

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K02352

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝疾患発症が摂食行動に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of the onset of nonalcoholic fatty liver disease on eating behavior

研究代表者

山元 涼子(YAMAMOTO, Ryoko)

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：50580429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFDL)発症が摂食行動に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。NAFLD発症によって、摂食量が増加している傾向が確認された。今回用いたNAFLD病態マウスは、肝臓局所には脂肪が蓄積していたが、内臓脂肪の蓄積は少なかった。その結果、エネルギー摂取が増加していても、レプチン分泌が少なく、摂食調節機構が十分に機能していない可能性が示唆された。しかしながら、今回中枢の摂食調節機構の解析は不十分だったため、今後さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患は世界的にも罹患者数が増加しており、我が国においても成人の約30%が罹患している新たな国民病ともいわれている。病気の発症・予防には食生活の改善が重要な鍵を握るといわれていることから、病態発症時の食行動の研究を行うことは学術的にも社会的にも重要である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the effects of the onset of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) on feeding behavior. The amount of food ingested tended to increase with the onset of NAFLD. In the NAFLD mice, there was fat accumulation in the liver region, but less visceral fat accumulation. As a result, even though energy intake was increased, leptin secretion was low, suggesting that the regulation of feeding might not be fully function. However, the analysis of central regulation of feeding was insufficient in this study, and further studies are needed.

研究分野：食生活学

キーワード：NAFLD NASH 摂食

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) は世界中で増加している軽視できない生活習慣病の1つであり、我が国においても成人の約 30%が罹患している新たな国民病である。NAFLD の中でも、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) は肝硬変・肝がんのリスクが高まることが知られている。現時点において NASH 発症の分子機構は十分に解明されておらず、急速な病態解明と予防・治療法の確立が求められている。NAFLD/NASH の病態発症には動物性脂質やスクロース、フルクトースなどの単純糖質の過剰摂取の関与が示唆されている。実際、NAFLD 患者の食生活習慣の傾向として総エネルギー摂取量が過剰であること、また、脂質もしくは糖質の摂取過剰者が大多数 (70-80%) を占めることが報告されており、予防・治療の第一選択として食生活の改善が推奨されている。しかしながら、NAFLD/NASH の発症要因として考えられている動物性脂質や単純糖質には依存性があることが知られており、生活習慣の改善や食事療法の継続を困難にしていると考えられる。

研究代表者は、これまでにフルクトース摂取による NAFLD/NASH 発症のリスクに関する研究を行ってきた。マウスを用いた半年間のフルクトース飲水による病態発症リスクの評価の結果、フルクトース過剰状態ではあるが、飲水量と摂餌量がコントロールされ、総エネルギー摂取量は変化せず、肝臓の病変は軽度だった。この結果から、摂食行動が調整できる状況下では病態のリスクは低く、摂食調節機構の異常が病態発症に大きく寄与する可能性があると考え、本研究の着想に至った。

これまでに、摂食行動異常を前提として、摂食抑制の調節に関わる遺伝子が欠損したマウスなどを用いて NAFLD/NASH 病態モデルが作製されている。しかしながら、遺伝子改変を伴わない食事誘発性の NAFLD/NASH 病態においても同様に摂食行動異常が起こっているかは不明である。

食習慣の改善や食事療法が病態発症・進展の鍵をにぎる本疾患において、病態発症に伴う摂食行動への影響を明らかにすることは予防・治療の確立のために重要である。

2. 研究の目的

本研究では、食事誘発性 NAFLD/NASH 病態モデルを用いて、NAFLD/NASH 発症が摂食行動に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1: NAFLD/NASH モデルの再現実験

本研究では、遺伝子改変を伴わないマウスを用い、食事誘発性 NAFLD/NASH モデルを用いて研究を進めることとした。その中で、インスリン分泌不全型 2 型糖尿病を背景に高脂肪食との併用で NAFLD/NASH を誘導するモデル作製法 (Fujii *et al.*, 2013) に着目し、まずは既存の NAFLD/NASH 病態モデルの再現実験を行うこととした。すなわち、生後 2 日以内の雄性 C57BL/6J マウスにストレプトゾトシン (STZ) 200 μ g を接種し、インスリン分泌不全を誘導した。次いで、離乳後 4 週齢から高脂肪食 (HFD, 脂質: 約 60 % kcal) を投与した (STZ + HFD 群)。対象には、生後 2 日以内に生理食塩水を接種し、離乳後 4 週齢から通常食 (脂質: 約 10% kcal) または HFD を投与し、それぞれ Normal 群、HFD 群とした。STZ + HFD 群が NASH を発症するとされる 8 週齢で非絶食下にて解剖を行い、血液、肝臓、脾臓、精巣上体脂肪を採取し、生化学分析、重量測定、肝臓の組織学的検査および遺伝子発現変化の解析等に用いた。

