

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14726

研究課題名(和文)フォーカストアレイ分析による脂肪肝炎発症メカニズムの解析と食品の影響評価

研究課題名(英文) Analysis for nonalcoholic steatohepatitis development mechanism using focused microarray analysis aimed for elucidation of food effect.

研究代表者

宮澤 陽夫 (Miyazawa, Teruo)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：20157639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝は肝癌や肝硬変につながる肝炎の危険因子で、肥満に伴う非アルコール性脂肪肝の増加が問題となっている。本研究では多因子が影響する肝炎発症メカニズムの解析と食品成分による予防研究のため、これを可能にする動物モデルの構築と解析法について検討した。高脂肪食摂取で血漿肝障害マーカーの増大と脂肪肝が見られたラットの肝臓mRNAをフォーカストアレイ解析に供したところ、初期の炎症サイトカインの発現上昇と、抗酸化系経路への影響が観察された。これらの結果は多因子が影響し合う肝炎発症メカニズムの研究への、フォーカストアレイ解析の応用の有用性を示しており、さらなる検討により肝炎発症機序解明が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver is a risk factor for steatohepatitis, hepatic cirrhosis and hepatoma, thus increasing nonalcoholic fatty liver disease related with obesity is becoming a problem. This study examined animal model and analysis method for the elucidation of the multifactorial mechanism leading nonalcoholic steatohepatitis development, and prevention by food component. Liver mRNA of rat examined by the focused microarray analysis. High fat diet fed rats with high value of serum liver disorder marker and fatty liver accompanied the increment of mRNA expression of cytokine related on initial stage of the inflammation, along with influence of several antioxidative enzymes. These results show the application possibility of focused microarray analysis on the investigation of nonalcoholic steatohepatitis development caused by the multifactorial mechanism. Further study will enable elucidation of steatohepatitis development mechanism.

研究分野：食品学

キーワード：ラット フォーカストアレイ 脂肪肝 過酸化脂質

1. 研究開始当初の背景

我が国では中高年の肥満者の増加に伴い、アルコールの過剰摂取を原因としない非アルコール性脂肪肝 (NAFLD; nonalcoholic fatty liver disease) 罹患者が増えている。肝細胞内にトリグリセリドが過剰に蓄積する脂肪肝のうち、アルコールの過剰摂取や薬物の影響を原因としない非アルコール性脂肪肝炎 (NASH; nonalcoholic steatohepatitis) は、従来、肝障害への進行のない単純性脂肪肝と考えられてきた。しかし、最近の研究では、NAFLD 患者の 10~15% は壊死、炎症、繊維化を伴う NASH へと進展し、さらに重篤化した場合は、肝硬変、肝癌へと移行していく可能性が指摘されている。

NAFLD から NASH への発症機序として、two-hits theory が支持されており、過栄養、肥満、糖尿病などによる脂肪沈着を first-hit とし、続く炎症性サイトカイン、酸化ストレス、鉄の沈着、エンドトキシンなどの second-hit により NASH まで進展すると考えられている。食品成分の中には、例えば肝臓への脂肪蓄積抑制効果と抗酸化作用を持つトコトリエノールのように、first-hit と、second-hit の双方を予防できる可能性をもつものがあり、食品による NASH 発症予防が期待される。しかし、多因子が関わる NASH 発症メカニズムは不明な点が多く、食品成分の NASH 抑制機能の研究には、NASH を再現した実験動物のモデルの作製と、NASH の発症に影響する様々な代謝系や制御系が関与する複雑なメカニズムを解析できる測定系の確立が必須である。

