

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11648

研究課題名(和文) 桑葉はNASHを予防・改善する食品素材となりうるか

研究課題名(英文) Verify if it can be used as a food material to prevent and improve NASH?

研究代表者

若命 浩二 (WAKAME, KOJI)

北海道科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：40523874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、STAMマウスにおける桑の葉(Morus alba L.：ML)投与による肝細胞癌(HCC)発症抑制効果を検討した。C57L/6Jマウスにストレプトゾトシン(STZ)を投与し、高脂肪食および1%MLを自由摂取させた。肝臓と血液を採取し、血漿の生化学的検査および肝臓の組織学的検査を行った。結果 STAMマウスの肝臓の病理学的検査では、すべての肝臓にHCCが認められた。一方、MLを投与したSTAMでは、HCCは観察されなかった。結論としてSTAMマウスにMLを投与すると、非アルコール性肝炎(NASH)からHCCへの進行が抑制された。MLはHCCの発生を防ぐのに有効であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

桑葉は、養蚕業の衰退と共に国内の耕作面積が減少している。近年では桑葉の抗糖尿効果が確認されているが、我々はSTAMマウスという非アルコール性肝炎(NASH)を発症するモデルマウスを用いて、桑葉の脂質代謝促進作用、脂肪肝(NASH)から肝細胞癌(HCC)の進展を桑葉が予防することを見出した。特に桑葉投与群では中性脂肪の減少と肝臓Lipin1遺伝子の上昇傾向がみられたことから、桑葉は脂質代謝、脂肪肝、肝細胞癌予防に有用であることが示唆された。これらのことから、日本国民の健康課題であるメタボリックシンドロームの予防に桑葉の活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the inhibitory effect of mulberry leaf (ML) (Morus alba L.) administration on the development of hepatocellular carcinoma (HCC) in stelic animal model (STAM) mice. Streptozotocin (STZ) was administered to C57L/6J mice who that were fed a high-fat diet (HFD; STAM mice) with 1% ML ad libitum. After sacrificing, the liver and blood were collected. Biochemical tests of plasma and histologic examination of the liver were performed. Pathologic examination of all (6/6) liver samples of the STAM mice showed HCC. On the contrary, in STAM mice who received ML, there was no HCC. Administration of ML in STAM mice inhibited the progression from nonalcoholic hepatitis (NASH) to HCC. ML may be effective in preventing the development of HCC.

研究分野：薬学

キーワード：非アルコール性肝炎 脂質代謝 桑葉

### 1. 研究開始当初の背景

桑葉は、従来より 1-デオキシノジリマイシンが含有されており、 $\alpha$  グリコシダーゼ阻害作用によって抗糖尿作用が注目されてきた。我々の先行研究によって、桑葉投与による肝臓 Lipin1 遺伝子の誘導作用により、桑葉が脂質代謝に影響を及ぼすことを推測した。また、メタボローム解析によって桑葉中に 367 種の成分を同定した。このような背景から、マウスモデルを作成し、桑葉の肝臓脂質代謝に対する作用に着目して本研究を実施するに至った。

### 2. 研究の目的

近年、NASH は非アルコール性肝炎としてその罹患率は増えつつある。肝臓に脂肪を蓄積した NASH を予防には、食事療法を取り入れる必要があることも啓蒙されている。そこで、我々は NASH モデルマウスを作成して、桑葉投与の効果を検討することを目的として本研究を実施した。特に、NASH による脂肪肝から肝臓がんへの移行時における肝臓中の Lipin1 遺伝子の発現変動を解析し、桑葉粉末中に含まれる有効成分の探索を実施した。