実験 2: NAFLD/NASH モデル作製法の改良および病態発症時の摂食行動の解析

実験 1 の再現実験において、STZ 接種後の死亡率が高かったため、病態モデルの改良を行った。これまで生後 2 日以内に STZ を接種していたが、摂取時期を遅らせ STZ100 および 200 μ g 接種とした。離乳後の HFD 投与は変更せず、解剖時期を 8 週齢から 9 週齢に変更した。実験 2 では Normal 群、HFD 群、STZ100 + HFD 群、STZ200 + HFD 群の 4 群で行った。飼育期間中は体重、血糖値、摂食量を測定した。解剖は非絶食下で行い、血液、脳、肝臓、脾臓、精巣上体脂肪を採取し、生化学分析、重量測定、肝臓の組織学的検査および遺伝子発現変化の解析等に用いた。

4. 研究成果

実験 1: NAFLD/NASH モデルの再現実験

HFD 群と比較して、STZ + HFD 群では、肝臓の肥大が認められ、さらに肝臓への脂肪蓄積が高い傾向を示した。肝臓の組織学的検査の結果では、HFD 群では NAFLD の発症は確認されなかったが、STZ + HFD 群では肝臓への脂肪蓄積および炎症細胞の浸潤が確認され、一部個体においては肝細胞風船様変性といった NASH 様の病変が確認された。この時の摂食行動について解析した結果、HFD 群と STZ + HFD 群では、平均摂食量は差がなかったが、体格を考慮すると、STZ + HFD 群の方が低体重で体格が小さいにも関わらず、摂食量は HFD 群よりも STZ + HFD 群の方が増加傾向を示した。

実験1では従来モデルの再現が確認され、摂食行動にも変化があることが示唆された。しかしながら、実験1の方法で病態モデルの作製を行った際、離乳に至る期間までに死亡率が高かったため、本モデルを用いながらの研究遂行は困難であると判断し、病態モデル作製法の改良を行うこととした。

実験2:

実験2-1. NAFLD/NASHモデル作製法の改良

実験1の方法からSTZの接種量、接種のタイミングを変更することによって、離乳に至る期間までの死亡率は著しく改善し、STZ100においては死亡率0%だった。

高脂肪食5週間投与後、最終体重はHFD群が最も高く、STZ100+HFD群はNormal群と同程度、STZ200+HFD群は低値を示した。解剖時の肝臓重量はHFD群と比較してSTZ100+HFD群およびSTZ200+HFD群で高値を示し、一方で、精巣上体脂肪はSTZ100+HFD、STZ200+HFD群で低値を示した。また、肝臓の総脂質、トリアシルグリセロールはHFD群と比較してSTZ100+HFD、STZ200+HFD群で高値を示し、肝臓局所に脂肪が蓄積していることが推察された。また、肝機能のマーカーであるAST、ALTにおいても高値を示す傾向が確認され、肝機能の異常が推察された。そこで肝臓の組織学的検査を行い、NAFLD/NASHの病理評価をFLIPアルゴリズムでこない、さらにマッソントリクローム染色によって肝繊維化の評価を行った。その結果、HFD群ではNAFLDを発症している個体は確認されなかったが、STZ100+HFD、STZ200+HFD群ではNAFLDの発症が確認され、各群ともにそのうち33%がNASHを発症していることが確認された。また、STZ100+HFD群において繊維化に進展している個体も確認された。

