

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20700550
 研究課題名（和文）酸化ストレス暴露にともない発症する非アルコール性脂肪性肝炎のメカニズム解明
 研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of non-alcoholic steatohepatitis induced by oxidative stress

研究代表者 中本 賀寿夫（NAKAMOTO KAZUO）
 神戸学院大学・薬学部・講師
 研究者番号：30432636

研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリア障害によって惹起される酸化ストレスが非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の病態進行に関与していることを高山によって作成されたモデル動物（PCT/JP 2007/52477）を用いて明らかにした。さらに、抗酸化活性に優れた食品素材（緑茶発酵物水抽出エキス）投与により、ミトコンドリア保護効果および肝線維化抑制効果を介して NASH 進行を予防できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Our present study demonstrated that mitochondrial abnormality might contribute to the progression of NASH in correlation with oxidative stress. Furthermore, Fermented green tea extracts administration prevent the mitochondrial damage and may be beneficial in preventing NASH development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎、酸化ストレス、抗酸化物質、ミトコンドリア障害、予防医学

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎が制圧されつつある現在
 非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、こ

の数年来、我が国において非常に重要な疾患
 概念となってきた。NASH の特長は、飲酒
 歴がないにも関わらずアルコール性肝炎と

極めて類似した肝病理組織像を呈する。また、予後良好な脂肪肝と異なり肝硬変、肝癌にまで進展する可能性があることが報告されている。国内外の研究動向は、1998年にDayらが提唱している「two hit theory」、すなわち脂肪肝を基盤に何らかの因子がセカンドヒットとして関与することで脂肪性肝炎に移行し、進行すると肝癌にまで進行するという仮説が現在最も指示されている (Day CP et al. Gastroenterology, 1998)。このような仮説から NASH の病態には、抗酸化防御系の破綻 (Isabelle A et al., Clinical Science, 2004) が報告されており、中でもミトコンドリアの形態異常・機能異常による活性酸素種や過酸化脂質増大 (Fromentry B et al. J Hepatology, 1997) が報告されている。以上より、NASH の病態進行に酸化ストレスの関与が強く示唆されている。

さらに近年、睡眠時無呼吸症候群患者において NASH を発症するケースが報告された。これは、慢性的な低酸素暴露に曝される事が NASH 病態進展への原因ではないかと考えられている (Tanne F et al., Hepatology, 2005)。

そこで我々は上記に示す臨床症例を基に、慢性的な低酸素状態に曝される事が NASH を発症するという事に注目し、当研究室の高山らは亜硝酸投与による NASH 病態モデルラット作出技術を確立した (作製方法は後述)。本技術に基づく病態モデルはヒトの病態に近似しており、臨床的にも有用な知見を得ることが出来ると報告した (高山房子、江頭亨：特願 2006-218825.)。また本モデルラットは、メトヘモグロビン血症、つまり慢性的に低酸素を暴露することによって脂肪性肝炎あるいは肝線維化および肝硬変を発症することを報告している。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト NASH 診断基準に合致する NASH モデルラットを用いて、酸化ストレス暴露にともない発症する NASH 進行の機序解明を行ない、さらに本病態モデルに対する抗酸化機能食品の有効性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

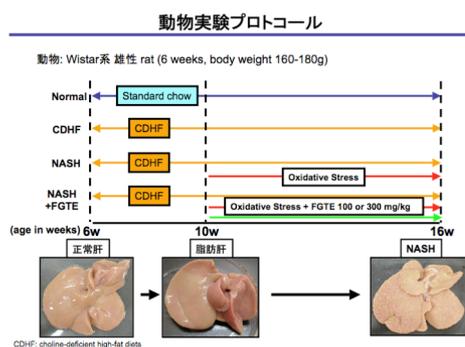
(1) 試薬

β -1,4-Dihyronicotinamide adenine dinucleotide (β -NADH) はオリエンタル酵母株式会社から購入した。Fatty acid free-bovine serum albumin (BSA) 和光純薬から購入した。Adenosine 5' -diphosphate sodium salt (ADP) は Sigma から購入した。5,5-dimethyl-pyrroline-1-oxide (DMP0) はラボテック社のものを用いた。その他、特記のないものはすべて市販の特級試薬を使用した。

(2) 実験動物

動物は Wistar 系雄性ラットを使用し、Normal、コリン欠乏高脂肪食 (CDHF)、NASH、NASH+緑茶発酵物水抽出エキス (FGTE) 100、NASH+FGTE 300 の 5 群に分けた。Normal 群には普通食を、その他の群には CDHF を 10 週間与えた。NASH ラットは CDHF を 4 週間与え脂肪肝を形成させた後、6 週間反復性・間欠的酸化ストレスを負荷し作製した。FGTE (100, 300 mg/kg) は、酸化ストレス負荷と同期間ゾンデにて経口投与を行った (図 1)。実験的飼育期間終了後、開腹し障害評価用試料として血液、肝臓を採取し生化学的、病理組織学的検討を行った。

