

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：27301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11721

研究課題名（和文）食餌誘導性非アルコール性脂肪肝炎ラットモデルの開発と汎用化に向けて

研究課題名（英文）Establishment and application of diet-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

大曲 勝久（Omagari, Katsuhisa）

長崎県立大学・看護栄養学部・教授

研究者番号：90244045

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：高脂肪・高コレステロール（HFC）食の9週間投与による食餌誘導性Sprague-Dawleyラット非アルコール性脂肪肝炎（NASH）モデルは、5週齢から27週齢という比較的広い範囲の週齢で適用でき、成年期以降の食習慣は若年期からの食習慣よりもNASHを発症しやすく、肝線維化は週齢が進むにつれ進行しやすいことが明らかとなった。また、同様な食餌を同じ期間投与したWistar/STラットモデルは「非肥満NASH」の病態モデルとなり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

その発症・進展の原因が不明であり、種々の年齢で発症し得る非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態およびその予防法や治療法を検討する上で、遺伝子操作が行われておらず食餌で誘導されるNASH動物モデルの確立は重要である。我々が確立したNASHラットモデルは、適用できる週齢の幅が比較的広く、ラットの系統（ストレイン）に限定されない動物モデルとして有用であり、広く活用できるとおもわれる。

研究成果の概要（英文）：A 9-week high-fat and high-cholesterol (HFC) diet-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model using Sprague-Dawley rats can be applied a relatively wide range of ages (5-27 weeks of old). In this animal model, aging is likely associated with the development of NASH, and the risk of NASH-related hepatic fibrosis increases with age. Wistar rat model fed a same HFC diet for 9 weeks may be useful for elucidating the pathophysiological mechanism of the so-called "lean NASH".

研究分野：臨床栄養学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 動物モデル SDラット Wistarラット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) のうち、炎症や線維化を来した肝硬変、肝癌に進行し生命を脅かす可能性のある疾患である。我々の研究室ではこれまでに、遺伝子操作が行われていない 9 週齢 Sprague-Dawley (SD) ラットに高脂肪・高コレステロール食を与えることにより、わずか 9~18 週間で肝硬変を含む進行した線維化を伴う NASH ラットモデルを確立した。この動物モデルを NASH の病態解明や治療法の開発のために用いるにあたって、飼育開始週齢やラットの種類などを変えても同様な病態を呈するかを検討することで、種々の発症要因が想定されているヒト NASH 患者への研究が進むのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

ヒトの NASH 患者の発症年齢は中壮年以降が多いが、小児発症例も認められる。食生活要因は患者の年齢に影響するかの報告は少なく、また、実験に用いるラットの系統 (ストレイン) の影響も明らかではない。今回の研究では、若週齢から壮年に相当する週齢のラットにおける食餌の影響の差異および SD ラット以外で汎用されている Wistar ラットにおける食餌誘導性 NASH 発症とその特徴について検討した。

### 3. 研究の方法

上記の SD ラットモデルで用いた 9 週齢雄性ラットの他に、5 週齢、13 週齢、18 週齢、27 週齢雄性 SD ラットにコレステロール 1.25% (重量比) および 0.5% コール酸を含む高脂肪・高コレステロール (HFC) 食を与え 9 週間飼育したあと、終体重、摂取エネルギー量、肝臓重量/体重比、睾丸周囲脂肪重量/体重比、糖代謝や脂質代謝に関連する血液・生化学的マーカーおよび肝臓内のトリグリセリドや総コレステロール量、肝臓の病理組織学的所見、肝臓中の脂質代謝、コレステロール代謝、炎症、線維化および酸化ストレスに関与する酵素等の mRNA 遺伝子発現を検討した。さらに、このモデルを使って、NASH の発症・進展に関与すると考えられている酸化ストレスに対する抗酸化作用を持つとされるオリーブ葉パウダーの NASH に対する効果を検討した。

### 4. 研究成果

5 週齢、9 週齢、13 週齢雄性 SD ラット (それぞれ 6 匹) に HFC 食を 9 週間摂取させた実験では、終体重や総摂取エネルギー量、肝臓重量/体重比、睾丸周囲脂肪重量/体重比は 3 群間に有意差はみられなかったが、飼育期間中の体重増加量と食餌効率は若齢群が有意に高値であった。血清トリグリセリド、総コレステロール、グルコース、インスリン、レプチン、AST、ALT、遊離脂肪酸、肝臓脂質濃度は 3 群間に有意差はみられなかったが、血清アディポネクチン濃度は若齢群が他の 2 群と比較して有意に高値であった。病理組織学的検討では、3 群ともに 67~83% のラットが NASH と判定された。脂肪沈着や小葉内炎症、肝細胞の風船様腫大、Kleiner らによる NAS スコア (Kleiner DE et al. Hepatology 41: 1313-1321, 2005) は 3 群間に有意な差はみられなかった。また、肝線維化は非若齢群に強い傾向がみられた。肝組織中の mRNA 発現量では、肝線維化の指標である TGF- $\beta$ 、炎症の指標である NF- $\kappa$ B、酸化ストレスの指標である HO-1 や Mn-SOD において週齢が遅い方が有意に高値であった。また、肝線維化の指標である  $\alpha$ -SMA、炎症の指標である IL-1 $\beta$ 、酸化ストレスの指標である GPX-1、脂肪酸代謝の指標である FAS や GPAT1 の mRNA 発現量も有意差はなかったものの週齢の遅い方が高い傾向にあった。

