

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20700603

研究課題名（和文）高脂肪食における脂質代謝異常と肝臓障害の解明

研究課題名（英文）Elucidation of lipid metabolic disorder and liver injury on the high fat diet

研究代表者

北森 一哉（KITAMORI KAZUYA）

金城学院大学・生活環境学部・講師

研究者番号：80387597

研究成果の概要（和文）：

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は世界中で増加しており、早急な予防法の確立が望まれている。そこで、本研究は SHRSP5/Dmcr の NAFLD モデルとしての有用性を明らかにすることを目的とした。SHRSP5/Dmcr は高脂肪・コレステロール（HFC）飼料摂取により、ヒト NAFLD の進行性モデルとなることを示し、本モデルはヒト NAFLD 患者のメカニズム解明に有効であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) are increasing worldwide, and preventive measures are an urgent need and primary concern today. The purpose of this study is to develop and clarify the usefulness of the SHRSP5/Dmcr rat as an animal model for human NAFLD. We have developed animal model of the NAFLD progression as observed in humans using SHRSP5/Dmcr rats fed an HFC diet. This model appears to be useful to investigate the mechanism of human NAFLD progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学・健康と食生活

キーワード：NAFLD NASH 高脂肪食

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) は非アルコール性脂肪肝 (NAFL) から、肝臓の慢性炎症、線維化、肝硬変など、慢性進行性の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) までの各病期を含む幅広い病態である。メタボリックシンドロームの増加と共に NAFLD の急増も懸念されており、早急な対応が望まれるが、予防策の進行状況は遅々としている。その一因として適切なモデル動物が存在しないことがあげられる。

これまで、肝臓の線維化に関しては、Dimethylnitrosamine (DMN) や Carbon tetrachloride (CCl₄) の薬剤によって線維化をひきおこす実験モデルが使用されてきた。これらの実験モデルにより、肝臓の線維化部位におけるコラーゲン線維の増加や血中細胞外基質の増加など、肝臓の線維化についての多くの原因が明らかにされてきた。しかし、これらの薬剤を用いた実験モデルには限界もあった。これらのモデル動物はヒトの NASH 患者の肝病変とは異なり、薬剤によって病態を引き起こしている。そのため、食事によって引き起こされる、肝臓への脂肪沈着から炎症や線維化への進行メカニズムを検討することができなかった。

SHRSP5/Dmcr、通称 Arteriolipidosis-prone rats (ALR) は stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) 系統の中で、高脂肪・コレステロール (HFC) 飼料の短期間摂取で脂質代謝異常を示したものを選択的に兄妹交配して得られた系統である。近年、このモデルに HFC 飼料を摂取させることにより肝臓への脂質沈着を確認してきた。

2. 研究の目的

本研究は、SHRSP5/Dmcr (ALR) の高脂肪食における脂質代謝異常と肝臓障害を明らかにし、NAFL から NASH に進行する適切な NAFLD 動物モデルとなるか確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と餌

雄性、ALR、全ての実験動物は specific pathogen-free 条件、室温 (23±2℃)、湿度 (55±5%)、8時-20時の12時間周期の明暗の基に飼育した。餌はコントロール飼料として、spontaneously hypertensive rat (SHR), SHRSP 系統のコントロール食として使用される SP diet を使用した。高脂肪負荷飼料として、HFC diet を使用した。36匹のALRをランダムに6群に分けた。10週齢から2、8、14週間、SP diet と HFC diet を自由摂取で与え、それぞれ、SP2W、HFC2W、SP8W、HFC8W、SP14W、HFC14W group とした。

なお、動物の飼育と実験は金城学院大学実験動物委員会に承認され、動物実験の倫理ガイドラインに従って実施された。

(2) 体重、血圧、血中生化学分析

体重と血圧は飼料開始前、飼料開始2週間後、8週間後、14週間後の解剖前にそれぞれ測定した。血清サンプルは空腹時条件下で採取し、採血はペントバルビタール麻酔下で安楽死前に腹部大動脈より採取した。血清サンプルは-80℃で保存した。Serum glucose (Glu), protein (Pro), albumin, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), free fatty acid (FFA), Type IV collagen 7S, γ -GTP, Insulin 値は株式会社 SRL に測定依頼した。TNF α は ELISA キットを用いて測定した。肝臓中の TG, TC 値は Folch の方法で脂質を抽出後、和光のキット、トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコーをそれぞれ用いて測定した。

(3) 組織染色

血液をサンプリング後、肝臓を採取し、一部は、直ちに PBS で洗浄後、0.1M リン酸バッファー (pH7.4) -4%パラフォルムアルデヒドによって固定した。エタノール系で脱水してパラフィンに包埋した。切片は4 μ に薄切し、hematoxylin-eosin (H. E.) と Azan でそれぞれ染色後、光学顕微鏡で観察した。パラフィン包埋した肝臓は組織学的検討に使用した。脂質沈着と炎症の確認は H. E. 染色で評価した。線維化の確認は azan 染色で評価した。血液から分離した血清と残りの肝臓は -80℃で保存した。

(4) 解析

全てのデータは平均±標準偏差で示した。各週齢の SP diet group と HFC diet group 間の統計は t-test、加齢による変化は二元配置分散分析後、Tukey test で解析した。有意水準は $P < 0.05$ とした。全ての計算は JMP software (SAS Institute, Cary, NC) によって解析した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

① 体重と血圧

摂餌開始前から 2 週間、8 週間、14 週間における体重は、SP diet group において、摂餌期間とともに増加した。しかし、HFC diet group の体重の増加は SP diet group に比較し緩やかであった(図 1A)。SP diet group の血圧には摂餌期間中変化が認められなかった。一方、HFC diet group は HFC14W group で SP14W group に比較し有意な低下が認められた(図 1B)。

