

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32696

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K13829

研究課題名（和文）米によるNAFLD改善効果とその分子機構の解明 セラミド代謝からのアプローチ

研究課題名（英文）Improvement of NAFLD by rice and elucidation of its molecular mechanism: An approach from ceramide metabolism

研究代表者

松本 雄宇（MATSUMOTO, Yu）

駒沢女子大学・人間健康学部・講師

研究者番号：80803262

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究ではNAFLDモデル細胞とNAFLDモデル動物を用いて米によるNAFLD予防・改善効果とセラミド代謝への影響を検討した。NAFLDモデル動物を用いた実験で、米タンパク質加水分解物（RPH）による肝障害抑制作用と肝臓でのセラミド合成阻害作用が示唆された。NAFLDモデル細胞を用いた実験によりセラミド生合成の阻害がNAFLDの改善に有効であることが示唆されたが、RPHによる改善効果は認められなかった。一方で、培養細胞を用いた実験でもRPHによる肝障害抑制作用は示唆された。以上の結果より、RPHはNAFLDの改善よりも予防に有効な食品成分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

本研究により、米タンパク質加水分解物がNAFLD発症予防に有効であることを示すことができた。また、その分子メカニズムの一端としてセラミド代謝の変化を捉えることができたことは、NAFLDだけでなくセラミド代謝との関連が指摘されている他の疾病への応用にもつながるものであると考えられる。さらに、セラミド合成阻害剤によるNAFLD改善効果の基礎的データも収集することができた。本研究の成果は、日本人の主食である米がNAFLD発症を予防する可能性を示すものであり、医学的、栄養学的、食品機能学的に重要な知見であるといえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the preventive and ameliorative effects of rice on NAFLD and its impact on ceramide metabolism using NAFLD model cells and NAFLD model animals. Experiments with NAFLD model animals suggested that rice protein hydrolysate (RPH) has a liver-protective effect and an inhibitory effect on ceramide synthesis in the liver. Experiments using NAFLD model cells suggested that the inhibition of ceramide biosynthesis is effective for improving NAFLD, although the ameliorative effect of RPH was not observed. On the other hand, the liver-protective effect of RPH was also suggested in experiments using cultured cells. Based on these results, RPH is considered to be a food component more effective for the prevention of NAFLD than for its improvement.

研究分野：栄養生化学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 米由来成分 セラミド代謝

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は飲酒歴がないにも関わらず、肝臓内に過剰な脂肪が蓄積することで組織学的な変化を引き起こしている状態を指す。NAFLD は日本人の約 30% が罹患している普遍的な疾患であり、その予防および改善は医療費負担の軽減や生活の質向上の観点からも早急に取り組むべき課題の一つである。

近年の研究で、スフィンゴ脂質の 1 つであるセラミドが、NAFLD の発症や進行に深く係わっていることが報告され (Trends Endocrinol Metab 26(10): 538-550. 2015, Diabetes 57(5): 1355-62. 2008) 注目を集めている。セラミドは、インスリンシグナルの中間因子である AKT のリン酸化を阻害することでインスリン抵抗性を引き起こす。また、セラミドは炎症性サイトカインを増加させ、NAFLD の増悪を引き起こすことが報告されている。一方、セラミドをターゲットとした NAFLD 対策も研究されており、一定の結果を得ている (Science 365: 386-392. 2019, Liver Int 34: 1074-1083. 2014)。一例をあげると、60%高脂肪食を摂取させ NAFLD を発症させた動物にセラミド合成の阻害剤を投与すると、NAFLD を改善できることが報告されている。したがって、今後の NAFLD 対策を考える上で、セラミド代謝を中心とした研究が必要である。

一方、研究代表者は、食品の機能性に関する研究を行ってきた中で、いくつかの食品が NAFLD の予防効果を示すことを見出した (松本 et al, 日本食生活学会誌, 2016、志波、伊藤、松本 et al, 日本乳酸菌学会誌, 2018、Matsumoto et al, J Nutr Biochem, 2020)。特に、日本人の食生活には欠かせない米が、NAFLD に効果的であったことには特に注目に値する。具体的には、NAFLD 発症モデルである Zucker ラットに白米および玄米を摂取させることで、肝障害マーカーの抑制と肝臓への脂肪蓄積の抑制を確認した (Matsumoto et al, J Nutr, 2021)。この結果を受け、白米と玄米に加えて米糠群を設定し、有効成分を含む画分の絞り込みを行った。その結果、玄米摂取群に顕著な NAFLD 予防効果が見られ、白米及び米糠群でも玄米群ほどではないが同様の結果が得られた。さらに、白米、玄米および米糠摂取群の肝臓中セラミド合成酵素の遺伝子発現量は Control 群と比べ顕著に低かった。以上の結果は、白米、玄米および米糠はセラミド代謝の変動を介して NAFLD を予防することを示唆しているが、これらの食品が NAFLD を「改善」できるのか不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では米による NAFLD 改善効果とセラミド代謝を中心とした分子機構の解明を目的とし、以下について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物を用いた米タンパク質加水分解物 (RPH) の NAFLD 予防作用の検討