これまで脂肪肝・肝障害モデルとして、四塩化炭素投与、コリン欠乏食、高コレステロール・高脂肪食、高スクロース食、db/db マウス、ob/ob マウス、遺伝子組換え動物など、様々な実験動物モデルが使われてきたが、これらのモデルは重篤な肝障害モデルであり、食品による NASH 発症抑制研究に適切とは言いがたい。F344 ラットは高脂肪食で肝臓脂質をためやすいことが指摘されている。当研究室でも 3 週間の高脂肪食飼育による肝臓のトリグリセリド蓄積が観察されている (Lipids 2012, pp 471-481)。さらに、同条件で肝臓過酸化脂質 (PCOOH) が上昇することも観察されており、本モデルでは NASH 発症の second-hit の誘引因子の一つである酸化ストレスについての検討も可能であると期待できる。

また、NAFLD は生体への脂質沈着により発生し、その多くは可逆性の良性疾患であるが、何らかの原因をきっかけに NASH へと症状が進行する。この NASH 発症誘引因子には、炎症性サイトカイン、酸化ストレス、エンドトキシンが候補に挙げられ、多岐にわたる代謝・制御系が NASH 発症に関わっていると予測されるため、その作用機序の解明には極めて多項目の遺伝子発現解析が必要になる。このような多様な因子の解析には DNA マイクロアレイの網羅的解析による探索的研究手

法が用いられてきた。しかし、DNA マイクロアレイは数万~数千の遺伝子の網羅的解析が可能な半面、データの解釈が煩雑になる、精度が犠牲になる、高コストのため多検体分析が難しい、などの問題点をもつ。本研究では、解析対象が数百から数十遺伝子程度であり、精度・再現性に優れる特徴をもつフォーカストアレイに着目した。比較的 low コストのフォーカストアレイ分析は、解析するサンプル数を増やし、動物種、週齢、飼料の種類などの要因について検討できる利点があり、NASH 発症機序解明の有力なツールになると期待できる。

すなわち、これらの問題を解決するには、NAFLD から NASH への進展過程を再現した実験動物モデルの作製と、NASH 発症に関わる遺伝子群の働きをより詳細に調べることの出来る測定系の開発が必須となると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は食品成分による NASH と肝障害の予防であり、このために必要な NASH 研究に有用な動物モデルおよび解析系の構築が完成されれば、NASH と肝障害の予防研究の一助になる。特に多様な因子を一気に解析するフォーカストアレイ DNA チップの利用は、NAFLD から NASH への進展を解析する上で、非常に強力なツールになりうる。

そこで本研究では、食品による NASH 発症抑制研究に適切な NASH モデルの作製について検討を行った。これまでの研究から F344 ラットへの 3 週間の高脂肪食給餌が、肝臓にトリグリセリドを蓄積することは明らかになっている。本研究では NASH への進展のため飼育期間を 12 週間に延長した。しかし、内臓脂肪の蓄積は見られたものの、肝臓の脂質蓄積のさらなる増大はみられず、血漿の肝障害マーカーの上昇も見られなかった。そこで、飼料組成と飼育開始週齢についてさらなる検討を行った。また、本モデル系の NASH 発症メカニズムを明らかにする目的で NASH 発症に関わる遺伝子群を搭載したラット用フォーカストアレイのカスタマイズドチップを作製し、本研究で作製した NASH モデルについて解析を行うことで、網羅的発現解析システムの構築の検討を行った。

3. 研究の方法

高脂肪食摂取脂肪肝モデルラットの作製 普通食と脂肪食での比較

雄性 F344 ラット (11 週齢) を 1 週間予備飼育後、各群 8 匹ずつ、普通食群 (D12450K: 10 kcal% Fat)、高脂肪食群 (D12451: 45 kcal% Fat) に分け、12 週間自由摂食させた。飼料はラードと大豆油を油脂源とした市販固形食を使用した。試験飼育終了後、一晚絶食し、血漿や肝臓、内臓脂肪を採取し各種分析に供した。

高脂肪食条件での週齢の比較

雄性 F344 ラット (6 週齢 (若齢) 又は 20 週齢 (成熟)) を 1 週間予備飼育後、全ての群に高脂肪食を与え、12 週間自由摂取させた。飼料は AIN93G 処方の油脂源を高リノール酸サフラワー油とし、さらにコーンスターチの一部を置き換え脂質含量を 40 kcal% としたものを使用した。飼育終了後、一晚絶食し、血漿や肝臓、内臓脂肪を採取し各種分析に供した。