9 週齢、18 週齢、27 週齢雄性 SD ラット (それぞれ 6 匹) に HFC 食を 9 週間摂取させた実験では、どの週齢においても 83% 以上のラットが病理組織学的に NASH を発症しており、血清 AST や ALT、インスリン、インスリン抵抗性は週齢が高いほど高値を示した。病理組織学的検討では、肝臓の脂肪沈着や小葉内炎症、肝細胞の風船様腫大は週齢による変化は認められなかったが、肝線維化の程度は週齢が高いラットがより進行していた。肝組織中の mRNA 発現量では、肝線維化の指標である TGF- $\beta$  や  $\alpha$ -SMA は週齢が高いラットで多い傾向が認められた。

以上の結果より、HFC 食投与による食餌誘導性 SD ラットモデルは 5 週齢から 27 週齢という比較的広い範囲の週齢で適用でき、成年期以降の高脂肪・高コレステロール食といった食習慣が若年期からの食習慣よりも NASH を発症しやすく、特に NASH に関連する肝線維化は週齢が進むにつれて進行しやすいことが明らかとなった。

SD ラットと並んで汎用されている Wistar ラットにおいても、9 週齢から 9 週間 HFC 食を与えると、SD ラットと同様な病態を呈するかを比較検討した。その結果、Wistar/ST ラットにおいても高率 (84.6%) に肝線維化を伴う NASH を発症し、インスリン抵抗性ととも、線維化や炎症に関連する遺伝子発現が亢進していることが明らかとなった。しかし、Wistar/ST ラットは同様なプロトコルで飼育した SD ラットに比べて血清学的および組織学的に NASH の程度が軽度であった。以上のことから、ヒトにおいても肥満を呈しない「非肥満」の NASH 患者が一定の割合で存在するが、この Wistar/ST ラットモデルは「非肥満の NASH (いわゆる lean NASH)」の病態モデルとなり得ることが示唆された。

以上のことから、HFC 食の比較的短期間の投与による食餌誘導性ラットモデルは SD ラットに限らず、また、比較的広い週齢のラットを用いることができるとおもわれた。また、以上のラットモデルを用いて、抗酸化作用のあるオリーブ葉パウダーの NASH に対する進展抑制効果を確認し、その効果は抗酸化作用によることが示唆された。このように、我々が確立した NASH ラットモデルは、種々の年齢で発症し得る NASH の病態およびその予防法や治療法を検討する上で、適用できる週齢の幅が比較的広く、ラットの系統(ストレイン)に限定されない動物モデルとして広く活用できるとおもわれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 3件）

1. 著者名 Omagari K, Koba C, Nagata A, Ngo LCT, Yamasaki M, Fukuda A, Yuasa M, Suruga K, Inada N, Ichimura-Shimizu M, Tsuneyama K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Olive leaf powder prevents nonalcoholic steatohepatitis in Sprague-Dawley rats fed a high-fat and high-cholesterol diet.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Nutrition Open Science	6. 最初と最後の頁 47-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nutos.2021.04.002	査読の有無 有
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 Omagari K, Yamasaki M, Ngo LCT, Koba C, Nagata A, Fukuda A, Suruga K, Ichimura-Shimizu M, Tsuneyama K.	4. 巻 65
2. 論文標題 Influence of age in weeks on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis in a diet-induced Sprague-Dawley rat model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Medica Nagasakiensia	6. 最初と最後の頁 7-15
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 有
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 Omagari K, Suzuta M, Taniguchi A, Kumamoto R, Koyama Y, Fukuda A, Suruga K, Ichimura-Simizu M, Tsuneyama K.	4. 巻 30
2. 論文標題 A non-obese, diet-induced animal model of nonalcoholic steatohepatitis in Wistar/ST rats compared to Sprague-Dawley rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Nutrition Experimental	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ycInex.2020.03.001	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 Omagari K, Asakawa E, Sasao M, Narita S, Hisano M, Fukuda A, Suruga K, Ichimura M, Tsuneyama K	4. 巻 65
2. 論文標題 Age-related alterations of nonalcoholic steatohepatitis in Sprague-Dawley rats fed a high-fat and high-cholesterol diet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 349-356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.65.349	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市村真祐子, 大曲勝久, 常山幸一.
2. 発表標題 実験的モデル動物作成に用いられる高脂肪・コレステロール食に含まれるコール酸のNASH病態形成への影響.
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市村真祐子, 大曲勝久, 常山幸一
2. 発表標題 食餌摂取による高度な線維化を伴うNASHモデルマウスの開発
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田歩美、佐々尾真鈴、浅川恵理、成田純令、久野萌偉、駿河和仁、市村真祐子、常山幸一、田中一成、大曲勝久
2. 発表標題 高脂肪・高コレステロール（HFC）食を摂取したSD ラットにおける非アルコール性脂肪肝炎（NASH）発症の検討
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市村真祐子, 大曲勝久, 常山幸一
2. 発表標題 線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎を呈する食事誘導モデルマウスの確立
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019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
---------	---------