, 肝硬変を経ずに肝細胞癌が発生する。ペルオキシソーム増殖剤による遺伝子転写調節機構の説明として, ペルオキシソーム増殖剤をリガンドとする受容体の存在が想定された。1990年, IssemannとGreen³⁾がマウス肝臓からPPAR (後のPPAR α) のクローニングに成功し, それをきっかけとしてPPARの研究は飛躍的に発展した。さらにLeeら⁴⁾に

より作製されたPPAR α ノックアウトマウスの解析により, ペルオキシソーム増殖剤によるペルオキシソーム増殖や肝腫大, 肝発癌などがPPAR α を介した現象であることが判明した。PPAR遺伝子改変動物の作製とその詳細な解析により, PPARの生体での役割が徐々に解明されつつある。本稿ではPPAR,

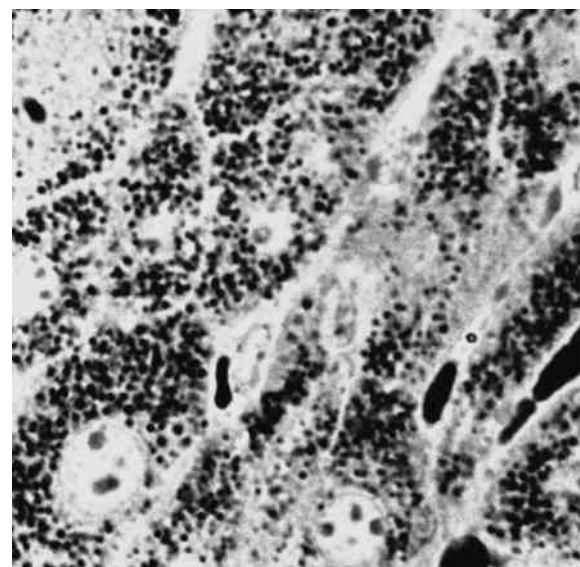


図1 ペルオキシソームの増殖
ペルオキシソームが黒い点のように見える (マウス肝臓, カタラーゼに対するDAB染色)。

* 別刷請求先: 田中 直樹 〒390-8621
松本市旭3-1-1 信州大学大学院代謝制御学分野

特に PPAR α の機能, そして最近注目を浴びつつある脂肪肝疾患 (fatty liver disease) との関連について概説したい。

Ⅰ PPAR の活性化と遺伝子転写調節機構

ステロイドホルモン受容体スーパーファミリーは, リガンド非結合状態での受容体の局在により 2 種類に分類される。グルココルチコイド受容体やエストロゲン受容体はリガンドの結合により細胞質から核内に移行する。これに対し PPAR, 甲状腺ホルモン受容体, ビタミン D 受容体はリガンド非結合状態でも核内に存在する。これらの多くはレチノイド X 受容体 (retinoid X receptor: RXR) とヘテロダイマーを形成しうる。PPAR は自身で 2 量体を形成できないため, RXR とのヘテロダイマー (PPAR-RXR) の形で存在する。肝臓ではともに α 型が多いため, ほとんどが PPAR α -RXR α の形で存在している⁵⁾。

PPAR の活性化, 標的遺伝子の転写調節機構にはリガンド依存性, 非依存性の 2 通りがある。リガンド非依存性の活性化は, PPAR 自身のリン酸化により生じる⁶⁾。PPAR はインスリン存在下において mitogen-activated protein kinase (MAPK) によるリン酸化を受け活性化する。PPAR γ はインスリンによるリン酸化では活性化するが, 成長因子によるリン酸化にて不活化すると報告されている。しかし大きく問題になるのはリガンド依存性活性化であり, その程度もより強力である。

PPAR は核内受容体であるため, リガンドは核膜を通過する物質でなくてはならない。PPAR のリガンドとなる物質は極めて多く, 現在判明しているだけでも 200 種以上存在する。

図 2 に PPAR の活性化, 遺伝子転写調節機構を示した。リガンド非結合状態では PPAR-RXR ヘテロダイマーに nuclear receptor corepressor, silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor などのコリプレッサーが結合しており, PPAR-RXR ヘテロダイマーの余計な活性化を阻害している。PPAR, RXR にそれぞれのリガンドが結合すると PPAR-RXR ヘテロダイマーは安定化かつ活性化し, コリプレッサーが解離する。活性化した PPAR-RXR ヘテロダイマーが標的遺伝子の転写開始点の上流に存在するペルオキシソーム増殖剤応答領域 (peroxisome proliferator response element: PPRE) に結合すると, 標的遺伝子のクロマチン構造が変化し, 核内に存在する cAMP response element binding-protein binding protein, PPAR γ coactivator-1 などのコアクチベーターが結合しやすくなる。コアクチベーターはそれ自身の持つアセチル化能によって, あるいはアセチルトランスフェラーゼと複合体を形成することによってヒストンをアセチル化し, クロマチンを緩める。それにより他の転写因子や RNA ポリメラーゼが標的遺伝子のプロモーター領域に結合しやすくなり, 転写が開始される。このように PPAR の活性化から機能発現まで, 様々な因子が複雑に関与している¹⁾。