フォーカストアレイカスタムチップの作製および解析

肝臓での中性脂肪の取り込み、運搬、生合成、分解系、分泌系に関わる蛋白および各調節因子の遺伝子に加え、解糖・糖新生、インスリンシグナル、酸化ストレス、炎症マーカーに関わる遺伝子群のリストアップを行い、190 の関連遺伝子を搭載したラット専用のフォーカストアレイカスタムチップを作製した。得られたチップについて高脂肪食条件で飼育した若齢ラットと成熟ラットの比較を行った。

4. 研究成果

高脂肪食摂取脂肪肝モデルラットの作製 普通食との比較

12 週間の市販高脂肪食摂取で F344 ラットの内臓脂肪重量は普通食群に比べ有意に増加した。肝臓総脂質量は肝臓乾湿重量の 6% と、脂肪肝の傾向は見られたものの、普通食群との間に差はみられなかった。また肝障害マーカーである血漿 AST、ALT は正常範囲であった。一方、酸化ストレスの指標である肝臓 PCOOH 濃度は、高脂肪食摂取群で有意に増大し、ラードを油脂源とした脂質の過剰摂取が肝臓の酸化ストレスに何らかの影響をあたえていることが示唆された。以上の結果から、F344 ラットに市販高脂肪食を与える飼育条件では、NASH 発生は起こらないか、極めて長い飼育時間がかかり普通食との違いも小さくなると予想された。しかし、ラットの代表的な second hit である酸化ストレスについては高脂肪食で高くなる傾向が見られた。以上より、F344 ラットへの高脂肪食給餌は、肝臓の酸化ストレスを伴う脂肪肝という点では本研究が目指す動物モデルに合致するものの、肝臓脂質量は対照と差が見られず、肝障害マーカーに変化が見られないことから、さらなる検討が必要であると考えられた。

高脂肪食条件での週齢の比較

我が国において NAFLD および NASH の有病率は特に中高年男性で高く、年齢が危険因子の一つと考えられる。そこで性成熟に達する前の 7 週齢から飼育を開始した若齢ラットを対照に設定し、20 週齢のリタイアラットを成熟ラットとして比較を行った。成熟ラットは、若齢ラットに比べ、試験飼育開始時および終了時の体重が有意に大きく、腸間膜脂肪

重量も高値を示した。また、肝臓脂質量も成熟ラットで 9% と対照の 6% より高い値を示した。肝臓 PCOOH 濃度は成熟ラットで増大し、対照である若齢ラットの約 1.6 倍の値を示した (J. Oleo Sci., *in press* (2017))。さらに肝障害マーカーの血漿 ALT 量は成熟ラット、若齢ラットでそれぞれ 133 ± 50 U/mL, 49 ± 10 U/mL と成熟ラットで有意に高い値を示した。この ALT 値と肝臓の酸化ストレスレベルは有意な相関を示し、特に成熟ラットで明確な関連性が観察された (図 1)。

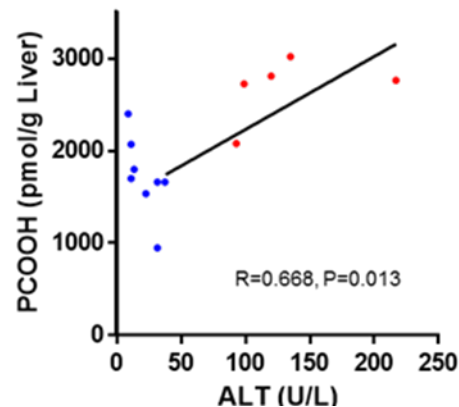


図 1 肝障害マーカーと酸化ストレスの関係
若齢ラット (n=8)、成熟ラット (n=5)