血糖値については、離乳当初、STZを接種していないマウスと比較して、STZ100 μ g接種のマウスは血糖値は同程度であったが、STZ200 μ g接種のマウスは高値を示していた。解剖時の血糖値はHFD群と比較してSTZ100+HFD、STZ200+HFD群ともに高値を示した。一方、インスリンについては、HFD群と比較してSTZ100+HFD、STZ200+HFD群ともに低値を示した。以上の結果から、STZを接種したマウスでは、インスリン分泌不全による耐糖能異常が起こっており、特にSTZ100を接種したマウスにおいては、HFDを摂取したことが耐糖能異常の誘因になっていることが示唆された。

以上より、通常高脂肪食5週間投与では、肥満は誘導されるがNAFLDは発症しないこと、一方で、STZを接種したマウスでは、高脂肪食による肥満は誘導されないが、インスリン分泌不全と高脂肪食による耐糖能異常を背景にNAFLD/NASHを発症していることが確認された。従来のSTZ200 μ g接種だけでなく、100 μ g接種においてもNAFLD/NASHの病態モデル作製に有用であることが示唆された。

実験2-2. 摂食行動の解析

実験2-1でSTZ100 μ gおよびSTZ200 μ g接種と高脂肪食によってNAFLDを発症していることを確認できたことから、摂食行動の解析を進めた。インスリンは末梢の食欲抑制物質でもあることから、高脂肪食切り替え当初からSTZ非接種のマウスと比較して摂食量が多いことが予想された。しかしながら、高脂肪食に切り替えた週の摂食量は、STZ非摂取(HFD群)よりもSTZ接種群において低値を示す傾向にあり、その後、HFD群と比較して、STZ100+HFD、STZ200+HFD群において摂食量が多い傾向が見られた。最終的な体格を考慮すると、HFD群と比較してNAFLDを発症したSTZ100+HFD、STZ200+HFD群は摂食量が多かった。短期的な食欲の制御には、血中のグルコース濃度の関与が知られている。今回、STZ100+HFD、STZ200+HFDは血糖値は高値を示していたが、NAFLD発症時の高血糖は食欲の制御には寄与していない可能性が示唆された。また、長期的な食欲の制御には末梢のレプチン分泌も重要であることが知られている。血中のレプチン濃度は体脂肪量と相関があることが知られている。今回用いた病態モデルは、肝臓局所的には脂肪が蓄積していたが、内臓脂肪(精巣上体脂肪)はHFD群と比較して低値を示していた。血清中のレプチンにおいても、HFD群と比較してSTZ100+HFD、STZ200+HFDの低値を示していた。このことから、今回用いたNAFLDモデルは高血糖を示し、栄養状態が十分であってもレプチン分泌が不足していたため、摂食量が亢進していた可能性が示唆された。

続いて、非絶食条件下での中枢の摂食関連因子の遺伝子発現変化の解析を行った。その結果、視床下部における摂食を誘導する*nyp*の発現量がHFD群と比較してSTZ200+HFD群で増加傾向を示したが有意な差は認められなかった。また、これまでに高脂肪食は脳内の炎症や小胞体ストレスを誘導し、高脂肪食嗜好性を亢進し、摂食量が増加することが報告されていることから、視床下部における炎症性サイトカインや小胞体ストレスに関わる因子についても解析を行った。しかしながら、今回測定した項目について、発現変化は確認できなかった。

今回NAFLD病態マウスを用いて、摂食行動の変化を解析した。その結果、高脂肪食摂取で体重増加は認められないものの、NAFLDを発症しているマウスでは、摂食量が増加しており、食欲が亢進していることが推察された。非肥満のNAFLDでは、肝臓局所には脂肪が蓄積しているが、内臓脂肪は少なく、その結果、エネルギー摂取が増加していても、レプチン分泌が少なく、摂食調節機構が十分に機能していない可能性が示唆された。しかしながら、今回中枢でのシグナルの解析は不十分だったため、今後さらなる検討が必要である。また今回用いた病態モデル以外の食事誘導性NAFLD/NASHモデルにおいても解析を行い、病態発症時における食行動の変化を明らかにしていくことが、食生活を介したNAFLDの予防および治療に重要である。

5. 主な発表論文等

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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関野真由、花井綾子、武田光太、西塚誠、山元涼子
2. 発表標題 ストレプトゾトシン及び高脂肪食誘導性非アルコール性脂肪肝炎モデル作製法の改良
3. 学会等名 令和3年度日本栄養・食糧学会 東北支部（第55回大会）・北海道支部（第51回大会）合同支部大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------