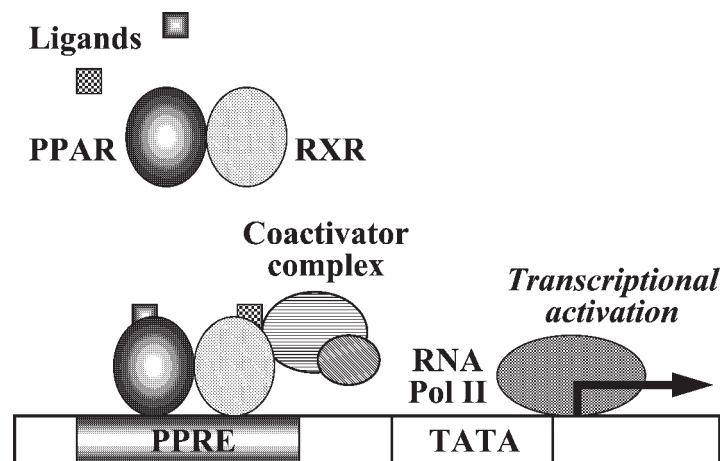


図2 PPAR の機能発現機構

PPRE: ペルオキシソーム増殖剤応答領域, TATA: 転写開始点
RNA Pol II: RNA ポリメラーゼ II。詳細は本文参照。

II PPAR の標的遺伝子

PPAR-RXR ヘテロダイマーが結合する PPRE は、AGGTCA の塩基配列が 1 塩基をはさんで同方向に並んだ AGGTCA-n-AGGTCA のダイレトリピート構造をとる。表 1 に PPRE を有する PPAR α の標的遺伝子を示したが⁷⁾、ペルオキシソーム β 酸化の律速酵素であるアシル CoA オキシダーゼ (acyl-CoA oxidase: AOX), ミトコンドリア β 酸化系の律速酵素中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase: MCAD), リポ蛋白リパーゼなど、脂肪酸代謝に関係した分子種が多い。これは PPAR α が肝臓や心臓, 消化管などの脂肪酸酸化の盛んな臓器 (多くのATPを必要とする臓器) に多く存在することからも容易に理解できる。また細胞内外での脂質輸送に関係するアポリポ蛋白 A I, AII, 肝臓型脂肪酸結合蛋白 (liver fatty acid-binding protein: L-FABP) や脂肪酸トランスポーター (fatty acid transport protein: FATP) なども PPRE を有し, PPAR α によって発現が調節されている。この他にもプロモーター領域での PPRE の存在が同定されていないものの, PPAR α により転写調節を受けていると考えられる分子種は既に50以上知られており, 極めて広範囲に及ぶ。今後の研究により, PPAR-RXR ヘテロダイマーがその転写活性に強く影響を及ぼしている分子種は100を超えるものと推定される。

III PPAR により転写調節を受ける分子種

A PPAR α

PPAR α が脂質代謝に深く関与していることは前述した。肝臓での脂肪酸代謝における PPAR α の *in vivo* の役割を調べるために, 我々は PPAR α ノックアウトマウスを用いて肝細胞の脂肪酸代謝に関与する各蛋白の挙動を調べた⁸⁾。定常状態ではペルオキシソーム β 酸化能ではノックアウトマウスと野生型マウスに差はなかったが, ミトコンドリア β 酸化能ではノックアウトマウスにおいて野生型マウスの約40 % と低下していた。ミトコンドリア β 酸化系酵素12種のうち, 主要な 4 種の発現はノックアウトマウスにおいて定常的に著減していた。次に PPAR α 活性化剤であるクロフィブラートを両マウスに投与したところ, 脂肪酸 β 酸化能は野生型マウスで著明に増加したが, ノックアウトマウスでは変化がなかった。またクロフィブラート投与によりミトコンドリア, ペルオキシ

表 1 PPAR α に発現が制御されている分子種

PPRE identified	PPRE unidentified
Acyl-CoA oxidase	Acyl-CoA thioesterase
Apolipoprotein-A I, AII	c-Myc
Cytochrome P450 4A1	Cyclin D1
Fatty acid-binding protein	Fatty acid translocase (CD36)
Fatty acid transport protein	Epoxide hydrolase
Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase	Glucose-regulated protein-94

ソーム β 酸化系酵素18種のうち17種の発現が野生型マウスで強力に誘導されたが, ノックアウトマウスでは認められなかった。以上より, PPAR α の存在はミトコンドリア β 酸化の定常レベルの維持に大きな影響を与えており (図 3), フィブラート系薬剤は PPAR α の活性化を介してミトコンドリア β 酸化を著明に亢進させることが判明した。

ペルオキシソーム増殖剤を長期間投与すると肝肥大を来し, さらに肝発癌に至る。肝細胞癌で cyclin D1や c-Myc などの過剰発現が認められることが以前より報告されているが, Peters ら⁹⁾は, PPAR α の活性化がこれらの蛋白を誘導し, 肝細胞の細胞周期を促進させているのではないかと考えた。そこで彼らは野生型マウスと PPAR α ノックアウトマウスにフィブラート系薬剤を投与し, 細胞周期調節蛋白の挙動を調べた。定常状態ではノックアウトマウスと野生型マウスでの細胞周期調節蛋白の発現レベルに変化はなかった。一方, フィブラート系薬剤を投与すると野生型マウスでは cyclin D1, cyclin E, cyclin-dependent kinase (CDK) 2, CDK4, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)の発現が著明に亢進したが, ノックアウトマウスでは変化が見られなかった。この実験結果から PPAR α が細胞周期調節にも関与していることが明らかとなった。

さらに PPAR α は炎症のマスターレギュレーターである nuclear factor-kappa B (NF- κ B)を競合阻害することにより, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β , intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)などの発現を抑制する¹⁰⁾。血管内皮細胞においても NF- κ Bとの競合阻害により monocyte chemoattractant protein-1や vascular cell adhesion molecule-1の発現を低下させる。Delerive ら¹¹⁾は