フォーカストアレイカスタムチップの作製および解析

若齢ラットおよび成熟ラット間で血漿 ALT に有意な差が観察されたことから、これらの肝臓より採取した mRNA について脂質代謝、酸化ストレス、炎症に関連した遺伝子を搭載したチップによる解析を行った。その結果、二群間で有意な差が観察されたものは 190 遺伝子中 27 遺伝子であった (図 2)。

Symbol	Y3	Y4	Y5	Y6	M3	M2	M4	M5
Acaca	0.00	0.02	-0.05	0.04	-0.15	-0.18	-0.17	-0.21
Acp	0.00	0.02	-0.05	0.04	-0.15	-0.18	-0.17	-0.21
Adipoq	0.00	0.02	-0.05	0.04	-0.15	-0.18	-0.17	-0.21
Adipoq2	0.07	0.25	-0.12	-0.25	-0.37	-0.19	-0.66	-0.68
Aggr1a	0.09	0.09	-0.09	-0.11	-0.21	-0.31	-0.51	-0.18
Aggr2	0.00	0.02	-0.05	0.04	-0.15	-0.18	-0.17	-0.21
Cyp27a1	0.13	-0.12	0.02	-0.04	0.36	0.27	0.40	0.11
Hmgcr	0.09	0.05	-0.09	-0.05	-0.55	-0.06	-0.50	-0.56
Hr12	-0.13	0.28	-0.07	-0.13	-0.46	-0.25	-0.86	-0.28
Per1	0.25	-0.17	-0.28	0.14	-0.74	-0.73	-0.93	-0.46
Tnf	-0.04	-0.03	-0.03	0.07	-0.08	-0.19	-0.12	-0.15
Ucp1	-0.06	0.11	-0.08	0.02	-0.17	-0.13	-0.25	-0.38
Acox5a0	0.11	-0.15	-0.08	0.09	0.21	0.21	0.27	0.19
Appa1	0.04	0.30	-0.48	0.04	-0.41	-0.46	-1.22	-0.91
Appa2	-0.10	0.14	-0.17	0.10	-0.35	-0.24	-0.24	-0.34
Fas	-0.01	0.08	-0.03	-0.04	-0.17	-0.13	-0.24	-0.21
Gg11	0.00	-0.02	0.03	-0.01	-0.37	-0.17	-0.02	-0.21
Gg17	-0.08	0.02	-0.19	0.22	-0.19	-0.40	-0.21	-0.37
Gst3	0.05	0.01	-0.05	-0.04	-0.07	-0.19	-0.14	-0.15
Gstm1	-0.11	-0.11	0.25	-0.08	0.45	0.37	0.35	0.26
Gstm2	-0.06	-0.12	0.12	0.05	0.27	0.19	0.18	0.15
Gstm6	-0.20	-0.14	0.15	0.15	0.31	0.49	0.40	0.43
Gstm3	-0.27	-0.62	0.61	-0.01	0.80	1.12	1.80	1.58
Irf1	0.16	0.10	-0.09	-0.19	-0.14	-0.30	-0.32	-0.25
Irf2	0.07	0.00	0.04	-0.11	0.19	0.16	0.13	0.03
Hfe212	0.01	-0.24	0.11	0.09	0.41	0.81	0.66	0.37
Hfe21	0.04	0.00	-0.04	0.00	0.09	0.23	0.07	0.08
Morae2	-0.16	0.14	-0.07	0.08	-0.18	-0.17	-0.45	-0.38
Pdha1	-0.39	0.59	-0.15	-0.38	-1.18	-1.02	-1.95	-1.05
Pdha2	0.21	0.40	-0.36	-0.42	-0.50	-0.90	-1.51	-0.71
Fabo1	-0.08	0.46	-0.19	-0.32	-0.52	-0.52	-1.24	-0.77

図 2 若齢群と高年齢群間で有意な発現差が見られた遺伝子

このうち、抗酸化系酵素 glutathione S-transferase, theta 3 (Gst3) は発現差の平均値が 1 以上で、成熟群が対照群に対し有意に高かった。同様に glutathione S-transferase の mu 1 (Gstm1)、mu 2 (Gstm2)、mu 6 (Gstm6) も成熟