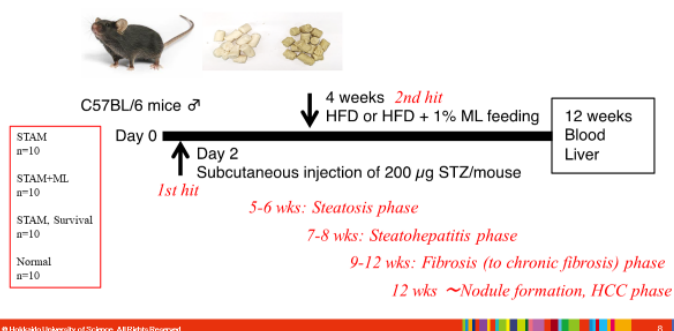
### 3. 研究の方法

NASH から肝細胞癌 (HCC) が 100% 発生するモデルマウス (STAM マウス) を作成し、これに桑葉を投与することで、桑葉の抗 NASH 作用、脂質代謝促進作用、抗 HCC 発現作用を検討した。STAM マウスは、ストレプトゾトシンと脂肪餌投与の 2 段階刺激によって作成される NASH モデルマウスである。このマウスに桑葉 1% 含有のエサを投与して、生存率、HCC 発生率、肝臓 Lipin1 産生、その他血液パラメータの変化などを検討した。

### 4. 研究成果

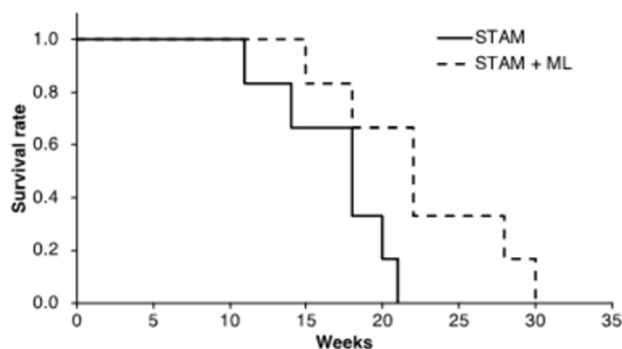
【NASH モデルマウスの作成と桑葉投与】NASH 病態から肝細胞癌を誘発する STAM マウス (5 週齢) を本実験に用いた。STAM マウスは、C57BL/6J マウスに低用量のストレプトゾトシン処理と高脂肪食給餌によって NASH が発症するモデルである。マウスをコントロール群、NASH 群、NASH+桑葉粉末 (1%) に分けて飼育した (n=6)。飼育 8 週目に解剖を行い、血液と肝臓を採集した。血液は、一般生化学検査、肝臓は Lipin1 遺伝子発現解析、組織観察を行った。

Methods: Mulberry leaf powder (ML) treated to stelic animal model (STAM) mice



【結果】桑葉は、NASH (STAM) マウスに対して優的な延命効果を示した。

Result: The survival curves of the STAM and STAM + ML groups



The STAM + ML group showed a significant survival benefit, compared with that of the STAM group ( $p = 0.039$ )

Statistical analysis: Kaplan-Meier method

血液生化学検査の結果を示す。

*Result: Changes in biochemical parameters after 12 weeks in each group*

Parameters	Group	Average ± S. E.
ChE (IU/L)	Normal	37.60 ± 7.05*
	STAM	17.80 ± 2.31§
	STAM + ML	36.80 ± 4.49
TP (g/dL)	Normal	5.70 ± 0.12
	STAM	4.92 ± 0.09 §§
	STAM + ML	6.72 ± 0.56
ALB (g/dL)	Normal	3.93 ± 0.02**††
	STAM	2.77 ± 0.08
	STAM + ML	2.90 ± 0.08

STAM vs Normal: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, STAM+ML vs Normal: ††p < 0.01, STAM+ML vs STAM: §p < 0.05, §§p < 0.01.