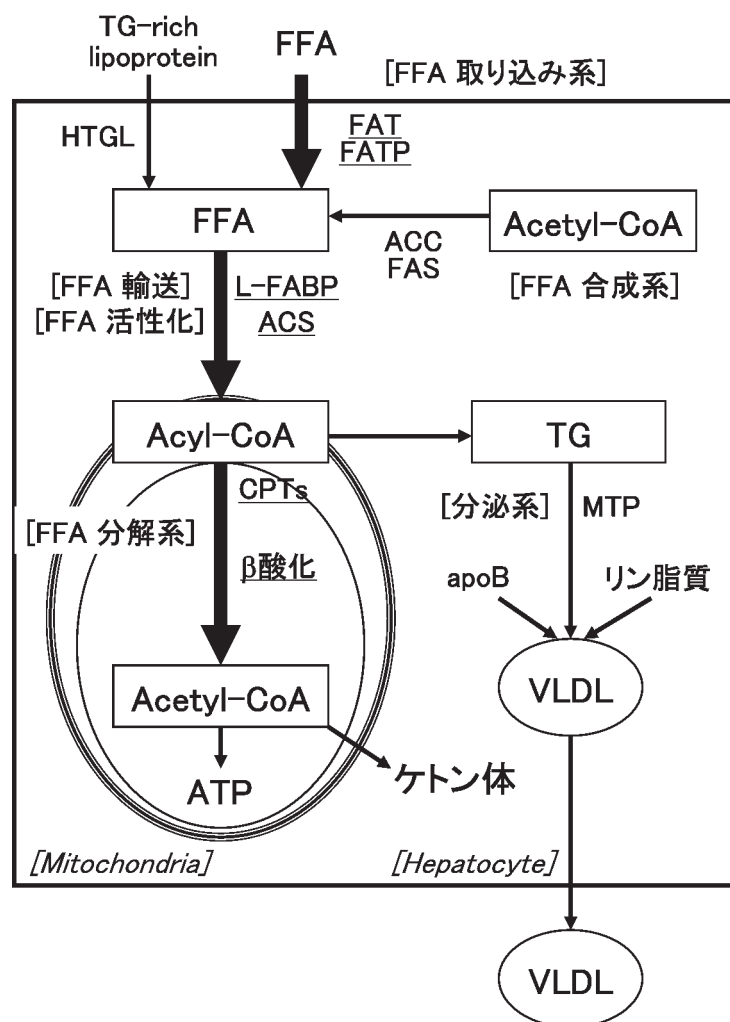


図3 肝細胞における脂肪酸代謝

下線や太い矢印は PPAR α の活性化により転写が増加する遺伝子、活性化する経路をそれぞれ表す。
 ACC, acetyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; FAT, fatty acid translocase; FATP, fatty acid transport protein; HTGL, hepatic triglyceride lipase; FFA, free fatty acid; L-FABP, liver fatty acid-binding protein; ACS, acyl-CoA synthase; CPTs, carnitine palmitoyltransferase I and II; TG, triglyceride; MTP, microsomal transfer protein; apoB, apolipoprotein B; VLDL, very-low-density lipoprotein.

PPAR α リガンドが PPAR α を介して NF- κ B の阻害蛋白である I κ B α を誘導することを示した。これらは PPAR α の抗炎症作用を説明しうる。

B PPAR β

PPAR β の標的遺伝子としてアシルCoAシンターゼが候補とされているが、未だ確定していない。PPAR β ノックアウトマウスでは脂肪組織での脂肪酸トランスロカーゼ (fatty acid translocase: FAT) の発現が低下していたが¹²⁾、他の分子種の挙動については明らかでない。

C PPAR γ

PPAR γ は白色脂肪組織において脂肪酸をトリグリセリドとして貯蔵する際に重要な役割を担っている。

PPAR γ の標的遺伝子としてリポ蛋白リパーゼ (リポ蛋白の分解、脂肪酸遊離)、FAT (脂肪細胞への脂肪酸取り込み)、脂肪細胞脂肪酸結合蛋白 (脂肪酸輸送)、アシル CoA シンターゼ (脂肪酸の活性化)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (脂肪酸やトリグリセリド合成促進) などがある。また脂肪酸をトリグリセリドの形で保存する際に必要なグリセロールを合成するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、糖代謝の恒常性を保つグルコーストランスポーター 4 も PPAR γ の活性化により発現が亢進する。また PPAR γ の活性化により TNF- α やレプチンの産生が抑制されることも知られている。

PPAR γ はマクロファージにも豊富に存在する。動

脈硬化巣の泡沫細胞において PPAR γ が活性化されると FAT の発現は増加するが第二の LDL 受容体であるスカベンジャー受容体の発現は抑制される。また PPAR γ は NF- κ B を競合阻害して泡沫細胞をアポトーシスへと誘導し、マトリクスメタロプロテイナーゼ 9 の発現を抑制することにより動脈硬化巣を安定化させる。このように、PPAR γ リガンドはコレステロール逆転送系を活性化し抗動脈硬化作用を発揮する。

IV PPAR の機能発現に関与する因子

A PPAR アゴニスト, アンタゴニスト

PPAR アゴニストは数多く知られているが、その種類によって PPAR への親和度や PPAR の活性化の度合が異なる。一方、Sinal^ら¹³⁾ はマウスに強力な PPAR α リガンドと胆汁酸を同時に摂取させると、肝肥大や標的遺伝子の発現亢進が顕著に抑制されたと報告している。また *in vitro* で胆汁酸が PPAR α の活性化に必要なコアクチベーターのリクルートメントを抑制し、PPAR α の活性化を阻害することを示している。

B RXR アゴニスト

RXR アゴニストの代表は 9-シスレチノイン酸である。9-シスレチノイン酸は *in vitro* において PPARE を有するレポーター遺伝子を PPAR-RXR ヘテロダイマー依存性に活性化し、PPAR の標的遺伝子である L-FABP、アポリポ蛋白 AII の転写を亢進させる。RXR の合成リガンド LG000179 をマウスに投与すると、PPAR α リガンド投与時と同様、肝肥大や肝細胞でのペルオキシソーム増殖が見られた¹⁴⁾。これらから RXR アゴニストも PPAR-RXR ヘテロダイマーを活性化させ、PPAR の標的遺伝子の発現を調節する能力を持つことが理解できる。

C RXR

RXR は PPAR にとって唯一のパートナーである。PPAR とヘテロダイマーを形成する RXR の多寡が PPAR 自体、さらにその標的遺伝子に影響を与えることは十分予想される。Wan^ら¹⁵⁾ は肝臓での RXR α コンディショナルノックアウトマウスを作製、解析した。本マウスでは PPAR α mRNA が増加していたが、その標的遺伝子である L-FABP やチトクローム P450 4A1 の発現は低下していた。RXR α がいない状態では PPAR の標的遺伝子の発現に変化が生じることが示された例である。

D 他の核内転写因子との相互関係

多くの分子種は PPAR-RXR ヘテロダイマーによ

り転写活性が亢進する。しかしアポリポ蛋白 CIII では PPAR α アゴニストであるフェノフィブラートを投与するとその転写レベルが抑制される。これはアポリポ蛋白 CIII の転写を正に調節している hepatocyte nuclear factor-4 ホモダイマーの PPARE への結合を、PPAR が阻害することにより生じる。このように PPARE をめぐる他の核内受容体との競合により、遺伝子の転写活性が抑制されることもある。前述の PPAR による NF- κ B の抑制も、両蛋白間の競合阻害により生じる。

V 最近注目を集めている慢性肝臓病：脂肪肝疾患

以前からアルコールの長期摂取により脂肪肝、肝炎、肝硬変、肝細胞癌を来することが知られていた。さらに近年では非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) が我が国でも増加している。NAFLD とは「飲酒歴を有さないものの肝への脂肪沈着を認める疾患群」(いわゆる「脂肪肝」) であり、欧米では一般人口の約 30 % が NAFLD を有していると推測されている。NAFLD の多くは肥満、耐糖能異常、脂質異常症を始めとしたメタボリック症候群に起因しており、肥満や糖尿病とともに今後も世界的な増加が予想される疾患である¹⁶⁾¹⁷⁾。

