

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07796

研究課題名(和文)腸管上皮を考慮した非アルコール性脂肪肝を予防する食物質探索評価系の構築及び解析

研究課題名(英文)Development of assay system to search for food substances which prevent non-alcoholic fatty liver disease considering intestinal absorption

研究代表者

薩 秀夫 (SATSU, Hideo)

前橋工科大学・工学部・准教授

研究者番号：80323484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物培養細胞を用いて非アルコール性脂肪肝(NAFLD)の予防が期待される食品成分を探索するin vitro評価系を構築し、実際に探索・解析をおこなった。ヒト肝モデルHepG2細胞を、遊離脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸の混合物(Mix)またはフルクトースをそれぞれ含む培地で培養した結果、遊離脂肪酸Mixおよびフルクトース添加によって脂肪滴蓄積及び細胞内トリグリセリド量の増加が確認され、in vitro NAFLDモデル系を構築した。そこで10種以上のミャンマー生薬抽出物について検討した結果、2種のメタノール粗抽出物が遊離脂肪酸Mixによる脂肪滴蓄積を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では近年患者数の増加がみられる非アルコール性脂肪肝(NAFLD)の動物培養細胞を用いたin vitroモデル系を構築した。構築した評価系を用いることで、NAFLDへの予防が期待される食品成分など機能性成分を簡便にかつ幅広く探索することが可能となった。さらに腸管上皮モデルCaco-2細胞との共培養系を用いることで、機能性成分の腸管吸収をも考慮した評価系への応用にも成功した。また本研究でNAFLD予防作用が期待される機能性成分が見出された場合、構築したin vitroモデル系を用いてその作用メカニズムを分子・遺伝子レベルで解析することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop in vitro assessment system to search for food components which could prevent non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) after intestinal absorption and also analyze the identified functional food components. Human hepatic HepG2 cells were cultured with the medium containing fatty acid Mix (palmitic acid and oleic acid) and fructose, respectively. Consequently, incubation of HepG2 cells with fatty acid Mix or fructose resulted in the formation of intracellular lipid droplets and also accumulation of intracellular triglyceride. Next we examined the effect of several kinds of herbal extracts from Myanmar on fatty acid Mix-induced lipid droplets. We found that two kinds of Myanmar-derived herbal extracts significantly suppressed the formation of intracellular lipid droplets by fatty acid Mix.

研究分野：食品機能学

キーワード：NAFLD HepG2 Caco-2 coculture phytochemical

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の欧米化に伴い、生活習慣病およびその複合した病態であるメタボリックシンドロームの増加が大きな社会的関心事となっている。過剰な栄養素・エネルギー摂取とそれに伴う肥満、メタボリックシンドロームに対する対策、特にその予防は国民的・社会的に大きな関心事となっている。このような背景の中、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性脂肪肝症状に類似した肝機能障害である非アルコール性脂肪肝(非アルコール性脂肪性肝疾患、non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)が注目されている。NAFLDは世界的に患者数が増加している肝疾患であり、肝疾患では最も患者数の多い common disease の一つである。NAFLDは日本においても“肝臓の生活習慣病”とも呼ばれ、その患者数は増加傾向にあり、1000万人以上と推定されている。さらに近年ではNAFLD患者数は中高年者に加えて若年者の増加もみられ、食生活の乱れ・さらなる欧米化が原因と推測されている。

NAFLDを含めた脂肪肝は、かつては良性疾患と思われていたものの、最近では非アルコール性肝炎(NASH)に進展し、炎症が悪化すると肝線維化や肝硬変、さらには肝細胞がんへと悪化のステージが進むことが知られている。また近年の研究で、NAFLDは肝臓疾患のみならず、高血圧や糖尿病といった様々な生活習慣病の発症とも密接な関係があることがわかってきている。したがって、肝硬変・肝細胞がんといった重篤な肝疾患に加え多様な生活習慣病を予防する観点からも、NAFLDを食物質によって予防・改善することは大いに期待される。