図 1



(3) 肝機能マーカーの測定

血漿中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) とアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) は、トランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬工業) を用いて測定した。

(4) ミトコンドリア呼吸調節能および酸化リン酸化能測定方法

ミトコンドリアは Hogeboom らの方法を基に調整後、ただちに測定に供した。ミトコンドリアの呼吸調節能および酸化リン酸化能は、クラーク型酸素電極法 (Packer *et al.*, 1966) にて測定した。

(5) 透過型電子顕微鏡試料調製および観察

エーテル麻酔下にて肝臓を取り出し、2% グルタルアルデヒドと 2% ホルムアルデヒド混合液で室温にて一晩浸透固定を行ない、1.5% 四酸化オスミニウムで 1.5 時間、4°C で後固定を行なった。その後、脱水、Spurr で包埋し、熱重合させ、ウルトラマイクロームにて 80 nm の超薄切片を作製した。鉛とウランの二重染色を行い、日立 H7100 透過型電子顕微鏡にて観察した。

(6) ミトコンドリア由来活性酸素・フリーラジカル種測定法

日本電子 ESR 測定装置 (JES-RE1X/HR, 日本電子) を用い、常温にて測定した (Wang *et al.*, 2004)。ミトコンドリアから派生する活性酸素ラジカルと DMP0 との付加体すなわち DMP0-OH として検出した。

(7) 肝組織中過酸化脂質定量方法

肝組織中過酸化脂質量は 25% 肝ホモジネートを作製し、2,500 rpm、4°C で 20 分間遠心した後、その上清を LPO-586 kit (BIOXYTEC 社) にて測定した。

(8) ウェスタンブロッティング法による Mn-SOD、NF-κB 蛋白発現測定方法

肝臓ホモジネート、核抽出溶液が 1 well に各 30 μg 含まれるようにアプライし、120 V、1 時間で電気泳動条件を行なった。その後、100 V、3 mA で 120 分間ブロッティングを行った。その後、5% スキムミルクを含む TBS-T で 1 時間ブロッキングを行い、第一次抗体は、rabbit anti Mn-SOD polyclonal antibodies (Santa Cluz) 1:2000、mouse monoclonal anti NFκB (Santa Cluz 社) 1:1000 になるよう TBS-T で調製し、1 時間室温にて浸透させた。二次抗体には、Cruz Marker Compatible Secondary Antibodies for Western Blotting goat anti-rabbit HRP-linked IgG (sc-2030、サンタクルズ社) を 1:5000 になるよう TBS-T で調製し使用した。その後、暗室にて Western blotting Luminol Reagent (sc2048、サンタクルズ社) の存在下 Hyper film (Amersham 社) に現像を行った。画像の解析には、写真画像をスキャナーで取り込み、NIH imaging 画像処理ソフトウェアを用いてバンドの濃度測定を行った。

(9) 統計学的検定

実験の結果はすべて平均値±標準誤差で示した。得られた結果は一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA) 後、Turkey の多重比較検定法を用いて統計学的処理を行った。危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

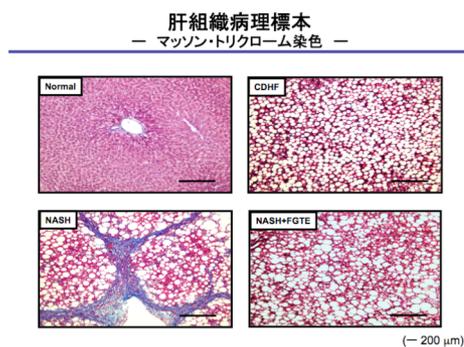
(1)

NASH 病態モデル動物 (INPADOC, PCT/JP 2007/52477) への FGTE 投与により、本素材による NASH 進行リスク低減機能について検討した。FGTE 投与により、NASH 群で惹起される血液生化学的肝機能パラメーターの変化は軽減した。

また、FGTE 投与は、NASH 群で低下する血中抗酸化活性を Normal 群と同レベルまで回復させ、DNA 酸化傷害マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の尿中排泄量の増加も低下させた。

さらに、NASH 群における顕著な肝線維化を FGTE 投与は抑制することが肝病理組織標本で実証された (図 2)。

図 2

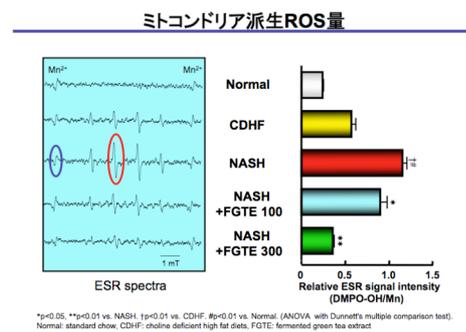


(2)