「脂肪肝」は今まで良性であると信じられてきた(未だ信じられているかもしれない)が、脂肪肝の中に肝硬変や肝癌へと進行する病型が潜んでいることが明らかになってきた。信州大学でも非アルコール性脂肪肝の診断後 20 年で肝硬変、27 年目に肝細胞癌を発症した症例を経験している¹⁸⁾。1980 年、Ludwig^ら¹⁹⁾ は飲酒歴・薬剤服用歴・小腸バイパス手術歴のない者で、アルコール性肝障害に類似した肝生検所見を呈する 20 例を報告した。肝組織では中心静脈周囲の大滴性脂肪沈着、肝小葉内の炎症細胞浸潤、肝細胞の風船状変性 (ballooning)、マロリー小体、中心静脈周囲や肝細胞周囲の線維化を認めた。このようなアルコール性肝障害類似の病理像を呈する例を非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) と称した。Ludwig^ら の報告した 20 例中 18 例に肥満の合併が認められ、心血管病変、糖尿病、高脂血症の合併も認められた。肝臓病専門外来だけでなく、検診や肝臓以外の臨床現場においても NAFLD・NASH の患者に出会うことが多くなってきており、common disease としての認識が高まりつつある。

脂肪肝は肝細胞にトリグリセリドが蓄積した状態で

ある。トリグリセリドの前駆体である脂肪酸はデタージェント作用を有しており、脂肪酸の過剰蓄積は細胞膜やミトコンドリア外膜を傷害し、細胞を変性・アポトーシス・死へと導く（脂肪酸毒性）。さらに酸化ストレスを受け過酸化脂質を形成するが、それ自身も細胞傷害性に働く。よって脂肪肝の状態に炎症性サイトカイン、酸化ストレス、腸管由来のエンドトキシンなどの刺激（second hit）が加わることにより、脂肪肝炎へと進展し、肝硬変・肝癌に至るものと考えられている²⁰⁾。脂肪肝の全てが脂肪肝炎へ進行する訳ではないので、second hit の強烈さやその継続時間の長さ、second hit を受けやすい遺伝的素因などが NASH の発症に関連しているのかもしれない。

さらに C 型肝炎と脂肪肝の密接な関係も示されている。C 型慢性肝炎の病理学的特徴の一つに脂肪肝が挙げられるが²¹⁾、C 型肝炎ウイルス（hepatitis C virus: HCV）のコア蛋白を発現させたマウスでは著明な脂肪肝を呈することがわかっている²²⁾。そして HCV 感染は脂肪肝のみならずインスリン抵抗性・耐糖能異常^{23)–25)}や鉄代謝²⁶⁾²⁷⁾にも深く関係していると言われている。最近では C 型肝炎の代謝異常症²⁸⁾としての側面が注目を集めている。

このように脂肪肝を呈する疾患には様々な病態が含まれている（表 2）^{16)17)29)–31)}。一般に NAFLD・NASH とは肥満やメタボリック症候群に関連する非アルコール性脂肪肝疾患を指すことが多い。

Ⅶ アルコール性肝障害における PPARα の役割

脂肪肝疾患の代表にアルコール性肝障害が挙げられる。以前からエタノールは PPARα の発現を低下さ

せることが知られており³²⁾³³⁾、アルコール性肝障害の病態に PPARα が関与している可能性が予想された。そこで、我々は野生型マウス、PPARα ノックアウトマウスに 4 %エタノール含有液体食を 6 カ月間投与し、肝臓の変化を解析した³⁴⁾。野生型マウスでは軽度の脂肪肝が見られただけであったが、PPARα ノックアウトマウスでは脂肪肝だけでなく肝腫大、肝小葉への炎症細胞浸潤、肝細胞のアポトーシス、肝細胞周囲の線維化を認め、アルコール性肝障害患者に類似した病像を呈した。4 %エタノールを投与した PPARα ノックアウトマウスでは肝臓内の酸化ストレスの増加とそれに伴う apoptosis signaling-regulated kinase-1, p38 MAPK などのストレスキナーゼの活性化、NF-κB の活性化、TNF-α や ICAM-1 の産生亢進が見られ、抗酸化剤であるビタミン E を共投与するとこれらの異常が全て軽減された。以上より、肝細胞における PPARα の存在はアルコール摂取による酸化ストレスの増大、それに伴う肝細胞傷害を最小限に抑制していると考えられた。この結果を踏まえて、アルコール性肝障害を軽減する薬剤・機能食品の探索、PPARα 遺伝子多型とアルコール性肝障害との関連の解析を現在進めている。

Ⅶ HCV コア蛋白トランスジェニックマウスにおける脂肪肝発症機構

Moriya ら²²⁾は、HCV コア蛋白が肝細胞で定常的に発現されるトランスジェニックマウスを作製した。このマウスの極めて斬新な点は、コア蛋白の発現量に関して C 型慢性肝炎患者の肝臓と極めて類似した状況をマウス肝臓で作り出せたことである³⁵⁾。このマウスは通常飼育環境下でも 3 カ月齢から著明な脂肪肝²²⁾、耐糖能異常・インスリン抵抗性²³⁾を呈した。さらにこのマウスの脂肪肝は加齢に伴いさらに顕著となり、16 カ月齢以降にオスマウスにおいて高率に肝細胞癌が発生した³⁶⁾。本マウスの肝臓の脂質組成は C 型肝炎患者の肝組織のそれとほぼ同様であり³⁷⁾、肝細胞癌の発生様式も C 型慢性肝炎患者にみられる発癌形態に類似していた。脂肪肝、インスリン抵抗性の合併は慢性肝炎の中でも C 型肝炎に特徴的な現象である。よって本マウスは完璧ではないまでも、C 型肝炎の病態を比較的忠実に反映している動物モデルであるといえる。

HCV コア蛋白トランスジェニックマウスにおける脂肪肝発症機構の解析は、HCV による肝発癌機構、ひいては C 型肝炎患者の肝発癌機構を考える上で極め

表 2 脂肪肝を呈する主な疾患

肥満・メタボリック症候群・2 型糖尿病・脂質異常症 (狭義の NAFLD/NASH)
アルコール
C 型肝炎
低栄養 (protein-energy malnutrition)
：クワシオコル、吸収不良症候群
高カロリー輸液
外科手術後：小腸短絡術、小腸切除術、脾切除術
薬剤：タモキシフェン、アミオダロン、 副腎皮質ステロイド
先天性代謝疾患：ウイルソン病、ヘモクロマトーシス、 シトリン欠損症
内分泌疾患：視床下部・下垂体機能不全、 成長ホルモン分泌不全