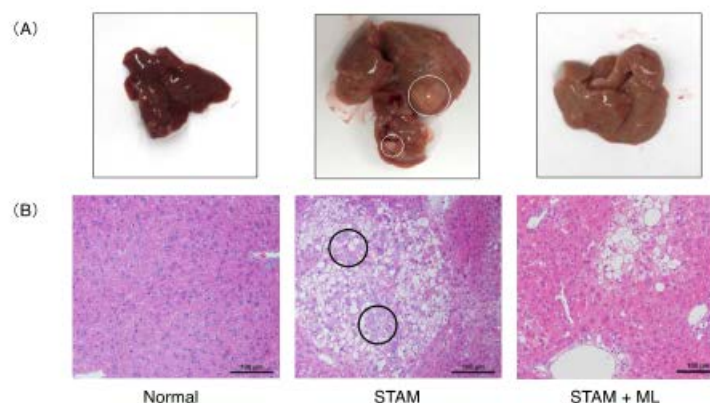
*Result: Changes in biochemical parameters after 12 weeks in each group*

Parameters	Group	Average ± S. E.
ALT (mg/dL)	Normal	30.67 ± 1.50†
	STAM	46.33 ± 4.15
	STAM + ML	90.60 ± 27.95
TG (mg/dL)	Normal	73.33 ± 9.45*
	STAM	542.67 ± 170.11
	STAM + ML	185.00 ± 81.15
T-CHO (mg/dL)	Normal	91.83 ± 3.02**††
	STAM	152.33 ± 7.20
	STAM + ML	174.80 ± 12.73

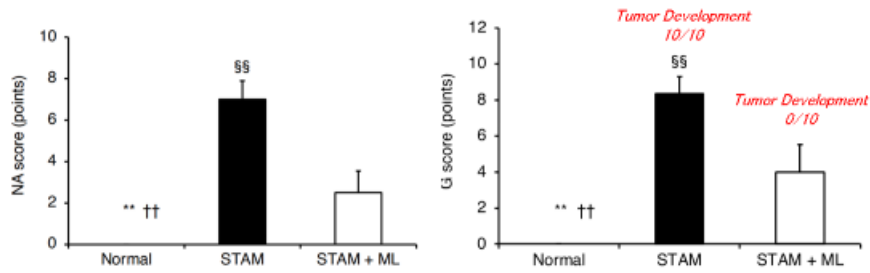
STAM vs Normal: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, STAM+ML vs Normal: ††p < 0.01, STAM+ML vs STAM: §p < 0.05, §§p < 0.01.

また、肝臓中の Lipin1 遺伝子は NASH 群の低下に対して NASH+桑葉粉末群で上昇傾向にあった (データなし)。肝臓組織観察において、NASH 群では全ての個体 (6/6) に脂肪沈着、肝細胞変異、肝細胞腺腫、肝細胞癌が認められたのに対して、NASH+桑葉粉末群では、脂肪沈着 (6/6)、肝細胞腺腫 (2/6) であった。

*Result: Gross findings and microscopic examination of the liver in each group*



Changes in histogram for the NA and G score of liver in each group at 12 weeks



Normal vs STAM: \*\* $p < 0.01$ , Normal vs. STAM+ML: †† $p < 0.01$ , STAM vs. STAM+ML: §§ $p < 0.01$ .

【結論】STAM マウスは NASH から 100%の確率で肝細胞癌が発症することが報告されている。桑葉粉末を本マウスに連続投与した結果、肝臓組織検査により NASH より発症する肝細胞癌を抑制していることが明らかとなった。肝臓においては、桑葉粉末の脂肪沈着抑制効果ははっきりと認められなかったものの、血中 TG の低下、肝臓中 Lip11 遺伝子の誘導傾向があったことから桑葉粉末は何らかの脂質代謝系に関わり NASH 病態の進行を遅らせていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	小松 健一  (Komatsu Ken-ichi)  (10195844)	北海道科学大学・薬学部・教授    (30108)	
研究分担者	佐藤 恵亮  (Sato Keisuke)  (60733946)	北海道科学大学・薬学部・講師    (30108)	
研究分担者	中田 章史  (Nakata Akifumi)  (70415420)	北海道科学大学・薬学部・准教授    (30108)	

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