

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19500687

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝炎の栄養療法を目指した食品機能成分の開発

研究課題名（英文）Effect of nutritional treatment on nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

川上(笹川)貴代 (KAWAKAMI -SASAGAWA TAKAYO)

岡山県立大学・保健福祉学部栄養学科・准教授

研究者番号：10254567

研究成果の概要（和文）:

NASH は生活習慣病関連疾患として注目される。肝硬変へと進展を予防する対策としては炎症を鎮め線維化を抑制することである。本研究では線維化の中心的役割を担う肝星細胞の研究で、亜鉛欠乏状態が肝臓での障害部位への星細胞の移動や分散を引き起こす可能性を高めることを示した。また NASH 患者でのビタミン E 経口投与は肝障害指標の低下を認められたものの、体脂肪率の減少の関与もあり、抗酸化ビタミンや亜鉛の機能性はさらに検討されるべきと考えられた。

研究成果の概要（英文）:

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is often associated with obesity, insulin resistance and hypertriglyceridemia. The effect of matrix metalloproteinase activation-9 activation and migration in response to zinc deficiency of hepatic stellate cell was studied to reveal the mechanism of liver fibrosis. The results of this study show that the depletion of cellular zinc levels may induce degradation of extracellular matrix and HSC spreading within the space of Disse. We investigated the effects of antioxidant vitamin and/or EPA supplementation on clinical observations in NASH patients. After 12 weeks, the serum alanine aminotransferase (ALT) level in the Vitamin group was improved, whereas control and EPA group did not show any change. These observations suggest the beneficial effect of antioxidant vitamin supplementation, but not in combination with EPA, which might be associated with body fat.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎、抗酸化ビタミン、亜鉛、エイコサペンタエン酸

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪肝はこれまで可逆性で治療可能な疾患として位置けられ、肥満の是正により良好な経過をたどると考えられてきた。一方、非アルコール性脂肪性肝炎 (non alcoholic steato hepatitis; NASH) は、アルコールの飲用歴がないにもかかわらず、繊維化や肝実質の壊死、炎症を呈し、肝硬変へといたることがある。1980年 Ludwig らの報告以来、欧米では症例数が飛躍的に増えており、脂肪肝からでもアルコール性肝炎様病変を経て硬変化することが実証されている。わが国においては診断に生検像による組織学的病変の確認を要することや、ウイルス性が肝疾患の第1位をしめ治療も重点をおかれたため、近年まで本疾患の実態は明らかでなかった。現在わが国での NASH に関する臨床、病理病態は日本肝臓学会でコンセンサスが得られ、診断の確立により患者数は増えつつある。今後、肝疾患の中でウイルス性の割合が徐々に減少するとともに、メタボリックシンドロームが漸増する日本においては本疾患の潜在的人口は確実に増えると予想される。本疾患は欧米では既知の原因(ウイルス、自己免疫、アルコールなど)が否定された原因不明の肝硬変の主要原因として注目されている。NASH の成因はいまだ明らかではないが、肥満、2型糖尿病、高脂血症を伴う場合が多いことから、メタボリックシンドロームの一病態、生活習慣病の終末像ともいえる肝疾患と考えられる。最近では肝細胞の脂肪沈着(1st hit)に加えて脂質過酸化物質や肝内鉄、あるいは糖尿病や高脂血症などの基礎疾患のコントロール不良による種々の要因や未知のストレス惹起要因が加わることなどが2nd hit になり炎症を惹起する two-hit 説が有力とされている。しかし治療においての第一選択は食事療法を基本として、肝庇護療法や抗酸化物質などがもちいられているものの、より効果的な治療法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに NASH 患者での種々の酸化ストレス指標は NASH で高い傾向にあり、トコフェロール投与により肝障害指標である ALT 低下を認めた。さらに我々は慢性肝炎、肝硬変患者では血清亜鉛濃度が低いことを報告し、また C 型慢性肝炎患者への亜鉛(ポプレン)投与を行い、ALT 値の改善効果が得られたことを報告した。慢性肝疾患患者では病期の進行に伴い血清及び肝組織亜鉛濃度が低下することが知られているが、生体内亜鉛濃度の低下が肝臓の炎症や繊維化