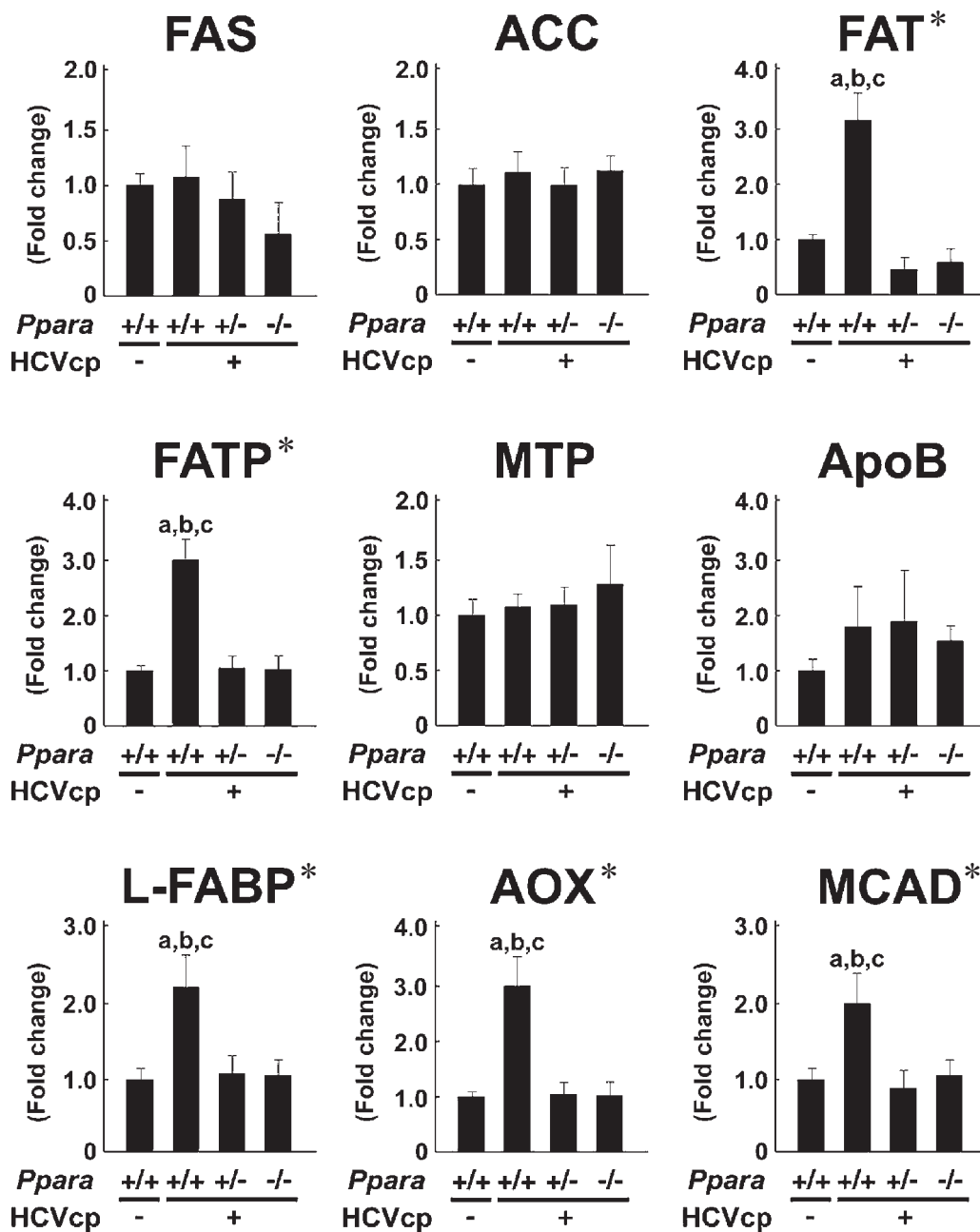


図4 HCV コア蛋白 (HCVcp) トランスジェニックマウスにおける脂肪酸代謝関連遺伝子の発現 (定量 RT-PCR 法)

略語は本文, 図3 参照。*は PPAR α の活性化により発現が増加する遺伝子を示す。

a, $P < 0.05$ vs. *Ppara* +/+ マウス, b, $P < 0.05$ vs. HCVcp: *Ppara* +/- マウス, c, $P < 0.05$ vs. HCVcp: *Ppara* -/- マウス

て重要である。Perlemuter ら³⁸⁾は本マウスにおいてミクロソーム転送蛋白 (microsomal transfer protein: MTP) の活性が低下していることを示し, 超低密度リポ蛋白 (very-low-density lipoprotein: VLDL) の放出障害が脂肪肝発症機構の一つであると報告した。我々は本マウスで血中脂肪酸を肝細胞に取り込むトランスポーター (FAT, FATP) の発現が増加していることを発見した (図4)³⁹⁾。代表的なペルオキシソ-

ム・ミトコンドリア β 酸化酵素の発現を解析したところ, HCV コア蛋白トランスジェニックマウスでは AOX, MCAD の発現レベルがともに有意に上昇していた (図4)。しかし実際の β 酸化能を調べると, ミトコンドリアにおける β 酸化能が本マウスで著明に低下していることが判明した (図5 A)。ミトコンドリアの形態を電子顕微鏡で観察すると, コア蛋白トランスジェニックマウスでは外膜が一部断裂しているミ