そこで本研究では、ヒト肝モデル細胞を用いた *in vitro* NAFLD 評価系を構築し、NAFLDを予防・改善する食品成分・機能性成分を探索・解析することを目的とする。従来の食品成分によるNAFLD抑制に関する研究は、ある特定の食品成分について主に動物モデルを用いた解析例が大半である。本研究では、NAFLD状態を誘導した肝モデル細胞を用いた *in vitro* 評価系を構築することから、多様な食品成分を用いた網羅的なスクリーニングが可能であり、NAFLDを予防・改善しうる新規な食品成分・機能性成分の発見も大いに期待できる。

2. 研究の目的

上記のような背景をふまえて本研究では、NAFLDを予防・改善する食品成分の探索評価系の構築および探索・解析を大きな目的として、以下の具体的な目的を持って進めることとする。

(1) ヒト肝モデル HepG2 細胞を用いて様々な *in vitro* NAFLD モデル系を構築し、構築したモデル系を用いて NAFLD の予防・改善が期待される食品成分など機能性成分の網羅的探索をおこなう。

(2) 見出された機能性成分の特性や抽出物の場合には活性成分の単離・同定、並びにそのNAFLD抑制作用のメカニズムを分子・細胞レベルで明らかにする。また腸管上皮モデル細胞との共培養系を用いて、見出された機能性成分が実際に腸管を透過して *in vitro* NAFLD モデル細胞に作用・抑制しうるか検討する。

3. 研究の方法

(1) HepG2 細胞を用いた Oil red O 染色

ヒト肝モデル細胞として、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を使用した。HepG2 細胞を 24 ウェルプレートに播種した。一定時間培養後、通常培地に遊離脂肪酸のパルミチン酸 (palmitic acid; PA)、オレイン酸 (oleic acid; OA)、PA と OA の混合物 (脂肪酸 Mix) をそれぞれ含む培地を加えて、さらに 24 時間インキュベートした。細胞表面を PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド/PBS を加えて 1 時間インキュベートし、細胞を固定化した。パラホルムアルデヒドを除いて Milli-Q で 2 回洗浄後、0.5% Oil Red O/60% 2-プロパノール溶液を加えて 37℃ で 30 分間細胞を染色した。その後、染色液を除き、60% 2-プロパノールで洗浄後、細胞の染色を観察した。さらに、2-プロパノールを細胞に加えて Oil Red O を溶出させ、490 nm の吸光度を測定することで脂肪蓄積量を評価した。

(2) real-time PCR 解析

HepG2 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、24 時間後に脂肪酸 Mix を含む培地に置き換えた。一定時間インキュベート後、RNA iso Plus を用いて RNA を回収し、PrimeScript RT Master Mix を用いて cDNA を合成した。各種遺伝子の primer と TB Green Premix Ex Taq を用いて 7300 Real-Time PCR System により解析をおこなった。

(3) 細胞内トリグリセリド (TG) 量の測定

HepG2 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、24 時間後に脂肪酸 Mix を含む培地に置き換えた。さらに 24 時間インキュベートした後、HepG2 細胞をセルスクレーパーで回収して 1% Triton-X-100 溶液で可溶化した。得られたサンプル中に含まれる TG 量は、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ(GPO)-3,5-ジメトキシ-N-エチル-N-(2'-ヒドロキシ-3'-スルホプロピル)-アニリンナトリウム(DAOS)法を用いた TG 測定キットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) HepG2 細胞を用いた *in vitro* NAFLD モデル系の構築

HepG2 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、翌日 5% の脂肪酸不含 BSA を含む無血清培地に

置き換えて培養した。24 時間後に PA、OA、脂肪酸 Mix (PA : OA = 1 : 1) を 0.5mM となるようにそれぞれ添加し、インキュベートした。さらに 24 時間後に Oil red O 染色をおこなった結果、コントロールに比べ脂肪酸 Mix 添加群では脂肪滴の蓄積が観察された。