の進展へ及ぼす作用についてはいまだ明らかではない。我々は潜在的な亜鉛欠乏状態はインスリン抵抗性のみならず、星細胞の活性化、線維化進展に關するのではないかと推測した。そこで本研究では亜鉛が生体や肝線維化に重要な役割を担う肝星細胞(Hepatic Stellate Cell:HSC)に及ぼす効果について、亜鉛濃度を变化させた種々の条件下で培養し、細胞外マトリックス(ECM)合成および分解系への影響を調べ、さらに実験的肝障害モデル動物を用いて亜鉛補充が障害肝へ及ぼす影響を検討した。さらに NASH 患者を対象とした抗酸化ビタミンと EPA による栄養療法をめざし、NASH の病態への効果、進展制御への影響を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養肝星細胞を用いた亜鉛欠乏の観察

肝星細胞(Hepatic Stellate Cell:HSC)を用いて行った。ヒト株化HSC(LI90細胞)とラットより分離したHSC(rHSC細胞)において亜鉛キレート剤と硫酸亜鉛を添加して培養し、培養液中のコラーゲン量の測定、ゼラチンゼイモグラフィを用いたMatrix Metalloproteinase の検討、および遺伝子発現レベルの解析を行った。

### (2) DMN 誘発肝障害モデル動物への亜鉛欠乏が線維化に及ぼす影響の検討

ジメチルニトロサミン誘発実験的肝線維化モデルラットを低亜鉛飼料と高亜鉛飼料にて飼育し、肝組織のAzan染色により評価した。

### (3) NASH患者への栄養機能成分の影響に関する検討

K病院通院中のNASH患者をDiet群、食事指導+ビタミンE,C投与群、食事指導+ビタミンE,C+EPA投与群に割り付け、6ヶ月間観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞系、モデル動物を用いた肝線維化に及ぼす影響

表1. LI90における細胞内亜鉛濃度の違いによるコラーゲン合成能の検討

	Zn SO <sub>4</sub>	% Control
Control	-	100 ± 32
	+	103 ± 20
DTPA	-	111 ± 39
	+	166 ± 44
TPEN	-	79 ± 21
	+	118 ± 22
Pyrrithione	-	101 ± 21
	+	106 ± 14
平均値 ± SD(n=3)		

培養肝星細胞への亜鉛欠乏によるコラーゲン合成・分解に対する影響：ヒト株化肝星細胞 L190 を基本培地において細胞内の亜鉛欠乏状態でのコラーゲン合成および分解に関連する酵素を検討した。その結果、L190 細胞から培養液中に分泌されるコラーゲン量は亜鉛キレート剤の添加による影響を受けなかった(表 1)。

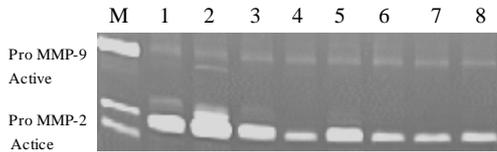


図 1.ゼラチンザイモグラフィーでの検討

1) Control, 2) DTPA, 3)DTPA + ZnSO<sub>4</sub>, 4) TPEN, 5) TPEN + M ZnSO<sub>4</sub>, 6) Pyriithione, 7) Pyriithione M ZnSO<sub>4</sub>, 8) ZnSO<sub>4</sub>

一方、分離 HSC に DTPA を添加すると MMP-9 の活性化が確認されたが、亜鉛を同時に添加すると減少した(図 1)。また、MMP-9 の活性化に伴い細胞遊走性の顕著な上昇が確認された(図 2)。