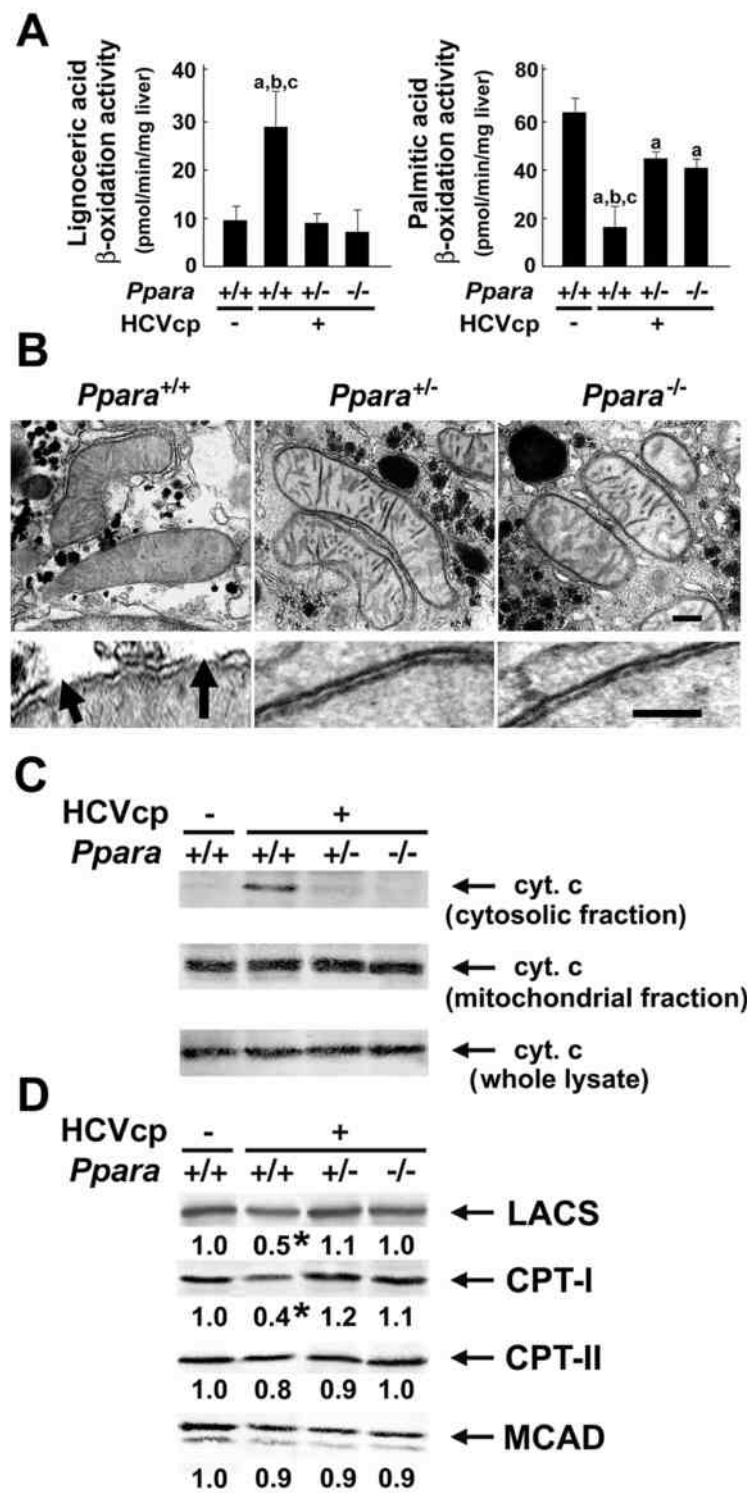


図5 HCV コア蛋白 (HCVcp) トランスジェニックマウスにおけるミトコンドリア機能 略語は本文，図3，4 参照。

A： β 酸化能の解析。HCVcp：*Ppara*+/+マウスではミトコンドリアで主に行われるパルミチン酸の分解が傷害されている。

B：ミトコンドリアの電子顕微鏡像。HCVcp：*Ppara*+/+マウスでミトコンドリア外膜の断裂が見られる（矢印）。

C：チトクロームC (cyt. c) のイムノブロット。HCVcp：*Ppara*+/+マウスで細胞質画分 (cytosolic fraction) への漏出が認められる。

D：ミトコンドリア画分を用いたイムノブロット。ミトコンドリア外膜や膜間腔に存在するLACS，CPT-Iの発現量がHCVcp：*Ppara*+/+マウスで著明に低下している。

LACS：long-chain acyl-CoA synthase, CPT：carnitine palmitoyltransferase.

トコンドリアが多く見られた (図 5 B)。さらに本マウスでは通常ミトコンドリア画分で検出されるミトコンドリア外膜, 内外膜間に存在する蛋白群 (cytochrome C, long-chain acyl-CoA synthase: LACS, carnitine palmitoyltransferase-I: CPT-I) が細胞質画分へ流出していた (図 5 C, D)。ミトコンドリア β 酸化では脂肪酸から変換されたアシル CoA がカルニチンを介してミトコンドリア外膜を通過することが極めて重要である。HCV コア蛋白によるミトコンドリア外膜の脆弱化, それに伴うミトコンドリア β 酸化機能不全が本マウスの脂肪肝形成に大きく関与していると考えられた³⁹⁾。

VIII HCV コア蛋白トランスジェニックマウス
における肝細胞癌発症機構

HCV コア蛋白トランスジェニックマウスでは脂肪酸のトランスポーター (FAT, FATP), β 酸化酵素 (AOX, MCAD) の上昇が見られたが (図 4), これらは PPAR α の代表的な標的遺伝子である⁷⁸⁾ (表 1, 図 3)。さらに本マウスではペルオキシソームの増殖も観察されており⁴⁰⁾, PPAR α の持続的活性化の存在が示唆された。これらの PPAR α 標的遺伝子の増加, ペルオキシソームの増殖は加齢に伴いさらに顕著となった⁴⁰⁾。

PPAR α の持続的活性化によりアポトーシスが抑制され, 細胞周期が亢進する。本マウスではPCNA陽性細胞が加齢に伴い増加していったが, アポトーシスに陥っている細胞数は変化しなかった。PCNAをはじめ cyclin D1, CDK4, c-Myc の発現も持続的に増加していた⁴⁰⁾。

また PPAR α の持続的活性化により AOX やチトクローム P450 4A1の発現が亢進するが, これらは酸化ストレスを産生する。本マウスでは肝臓内の過酸化脂質量, 酸化ストレスによる DNA 傷害のマーカーである8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 陽性肝細胞数が有意に多かった³⁹⁾。

PPAR α の持続的活性化は多中心性に肝細胞癌を発症させる⁹⁴⁾。HCV コア蛋白による肝発癌に PPAR α の持続的活性化が中心的役割を果たしているかどうかを調べるために, 我々は HCV コア蛋白を有する PPAR α ノックアウトマウス (HCVcp: *Ppara* -/-) ・ヘテロマウス (HCVcp: *Ppara* +/-) をそれぞれ作製し, 通常の HCV コア蛋白トランスジェニックマウス (HCVcp: *Ppara* +/+) と比較した。24カ月