しかしながら、この評価系では顕著な脂肪滴の蓄積が安定して観察されなかったため、さらに評価系の改良を試みた。HepG2 細胞を 24 ウェルプレートに播種した翌日に、BSA+無血清培地で培養する方法から、通常培地に脂肪酸を添加し、24 時間インキュベートする方法に変更した。そのインキュベート後に Oil red O 染色をおこなった結果、脂肪酸による脂肪滴の蓄積がより顕著に安定して確認された (図 1)。この改良した評価系では、HepG2 細胞の播種から Oil red O 染色までの評価にかかる日数を 4 日から 3 日に短縮でき、脂肪滴の蓄積もより観察しやすくなった。また、添加した脂肪酸の中で、脂肪酸 Mix 添加群で脂肪滴蓄積が最も強く観察されたため、次に添加する脂肪酸の濃度を検討した。その結果、0.5mM より高濃度にするると細胞毒性を生じたため、以降の実験では脂肪酸濃度を 0.5mM 以下でおこなうこととした。さらに脂肪酸 Mix の PA と OA を混合する濃度比率を検討したところ、濃度比率は PA : OA が 1 : 4 の際に最も顕著な脂肪滴の蓄積が誘導されることを見出した。以上より、PA と OA の 1 : 4 の混合物である脂肪酸 Mix を 0.5mM の濃度で添加することを最適条件とし、以降 *in vitro* NAFLD 誘導肝モデル細胞系として用いることとした。

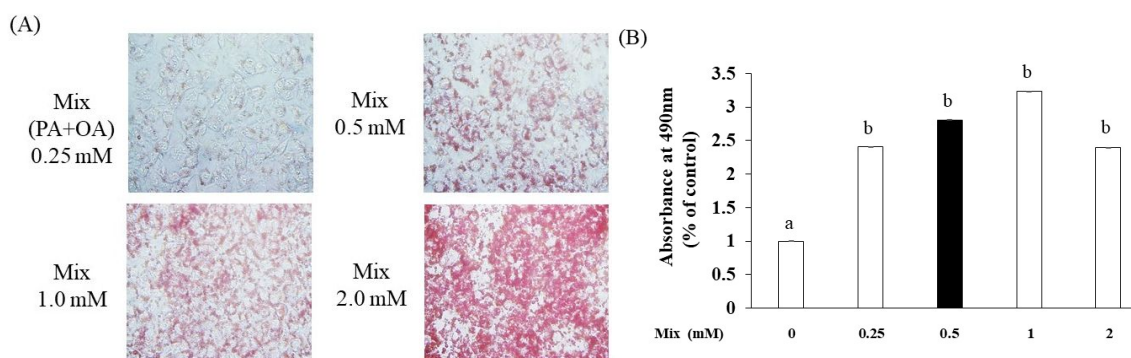


図 1 遊離脂肪酸 Mix による HepG2 細胞における脂肪滴蓄積 (A)Oil red O 染色画像 (B)吸光度のグラフ

HepG2 細胞に遊離脂肪酸 Mix 0.25、0.5、1.0、2.0 mM をそれぞれ含む培地を加えて 24 時間インキュベート後、Oil red O 染色に供した。各値は平均値±SE、各群 n=4、異符号間に有意差あり(Tukey's test $p < 0.05$)