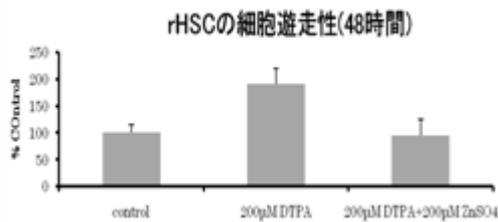


図 2. rHSC の細胞遊走性の検討

rHSC は 24well 用インサートに播種し、2% FBS を含む DMEM で 24 時間培養し、DTPA、または DTPA に ZnSO<sub>4</sub> を添加し、48 時間培養した。細胞染色をした後の細胞数を Control との比較において平均値 ± SD(n=3) で示した。

DMN 誘発肝障害モデル動物への亜鉛欠乏の影響に関する検討：微量栄養素のひとつである亜鉛は肝臓内でアルコール脱水素酵素、SOD、コラーゲナーゼ等の活性に関与しインスリンの働きを発揮させることなど知られている。肝線維化ラットにおいて ALT 値は低亜鉛食群と比較し、高亜鉛食群で低下がみられたが、線維化に組織学的な差はなく高亜鉛食の明らかな効果は認められなかった。

以上より HSC では亜鉛キレート剤存在下で活性化型 MMP-9 の出現が観察されたことから、亜鉛濃度が ECM 分解系に影響を及ぼすことが示唆された。MMP-9 は基底膜の IV 型コラーゲンを主な基質として働き、炎症時における

表 2. 血液生化学検査値

Biochemical analysis	LZ		HZ	
Albumin (g/dL)	3.2	± 0.3	3.3	± 0.2
Total bilirubin(mg/dL)	0.1	± 0	0.1	± 0
ALT(karmen Unit)	25	± 8	14	± 4*
AST(karmen Unit)	131	± 54	107	± 20

平均 ± SD(n=4)

\* LZn 群との比較において有意差有 (p< 0.05)

ECM リモデリング、細胞浸潤などにも関与するとされることから、亜鉛欠乏状態が肝線維化において HSC による基底膜コラーゲンの分解や遊走性を高めることで障害部位への移動及び分散を引き起こす可能性が示唆された。しかし in vivo では亜鉛の補給効果については明らかな結果は観察されず、今後さらに十分な検討が望まれた。

(2)NASH 患者への栄養機能成分の影響に関する調査研究

K 病院通院中の NASH 患者を Diet 群、食事指導 + ビタミン E,C 投与群、食事指導 + ビタミン E,C + EPA 投与群に割り付け、6 ヶ月間観察した。臨床検査値のうち肝障害指標については特に Vitamin 群で低下傾向を示し、Diet 群、EPA 群では明らかな変化は見られなかった(表 3)。炎症性サイトカインである血漿

表 3. 治療期間中における臨床検査値の推移

		Diet 群	Vit 群	EPA 群
AST	開始時	37 ± 17	74 ± 39	40 ± 7
(U/l)	3ヶ月	44 ± 12	40 ± 14	43 ± 15
ALT	開始時	54 ± 33	92 ± 45	83 ± 30
(U/l)	3ヶ月	67 ± 34	48 ± 23	75 ± 20
Alb	開始時	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.3
(g/dl)	3ヶ月	4.5 ± 0.2	4.1 ± 0.4	4.4 ± 0.3

平均 ± SD Wilcoxon の検定

\*開始時との比較で差のある傾向あり; P<0.05

TNF- 濃度は観察期間中で Diet 群では明らかな変化は見られなかったが、Vit 群では、3 カ月後 6 例全てにおいて低下しており開始時に比較して低下傾向を示した(P=0.028)。また EPA 群では 3 例が低下していたものの明らかな変化は見られなかった。血漿 CK-18 濃度において各群とも明らかな変化は認められなかった。

また図 3 より血中 トコフェロール濃度変化率と体脂肪率について、有意な負の相関が認められた r=-0.818(P<0.05)。ビタミン群での肝障害指標改善が認められたものの、体脂肪率の減少が関与する可能性も示唆された。したがって、今後実験デザインの再検討