齢で HCVcp: *Ppara* +/+マウスの約35 %に肝細胞癌の発生を認めたが, 他のマウスでは全く認めなかった (表 3)。HCV コア蛋白を有する PPAR α ノックアウトマウス, ヘテロマウスでは細胞周期の亢進 (cyclin D1, c-Myc, PCNA の増加), 酸化ストレスの増加 (8-OHdG 陽性細胞の出現) も見られなかった。AOX, MCAD, FAT などの PPAR α 標的遺伝子の発現やペルオキシソーム増殖の解析により, PPAR α ヘテロマウスではコア蛋白が存在しているものの, PPAR α の活性化が全く生じていないことが判明した (図 4)。以上から, HCV コア蛋白による肝発癌機構に PPAR α 自身ではなく, その持続的活性化が必須であることが判明した。

さらに意外なことに, PPAR α ノックアウトマウスやヘテロマウスではHCVコア蛋白によるミトコンドリア外膜の脆弱化, ミトコンドリア β 酸化の低下, そして脂肪肝が観察されなかった (図 4-6)。PPAR α の持続的活性化は HCV コア蛋白に引き起こされる脂肪肝の発症にも中心的役割を果たしていたのである。

このマウスから得られた事実は, HCV コア蛋白が存在しても PPAR α の持続的活性化さえ生じなければ脂肪肝や肝細胞癌を発症しないということである。C型肝炎患者において肝細胞癌の予防は極めて重要な課題である。PPAR α の異常な活性化を抑制することができれば, HCV 関連肝細胞癌の予防に応用できるかもしれない。

おわりに

PPAR α は脂質代謝だけでなく糖質代謝, 炎症, 動脈硬化, 細胞周期, アポトーシス, 発癌と様々な分野に影響を及ぼしている。「PPAR α の活性化は生体にとって有用である」との論調が多いが, HCV コア蛋白トランスジェニックマウスの例を踏まえると,

表 3 24カ月齢マウスにおける肝細胞癌発生率

HCV core protein	<i>Ppara</i>	Incidence (%)
-	+/+	0
-	+/-	0
-	-/-	0
+	+/+	35.3
+	+/-	0
+	-/-	0

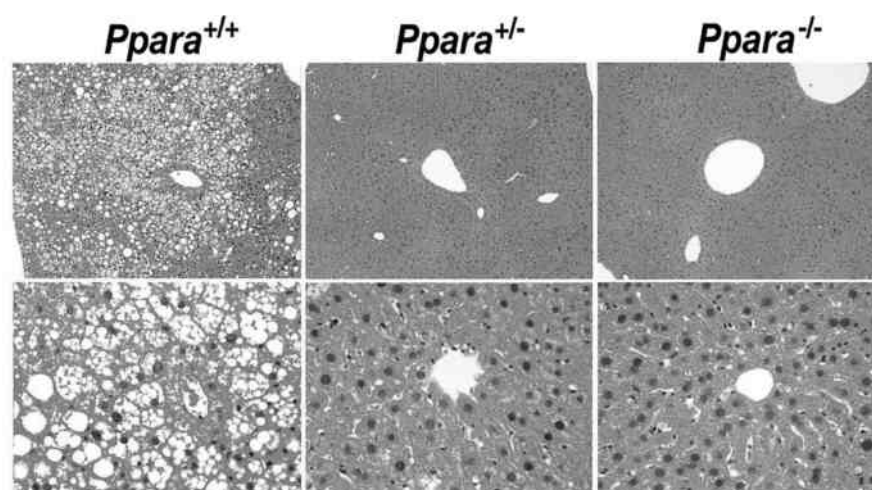


図6 HCV コア蛋白 (HCVcp) トランスジェニックマウスの肝組織
HCVcp: *Ppara*^{+/+}, HCVcp: *Ppara*^{-/-}マウスでは脂肪肝が見られない。

PPAR α の世界はそんなに単純ではなさそうである。
今後も NASH の病態解析・診断法とそれに基づく新

規治療法の開発^{42)–47)}, 肝臓を初めとする様々な臓器
における PPAR α の役割を解明していきたい。

文 献

- 1) Desvergne B, Wahli W : Peroxisome proliferator-activated receptor : nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20 : 649–688, 1999
- 2) 田中直樹, 青山俊文 : PPAR. *日本臨牀* 64 : 1089–1094, 2006
- 3) Issemann I, Green S : Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347 : 645–650, 1990
- 4) Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ : Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15 : 3012–3022, 1995
- 5) Tanaka N, Hora K, Makishima H, Kamijo Y, Kiyosawa K, Gonzalez FJ, Aoyama T : In vivo stabilization of nuclear retinoid X receptor α in the presence of peroxisome proliferator-activated receptor α . *FEBS Lett* 543 : 120–124, 2003
- 6) Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA : The peroxisome proliferator-activated receptor α is a phosphoprotein : regulation by insulin. *Endocrinology* 137 : 4499–4502, 1996
- 7) Mandard S, Muller M, Kersten S : Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Life Sci* 61 : 393–416, 2004
- 8) Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ : Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *J Biol Chem* 273 : 5678–5684, 1998
- 9) Peters JM, Aoyama T, Cattley RC, Nobumitsu U, Hashimoto T, Gonzalez FJ : Role of peroxisome proliferator-activated receptor α in altered cell cycle regulation in mouse liver. *Carcinogenesis* 19 : 1989–1994, 1998
- 10) Pineda Torra I, Gervois P, Staels B : Peroxisome proliferator-activated receptor α in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol* 10 : 151–159, 1999
- 11) Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B : Induction of IkB α expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor- α activators. *J Biol Chem* 275 : 36703–36707, 2000
- 12) Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ : Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-