群で有意な上昇を示した。また、tumor necrosis factor (Tnf)は成熟群で有意に低下しており、成熟群の肝障害抑制を示唆する遺伝子量の変化が観察された。一方、炎症関連遺伝子では interleukin 1 alpha (Il1a)と nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (Nfkb1)が成熟ラット群での有意な上昇が観察された。これに関連して chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2)は若齢群の一匹で極端な低値を示したため有意ではなかったものの、成熟群で増加する傾向を示した。また成熟群では glutathione peroxidase 3 (Gpx3)や gamma-glutamyltransferase 7 (Ggt7)といった抗酸化酵素の有意な低下と、酸化ストレス源である arachidonate 5-lipoxygenase activating protein (Alox5ap)の上昇が観察された。しかし、肝炎の進展で発現が認められる抗炎症性の interleukin 10 (Il10)や transforming growth factor, beta 1 (Tgfb1)の発現量は低値で差はみられず、炎症および酸化に関連する遺伝子の発現差は Gstt3 以外、1 以下であった。これらの結果と、成熟ラットで肝臓脂質の蓄積および対照より高い血漿 ALT 値から、今回使用した高脂肪食摂取成熟ラットの肝臓は、脂肪肝炎の初期状態であると示唆された。

なお、Gstt3 以外で発現差 1 に近い変化が見られた遺伝子は fatty acid desaturase 1 (Fads1)、fatty acid desaturase 2 (Fads2)、fatty acid binding protein 1, liver (Fabp1)、apolipoprotein A-I (Apoa1)で、いずれも成熟群が有意に低かった。これらは多価不飽和脂肪酸合成と脂質輸送に関連する遺伝子であり、高脂肪食摂取開始時期または解剖時週齢の違いが、脂質代謝に影響することを示している。この結果は、今回の目的である NAFLD および NASH との関係性は低いと考えられるが、フォーカストアレイの解析により、飼育条件の違いによる遺伝子群の変化が明確に示されることを表している。

以上、本研究では食品成分による NASH と肝障害の予防研究に必要な動物モデルおよび解析系の構築の検討を行った。高脂肪食を与えた飼育開始週齢が高い成熟ラットでは、酸化ストレスの増大を伴う肝臓脂肪蓄積と血漿肝障害マーカーの増大が見られた。フォーカストアレイによる解析より、成熟ラットでは初期の炎症サイトカインの発現上昇とともに、抗酸化系経路の惹起が示された。これらの結果は多因子が影響し合う NASH 発症メカニズムの研究へのフォーカストアレイ解析の応用の有用性を示しており、今後、詳細な条件検討を行うことで、NASH 発症機序解明が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Hayasaka S, Kimura F, Kato S, Shimizu N,

Ito J, Higuchi O, Izumisawa K, Miyazawa T, Nakagawa K High fat diet feeding to mature Fischer 344 rats induces increased phospholipid peroxidation in the liver. *J. Oleo Sci.*, *in press* (2017)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 早坂 咲, 加藤 俊治, 木村 ふみ子, 仲川 清隆, 泉澤 勝弘, 宮澤 陽夫, 高脂肪食給与が F344 ラット肝臓過酸化リン脂質 (PCOOH) へ及ぼす影響、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、武庫川女子大学(神戸) 2016 年 5 月 13-15 日
2. Hayasaka S, Kato S, Kimura F, Nakagawa K, Izumisawa K, Miyazawa T, Fat deposition and lipid peroxidation in the liver of mature rats fed high-fat diet, ACN2015 12th Asian Congress of Nutrition パシフィコ横浜(横浜), 2015.5.12-18

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA, Teruo)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：20157639

(2)研究分担者

仲川 清隆 (NAKAGAWA, Kiyotaka)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：80361145

木村 ふみ子 (KIMURA, Fumiko)
尚絅学院大学・総合人間科学部・准教授
研究者番号：50321980