NASH 進展に対する FGTE の予防機序解明に向け、生体内における活性酸素・フリーラジカル種 (ROS) の主要発生部位であるミトコンドリアに注目し、その機能および形態

の変化について検討を行った。酸素電極法によりミトコンドリアの呼吸能を測定したところ、NASH 群ではミトコンドリア機能障害が認められていた。さらに、透過型電子顕微鏡観察により、ミトコンドリアの形態異常が NASH 群では惹起されていることが判明した。これら NASH におけるミトコンドリアの機能変性および形態異常は、FGTE 投与により Normal 群の結果に近づくことから、FGTE がミトコンドリア障害への予防機能を発揮することが判明した。ミトコンドリア中 Mn-SOD 蛋白発現は、NASH 群において低下していたが、FGTE 投与によって回復した。ミトコンドリアのエネルギー代謝から派生した ROS 量および過酸化脂質量は、NASH 群で有意に増加したが、FGTE 投与はこの増加を抑制した (図 3)。

図 3



(3)

NASH における炎症性変化に対する FGTE の影響について検討を行ったところ、好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシダーゼの肝組織中活性は、NASH 群において増大したが、FGTE 投与はこの増大を抑制した。さらに、酸化ストレス応答性転写因子 NF- κ B の核内移行量を検討したところ、NASH 群の肝ホモジネート核分画試料中の NF- κ B 蛋白量の増加が実証され、炎症蛋白の転写誘導シグ

ナル増大が示された。この増大は FGTE 投与により抑制された。

【結論】

本研究により、NASH 病態形成に酸化ストレス亢進による生体内レドックスバランス不均衡が密接に関与していること、さらにその原因にはミトコンドリア障害の関与が実証された。また、酸化ストレス亢進が NF- κ B 経路を介して炎症性蛋白を誘導し、炎症・線維化を惹起し NASH 進行を促していることが示された。さらに、抗酸化活性に優れた FGTE によって NASH 進行を予防できることを明らかにした。すなわち NASH モデルラットによる本研究から、抗酸化機能食品の合目的摂取は、脂肪肝から NASH 病態への進行を予防できることを実証した。したがって本研究の成果は NASH 進行予防に益する知見となる。

本研究の成果により、卓越した抗酸化機能を保持している食品素材および抗酸化剤、本研究の機能解析実験系およびこれらによる検討は、NASH 薬物治療および予防法確立の一助となり、新たな NASH 治療薬の創薬研究に貢献できると考えられる。

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)

- ① Takayama Fusako, Egashira Toru, Kawasaki Hiromu, Mankura Mitsumasa, Nakamoto Kazuo, Okada Shigeru, Mori Akitane. A Novel Animal Model of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): Hypoxemia Enhances the Development of NASH. *J Clin Biochem Nutr.* 45, 335-340

2009. 査読有り

- ② Takayama Fusako, Nakamoto Kazuo, Hasegawa Azusa, Mankura Mitsumasa, Egashira Toru, Ueki Keiji, Kawasaki Hiromu, Okada Shigeru, Mori Akitane. Beneficial effects of *Vitis coignetiae Pulliat* leaves on nonalcoholic steatohepatitis in a rat model. *Acta Med Okayama.* 63, 105-111 2009. 査読有り

- ③ Nakamoto Kazuo, Takayama Fusako, Mankura Mitsumasa, Hidaka Yuki, Egashira Toru, Ogino Tetsuya, Kawasaki Hiromu, Mori Akitane. Beneficial Effects of Fermented Green Tea Extract in a Rat Model of Non-alcoholic Steatohepatitis. *J Clin Biochem Nutr.* 44, 239-246, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① 中本賀寿夫、高山房子、万倉三正、川崎博己、森昭胤 緑茶発酵物水抽出エキスの非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットに対する予防効果について 第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会、2008 年 6 月 20-21 日、京都市
- ② 中本賀寿夫、高山房子、万倉三正、川崎博己、森昭胤 緑茶発酵物エキスの生体内レドックス制御機能と非アルコール性脂肪性肝炎への有効性に関する研究 第 10 回創薬薬理フォーラム岡山、2008 年 12 月 21 日、岡山市
- ③ Kazuo Nakamoto, Fusako Takayama, Mitsumasa Mankura, Toru Egashira, Tetsuya Ogino, Utsumi Kozo, Akitane Mori. Preventive effect of FGTE against an experimental NASH model rats. SFRBM's 15th Annual Meeting. November 19 - 23, 2008,

p128, Indianapolis, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 中本 賀寿夫

(NAKAMOTO KAZUO)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：30432636