- activated receptor β (δ). *Mol Cell Biol* 20 : 5119-5128, 2000
- 13) Sinal CJ, Yoon M, Gonzalez FJ : Antagonism of the actions of peroxisome proliferator activated receptor- α by bile acids. *J Biol Chem* 276 : 47154-47162, 2001
 - 14) Lenhard JM, Lancaster ME, Paulik MA, Weiel JE, Binz JG, Sundseth SS, Gaskill BA, Lightfoot RM, Brown HR : The RXR agonist LG100268 causes hepatomegaly, improves glycaemic control and decreases cardiovascular risk and cachexia in diabetic mice suffering from pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetologia* 42 : 545-554, 1999
 - 15) Wan YJ, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, Flores M, Postic C, Magnuson MA, Chen J, Chien KR, French S, Mangelsdorf DJ, Sucov HM : Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor α as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 20 : 4436-4444, 2000
 - 16) Ono M, Saibara T : Clinical features of nonalcoholic steatohepatitis in Japan : Evidence from the literature. *J Gastroenterol* 41 : 725-732, 2006
 - 17) 田中直樹, 清澤研道 : 非アルコール性脂肪性肝炎. *肝臓* 43 : 539-549, 2002
 - 18) Nagaya T, Tanaka N, Komatsu M, Ichijo T, Sano K, Horiuchi A, Joshita S, Umemura T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Aoyama T, Kiyosawa K, Tanaka E : Development from simple steatosis to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma : a 27-year follow-up case. *Clin J Gastroenterol*, 2008 (in press)
 - 19) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ : Nonalcoholic steatohepatitis : Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55 : 434-438, 1980
 - 20) 田中直樹, 青山俊文 : NASH と PPAR. *医学のあゆみ* 206 : 381-384, 2003
 - 21) Lefkowitz JH, Schiff ER, Davis GL, Perrillo RP, Lindsay K, Bodenheimer HC Jr, Balart LA, Ortego TJ, Payne J, Dienstag JL : Pathological diagnosis of chronic hepatitis C : a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 104 : 595-603, 1993
 - 22) Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K : Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 78 : 1527-1531, 1997
 - 23) Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K : Hepatitis C virus infection and diabetes : direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 126 : 840-848, 2004
 - 24) Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Itou M, Sumie S, Nagao Y, Yanagimoto C, Harada S, Koga H, Sata M : Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 102 : 570-576, 2007
 - 25) Tanaka N, Nagaya T, Komatsu M, Horiuchi A, Tsuruta G, Shirakawa H, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Aoyama T, Kiyosawa K, Tanaka E : Insulin resistance and hepatitis C virus : a case-control study of non-obese, non-alcoholic and non-steatotic hepatitis virus carriers with persistently normal serum aminotransferase. *Liver Int* 28 : 1104-1111, 2008
 - 26) Tanaka N, Kiyosawa K : Phlebotomy : a promising treatment for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 39 : 601-603, 2004
 - 27) Tanaka N, Horiuchi A, Yamaura T, Komatsu M, Tanaka E, Kiyosawa K : Efficacy and safety of 6-month iron reduction therapy in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis : a pilot study. *J Gastroenterol* 42 : 49-55, 2007
 - 28) Koike K, Moriya K : Metabolic aspects of hepatitis C viral infection : steatohepatitis resembling but distinct from NASH. *J Gastroenterol* 40 : 329-336, 2005
 - 29) Tanaka N, Horiuchi A, Yokoyama T, Kawa S, Kiyosawa K : Pancreatic exocrine insufficiency : a rare cause of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 103 : 245-246, 2008
 - 30) Tanaka N, Yazaki M, Kobayashi K : A lean man with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5 : A32, 2007
 - 31) Komatsu M, Yazaki M, Tanaka N, Sano K, Hashimoto E, Takei YI, Song YZ, Tanaka E, Kiyosawa K, Saheki T, Aoyama T, Kobayashi K : Citrin deficiency as a cause of chronic liver disorder mimicking non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 49 : 810-820, 2008
 - 32) Galli A, Pinaire J, Fischer M, Dorris R, Crabb DW : The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor α is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver. *J Biol Chem* 276 : 68-75, 2001
 - 33) Fischer M, You M, Matsumoto M, Crabb DW : Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonist

- treatment reverses PPAR α dysfunction and abnormalities in hepatic lipid metabolism in ethanol-fed mice. *J Biol Chem* 278 : 27997-28004, 2003
- 34) Nakajima T, Kamijo Y, Tanaka N, Sugiyama E, Tanaka E, Kiyosawa K, Fukushima Y, Peters JM, Gonzalez FJ, Aoyama T : Peroxisome proliferator-activated receptor α protects against alcohol-induced liver damage. *Hepatology* 40 : 972-980, 2004
 - 35) Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Matsuura Y, Miyamura T, Kimura S, Koike K : Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. *J Med Virol* 59 : 141-145, 1999
 - 36) Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K : The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4 : 1065-1067, 1998
 - 37) Moriya K, Todoroki T, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Ishibashi K, Takayama T, Makuuchi M, Watanabe K, Miyamura T, Kimura S, Koike K : Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C : analysis in transgenic mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 281 : 1207-1212, 2001
 - 38) Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Brechot C : Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion : a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 16 : 185-194, 2002
 - 39) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T : PPAR α activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest* 118 : 683-694, 2008
 - 40) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T : Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor α in transgenic mice : implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 122 : 124-131, 2008
 - 41) Reddy JK, Azarnoff DL, Hignite CE : Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature* 24 : 397-398, 1980
 - 42) Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T : Highly-purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 42 : 413-418, 2008
 - 43) Sugiyama E, Ishikawa Y, Li Y, Kagai T, Nobayashi M, Tanaka N, Kamijo Y, Yokoyama S, Hara A, Aoyama T : Eicosapentaenoic acid lowers plasma and liver cholesterol levels in the presence of peroxisome proliferators-activated receptor alpha. *Life Sci* 83 : 19-28, 2008
 - 44) Li Y, Sugiyama E, Yokoyama S, Jiang L, Tanaka N, Aoyama T : Molecular mechanism of age-specific hepatic lipid accumulation in PPAR α (+/-) : LDLR (+/-) mice, an obese mouse model. *Lipids* 43 : 301-312, 2008
 - 45) Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Kamijo Y, Hara A, Hu R, Li G, Li Y, Nakamura K, Gonzalez FJ, Aoyama T : Cholesterol-lowering effect of bezafibrate is independent of peroxisome proliferator-activated receptor activation in mice. *Biochem Pharmacol* 76 : 108-119, 2008
 - 46) Tanaka N, Ichijo T, Okiyama W, Mutou H, Misawa N, Matsumoto A, Yoshizawa K, Tanaka E, Kiyosawa K : Laparoscopic findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 26 : 32-38, 2006
 - 47) Tanaka N, Tanaka E, Sheena Y, Komatsu M, Okiyama W, Misawa N, Muto H, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Horiuchi A, Kiyosawa K : Useful parameters for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis with mild steatosis from cryptogenic chronic hepatitis in the Japanese population. *Liver Int* 26 : 956-963, 2006

(H 20. 8. 5 受稿)