(2) 脂肪酸による *in vitro* NAFLD モデル系を抑制する機能性成分の解析

構築した *in vitro* NAFLD 誘導肝モデル細胞系を用いて、ミャンマー生薬粗メタノール抽出物 13 種で脂肪滴蓄積を抑制する抽出物の探索をおこなった。その結果、*B.superba* (B.s) 及び *D.carota* (D.c) の粗メタノール抽出物が脂肪滴蓄積を抑制することが見出された。中でも D.c はより低濃度で脂肪滴の蓄積を抑制したため、以降の実験では D.c について解析を進めていくこととした。D.c 粗メタノール抽出物から得られた 3 種の抽出物 (ヘキサン、酢酸エチル、メタノール) の脂肪滴蓄積に対する影響を検討した。その結果、脂肪酸 Mix による脂肪滴蓄積はヘキサン抽出物と酢酸エチル抽出物で抑制された一方で、メタノール抽出物では抑制されなかった。さらに、酢酸エチル抽出物を $\text{CH}_3\text{Cl}_3:\text{MeOH}$ を用いて分画した 12 個のフラクション (Fr.) について検討したところ、ある種の Fr. で脂肪滴蓄積の抑制が見出された。現在さらに、この画分に含まれる成分を解析中である。

(3) Fructose による *in vitro* NAFLD モデル系を抑制する機能性成分の解析

一方で、HepG2 細胞に Fructose を 100 mM 添加し 24 時間インキュベートした結果、Oil Red O 染色による脂肪滴の蓄積が観察された。そこで、Fructose による脂肪滴蓄積を抑制するフィトケミカルを探索した結果、脂肪滴蓄積はある種のメトキシフラボノイドによって抑制される傾向がみられた。

(4) *in vitro* NAFLD モデル系における炎症性サイトカイン発現の解析

脂肪酸 Mix あるいは Fructose が炎症性サイトカインである interleukin-8 (IL-8) 及び tumor necrosis factor- α (TNF- α) の mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。その結果、IL-8 と TNF- α の mRNA 発現量は脂肪酸 Mix 及び Fructose 添加によっていずれも有意に増加した。そこで、脂肪酸 Mix とミャンマー生薬粗メタノール抽出物より分画された Fr. もしくは Fructose とある種のメトキシフラボノイドを添加し IL-8 と TNF- α の mRNA 発現量を検討した。その結果、Fr. 及びメトキシフラボノイドともに、亢進された IL-8 mRNA 発現を抑制する傾向がみられた。

(5) ヒト腸管上皮モデル Caco-2 細胞とヒト肝モデル HepG2 細胞との共培養系を用いた NAFLD モデル系の構築と食品成分の作用

遊離脂肪酸などが肝臓で作用するためには、腸管上皮を透過する必要がある。そこで腸管吸収を考慮するため、Caco-2 細胞と HepG2 細胞の共培養系を用いることとした。Caco-2 細胞を透過性膜上に 2 週間培養し、腸管上皮様に分化させた。また HepG2 細胞を 12 ウェルプレートに 24 時間培養した後、Caco-2 細胞を培養した透過性膜インサートを HepG2 細胞を培養したプレート上にのせ、さらに Caco-2 細胞の管腔側に脂肪酸 Mix を 0.5、1.0、2.0mM で添加した。48 時間後に Caco-2 細胞を除き、HepG2 細胞に、Oil red O 染色をおこなった。その結果、HepG2 細胞において 2.0mM の脂肪酸 Mix を添加した際に脂肪滴の蓄積が確認された。同様に Fructose を Caco-2 細胞の管腔側に添加し、48 時間後に Caco-2 細胞を除いて HepG2 細胞に Oil red O 染色をおこなった。その結果、脂肪滴の蓄積が観察された。さらに Fructose と上記(3)で見出されたメトキシフラボノイドを同時に Caco-2 細胞の管腔側に添加した結果、HepG2 における脂肪滴蓄積は抑制された。