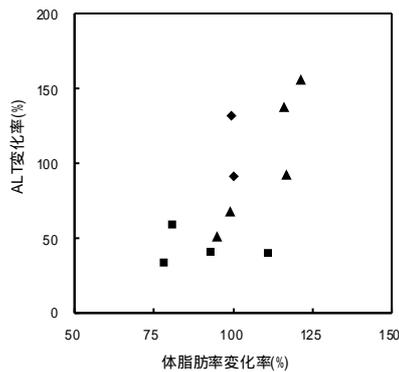


図3. 体脂肪率変化率とALT変化率との関連  
 ; Diet群, ; Vitamin群, ; EPA群  
 $r=0.667$ ,  $P<0.05$

を行い、抗酸化ビタミンの影響をさらに詳細に検討する必要があると考えられた。しかしながら適正体重を目標にした減量、特に体脂肪率減少を目標にした食事療法の有効性は示唆された。

以上のことから、NASH患者でのビタミンE経口投与は肝障害指標の低下を認められたものの、体脂肪率の減少の関与もあり、抗酸化ビタミンや亜鉛の機能性はさらに検討されるべきと考えられた。

#### 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3件)

川上貴代(他3名) 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)患者における食事療法と抗酸化ビタミンおよびEPA投与の影響. 臨床栄養学会誌 査読有, 31; 2010, 63-68.

Kawashima A, Tsukamoto I, Koyabu T et al. (他6名, Kawakami T 5/8番目) Eicosapentaenoic acid supplementation for chronic hepatitis C patients during combination therapy of pegylated interferon a-2b and ribavirin. Lipids 査読有, 43; 2008, 325-333.

Murakami Y(他5名, Kawakami T 5/8番目), J Nutr Sci Vitaminol. Zinc supplementation prevents the increase of transaminase in chronic hepatitis C patients during combination therapy with pegylated interferon a-2b and ribavirin. 査読有, 53; 2007, 213-218.

[学会発表](計10件)

富岡加代子, 生活習慣病と食生活の検討—血清リン脂質脂肪酸不飽和化酵素活性率を中心に—, 第13回日本病態栄養学会年次学術総会, 2010年1月9日, 京都市 富岡加代子, 血中トランス脂肪酸と腹部肥

満および脂肪肝に関する考察, 第56回日本栄養改善学会学術総会, 2009年9月3日, 札幌市

片山敬子, 株化星細胞における線維化関連タンパク質発現に及ぼす亜鉛動態の影響, 第56回日本栄養改善学会学術総会, 2009年9月3日, 札幌市

片山敬子, 肝線維化モデルラットにおける亜鉛投与の影響, 第63回日本栄養・食糧学会大会, 2009年5月21日, 長崎市

Hayashi M, Significance of serum cytokeratin-18 fragment levels in middle-aged males with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), 19th International Congress of Nutrition 2009, Oct 6, 2009, Thailand.

Tomioka K, Dihomo- $\gamma$ -linolenic acid level in plasma phospholipids of middle-aged male with abdominal obesity and fatty liver, 19th International Congress of Nutrition 2009, Oct 7, 2009, Thailand.

Kawashima A, Effect of EPA supplementation on immunological parameters in chronic hepatitis C patients. 15th International Congress of Dietetics, 2008. Sep 10, Yokohama, Japan.

川上貴代, 非アルコール性脂肪性肝炎患者における食事療法と抗ビタミン酸化およびEPA投与の影響, 第29回臨床栄養学会総会・第28回に本臨床栄養協会総会、第V回大連合大会, 2007年11月16日, 京都市.

Kawashima A, EPA supplementation for the treatment of chronic hepatitis C. 10th asian congress of nutrition, Sep. 11, 2007, Tpei, Tiwan.

Kawakami T, Serum lysophospholipids and fatty acid moieties in liver cirrhosis. 10th asian congress of nutrition, Sep. 11, 2007, Tpei, Tiwan.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

川上(笹川)貴代 (KAWAKAMI-SASAGAWA TAKAYO)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授  
 研究者番号: 10254567

##### (2)連携研究者

村上泰子 (Murakami Yasuko)

福山大学・生命工学部・講師

研究者番号: 90326413

沖田美佐子 (Okita Misako)

奈良女子大学・生活環境学部・特任教授

研究者番号: 70079242