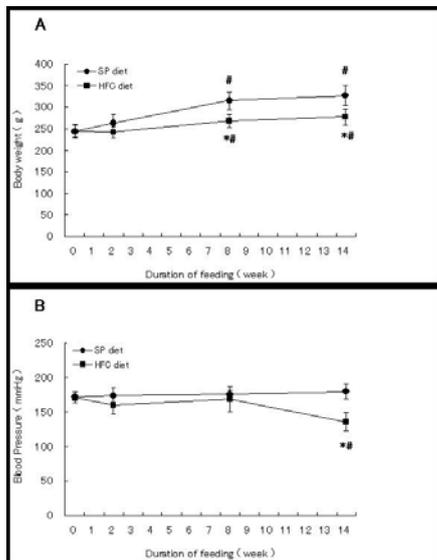


図 1. 体重と血圧

② 血清生化学

Serum albumin 値は摂餌期間 8 週間、14 週間において、HFC diet の影響を若干受け、SP diet group に比較し有意な減少が認められた。HFC diet group の serum Glu 値は SP diet group に比較し有意な低値を示した。

HFC diet group の serum AST、ALT 値は、SP diet group に比較し高値を示した。また、HFC diet group のそれらの値は摂餌期間の延長に伴い上昇した。HFC8W group、HFC14W group の γ -GTP 値は SP group に比較し高値を示した。さらに、HFC14W group の γ -GTP 値は HFC8W group に比較し有意な高値を示した。

HFC 8W group の serum FFA は SP 8W group に比較し有意な低値を示した。HFC diet group の serum TC 値は、SP diet group に比較し高値を示した。また、HFC diet group のそれらの値は摂餌期間の延長に伴い上昇した。

HFC14W group の Serum collagen は SP14W group に比較し有意な高値を示した。HFC diet group の serum TNF α 値は、SP diet group に比較し高値を示した。また、HFC diet group のそれらの値は摂餌期間の延長に伴い上昇した。

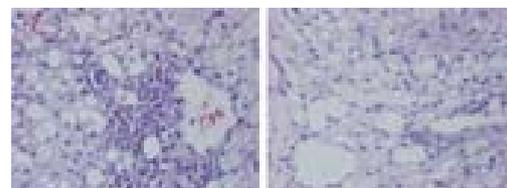
③ 形態学的所見

肉眼的には、HFC2W group の肝臓は SP2W group に比較し白色化していた。HFC8W group の肝臓は HFC2W group より肝臓の白色化がさらに進行した。HFC14W group の肝臓は表面に凹凸が目立ち、質感の硬化が認められた。

④ 組織学的所見

SP2W group に比較し、HFC2W group は脂質沈着が認められた。また、炎症性の細胞浸潤が認められた。HFC8W group においては、HFC2W group に比較し、更に脂質沈着や炎症性細胞の浸潤が進行した。HFC14W group においては、線維化が疑われた(図 2)。

線維化を確認するため、肝臓の Azan 染色を行った。SP8W group に比較し、HFC8W group では、線維化を認めた。HFC14W group では、他の群に比較し、大小不同の結節、偽小葉の分布が標本全体に認められた(図 3)。これらの所見は全実験期間を通じて、SP group では認められなかった。



HFC8W

HFC14W

図 2. H.E. 染色

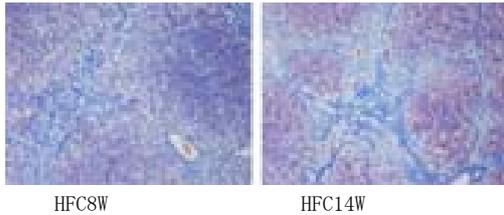


図 3. Azan 染色

⑤ 肝臓脂質

組織学的には明らかな脂質沈着が認められたため、肝臓組織中の TG, TC 値を測定した。肝臓組織中の TG, TC levels は SP diet group に比較し HFC diet group で高値を示した。また、肝臓 TC 値は HFC diet group において、摂餌期間と共に上昇した。一方、肝臓 TG 値は HFC2W group に比較し、HFC14W group で低値を示した。

(2) 国内外における位置づけ

ヒト NAFLD 患者の食事は高脂肪、高コレステロールの特徴を持つ。この特徴を反映した飼料により、肝臓への脂質沈着を発症するモデルはこれまでも存在していた。しかし、食事起因性の NAFLD モデルにおいて、重度の線維化までを発症するモデルはなかった。本モデルは、食事が原因で NAFLD を発症し、更には NAFLD 初期の脂質沈着から重度の線維化までを網羅することが示された。これらの特徴を生かし、今後、NAFLD の予防法の確立に役立つことを期待している。

(3) 今後の展望

これらの結果から、本モデルはヒト NAFLD 患者の病態に類似した、食事起因性の NAFLD モデルになることが、示唆された。しかし、今回、非アルコール性脂肪肝炎進展に与える脂肪・コレステロールのそれぞれの影響とそのメカニズムは明らかにされていない。そのため、今後は、これらの問題を明らかにする必要がある。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 内藤久雄、玉田葉月、北森一哉、柳場由絵、植草良輔、王棟、那須民江
高脂肪・高コレステロール食による脂肪肝・炎症・線維化進展とコレステロール動態との関連. 第 9 回分子予防環境医学研究会.

2010 年 1 月 22 日～23 日. 東京

② 北森一哉、安井菜穂美、玉田葉月、宮澤大介、安井裕子、土倉寛、池田克巳、家森幸男、那須民江

高脂肪コレステロール食における肝臓線維化への影響. 第 8 回分子予防環境医学研究会. 2009 年 1 月 23 日～24 日. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北森 一哉 (KITAMORI KAZUYA)

金城学院大学・生活環境学部・講師

研究者番号：80387597