これより、Caco-2 細胞と HepG2 細胞との共培養系を用いて腸管吸収を考慮した *in vitro* NAFLD モデル系を構築することに成功するとともに、一部の食品成分は腸管上皮を透過して肝細胞における脂肪滴蓄積を抑制することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 波津優花、山本晃久、本松由依、薩秀夫	4. 巻 23
2. 論文標題 動物培養細胞を用いた非アルコール性脂肪肝のin vitroモデル系の構築	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 前橋工科大学研究紀要	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Satsu, H.	4. 巻 25
2. 論文標題 Regulation of Detoxification Enzymes by Food Components in Intestinal Epithelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Sci. Technol. Res.	6. 最初と最後の頁 149-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/fstr.25.149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Satsu, H., Gondo, Y., Shimanaka, H., Watari, K., Fukumura, M., Shimizu, M.	4. 巻 1155
2. 論文標題 Effect of Taurine on Cell Function via TXNIP Induction in Caco-2 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 163-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-8023-5_15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gao, S., Satsu, H., Makino, T.	4. 巻 72
2. 論文標題 Inhibitory effect of bofutsushosan (fang feng tong sheng san) on glucose transporter 5 function in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Med.	6. 最初と最後の頁 530-536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1183-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satsu, H., Awara, S., Unno, T., Shimizu, M.	4. 巻 82
2. 論文標題 Suppressive effect of nobiletin and epicatechin gallate on fructose uptake in human intestinal epithelial Caco-2 cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 636-646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1387515	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 波津優花、本松由衣、仁科淳良、薩秀夫
2. 発表標題 腸管上皮モデル細胞系との共培養を用いた非アルコール性脂肪肝を予防する機能性成分のin vitro探索評価系の構築及び解析
3. 学会等名 第32回日本動物細胞工学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 薩秀夫
2. 発表標題 植物由来化学物質の腸管吸収および腸管上皮トランスポーターへの作用
3. 学会等名 第50回日本消化吸収学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Hazu, Yui Motomatsu, Atsuyoshi Nishina, Hideo Satsu
2. 発表標題 Construction of in vitro NAFLD model system using coculture and analysis of food components to prevent NAFLD
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors /The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 波津優花、本松由衣、山本晃久、仁科淳良、薩秀夫
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝を予防する食品成分のin vitroモデル系を用いた探索および解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mizuki Honda, Asuka Kamei, Mio Aida, Hideo Satsu
2. 発表標題 Establishment of a Stable NFkB-responsive Cell Line and Analysis of Anti-inflammatory Food Substances
3. 学会等名 International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田瑞希、亀井飛鳥、相田美緒、薩 秀夫
2. 発表標題 1-Deoxynojirimycinによる抗炎症作用の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 薩 秀夫、瀧 壮平、海野知紀、清水 誠
2. 発表標題 腸管上皮単糖トランスポーターを阻害する機能性食品成分の探索・解析
3. 学会等名 第49回日本消化吸収学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 波津優花、山本晃久、薩 秀夫
2. 発表標題 腸管吸収を考慮した非アルコール性脂肪肝を予防する食品成分探索評価系の構築及び探索
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田瑞希、亀井飛鳥、相田美緒、薩 秀夫
2. 発表標題 抗炎症作用を有するクワ葉成分の探索および解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田瑞希、相田美緒、薩 秀夫
2. 発表標題 NF- κ B転写活性安定評価系の構築および抗炎症食品成分の解析
3. 学会等名 日本食品免疫学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 薩 秀夫
2. 発表標題 腸管上皮における解毒排出系を制御する食品因子の解析
3. 学会等名 第66回日本食品科学工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 薩 秀夫
2. 発表標題 味噌に含まれる大豆イソフラボンの解毒系・炎症系に対する生理作用
3. 学会等名 みそサイエンス研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideo Satsu, Mizuki Honda, Asuka Kamei, Mio Aida
2. 発表標題 Development of a NFkappaB-responsive cell system and anti-inflammatory effect of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors /The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 薩 秀夫、山本晃久、鈴木大斗	4. 発行年 2018年
2. 出版社 CMC出版	5. 総ページ数 3-12
3. 書名 腸管上皮トランスポーター（書籍名「食品機能性成分の吸収・代謝・作用機序」）	

1. 著者名 薩 秀夫、本田瑞希、梅谷華奈	4. 発行年 2018年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 239-250
3. 書名 動物培養細胞を用いた機能性食品成分の簡便な探索・評価（書籍名「腸内細菌叢を標的にした医薬品と保健機能食品の開発」）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----