KK-Ay マウスに 60%高脂肪飼料を摂取させた群 (対照群) と、60%高脂肪飼料に米タンパク質加水分解物を加えた飼料 (タンパク質、脂質、炭水化物のエネルギー比が 60%高脂肪飼料とほぼ同一になるよう調製) を摂取させた群 (RPH 群) の 2 群を設定し、4 週間飼育した。試験終了後、臓器重量、血中アミノ酸濃度、血中 ALT 活性 (肝障害マーカー)、肝臓中脂質量などを測定した。さらに、セラミド代謝について検討するためセラミド合成酵素であるセラミドシンターゼ 6 (CerS6) とジヒドロセラミド不飽和化酵素 (DEGS1) の遺伝子発現量も測定した。

### (2) in vitro NAFLD モデル細胞の構築

ヒト肝がん由来細胞である HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞は 10% FBS、1% ペニシリンストレプトマイシン含有 D-MEM において、37℃、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。HepG2 細胞を  $1 \times 10^5$  個になるよう播種し一定時間培養後、fatty acid free BSA に結合させたパルミチン酸 (palmitic acid: PA) を培地に添加し 24 時間インキュベートした。インキュベート後、WTS assay により細胞生存率を評価した。また、Oil red O により脂肪蓄積量を評価した。

### (3) HepG2 細胞を用いたセラミド合成阻害剤の細胞毒性の検討

HepG2 細胞を  $1 \times 10^5$  個になるよう播種し一定時間培養後、セラミド合成阻害剤であるミリオシン (Myr) とフェンレチニド (Fen) を添加した。24 時間インキュベート後、WTS assay により細胞生存率を評価した。

### (4) HepG2 細胞を用いたセラミド合成阻害剤の NAFLD 予防・改善作用の検討

セラミド合成阻害剤の NAFLD 予防作用を検討するため、HepG2 細胞を  $1 \times 10^5$  個になるよう播種し一定時間培養後、0.25 mM の PA と 2 種類のセラミド合成阻害剤を同時に添加した。24 時間インキュベート後、Oil red O 染色により脂肪蓄積量を評価した。

NAFLD 改善作用を検討するため、HepG2 細胞を  $1 \times 10^5$  個になるよう播種し一定時間培養後、0.25 mM の PA を添加した。24 時間インキュベート後、2 種類のセラミド合成阻害剤を添加した。24 時間インキュベート後、Oil red O 染色により脂肪蓄積量を評価した。

#### ( 5 ) HepG2 細胞を用いた RPH の細胞毒性の検討

HepG2 細胞を  $1 \times 10^5$  個になるよう播種し一定時間培養後、RPH を添加した。24 時間インキュベート後、WTS assay により細胞生存率を評価した。

#### ( 6 ) HepG2 細胞を用いた RPH の NAFLD 予防・改善作用の検討

RPH の NAFLD 予防作用を検討するため、HepG2 細胞を  $1 \times 10^5$  個になるよう播種し一定時間培養後、0.25 mM の PA と RPH を同時に添加した。24 時間インキュベート後、Oil red O 染色により脂肪蓄積量を、WTS assay により細胞生存率を評価した。また、PA 添加の 4 時間前から RPH を処理した条件でも検討した。

NAFLD 改善作用を検討するため、HepG2 細胞を  $1 \times 10^5$  個になるよう播種し一定時間培養後、0.25 mM の PA を添加した。24 時間インキュベート後、RPH を添加した。24 時間インキュベート後、Oil red O 染色により脂肪蓄積量を評価した。

### 4 . 研究成果

#### ( 1 ) 動物を用いた RPH の NAFLD 予防作用の検討

肝障害マーカーとして知られる血中 ALT 活性は、対照群に比べ RPH 群で低値を示した。肝臓における CerS6 の遺伝子発現量を測定したところ、対照群に比べ RPH 群で低値を示した。また有意差はないものの、DEGS1 の遺伝子発現量も低値を示した ( $P=0.065$ )。以上より、RPH はセラミド合成酵素の遺伝子発現量を低下させることで、高脂肪食に起因する肝障害を抑制することが示唆された。一方で、肝臓中 TG 量に有意な差は認められず、脂肪蓄積には影響しないことが示唆された。

NAFLD の発症は肥満と密接な関係にあるため、本実験では肥満に対する RPH の効果も検討した。その結果、RPH 摂取は高脂肪食による体重増加と精巣周囲脂肪重量の増加を抑制した。興味深いことに、複数の血中アミノ酸濃度が精巣周囲脂肪重量と負の相関関係を示した。さらに、血中 ALT 活性や肝臓中の CerS6 の遺伝子発現量も一部の血中アミノ酸濃度と相関していた。したがって、本研究で観察された RPH の効果には血中遊離アミノ酸濃度の上昇が関わっていると考えられる。

#### ( 2 ) In vitro NAFLD モデル細胞の構築

HepG2 細胞に 0.10 mM、0.25 mM、0.50 mM の PA を処理した後、細胞生存率と脂肪蓄積量を評価した。その結果、PA 濃度依存的な細胞生存率の低下と脂肪蓄積量の増加が認められた。0.10 mM の PA 処理でも細胞生存率の低下と脂肪蓄積量の増加が認められたものの、その影響はわずかであった。一方、0.25 mM まで濃度を高めると予防・改善効果を検討するのに十分な効果が認められた。以上より、0.25 mM の PA 処理を in vitro NAFLD モデル細胞として以降用いることとした。

#### ( 3 ) HepG2 細胞を用いたセラミド合成阻害剤の細胞毒性の検討

添加濃度を決定するため Fen と Myr の細胞毒性を検討した。その結果、本実験で使用した濃度では Fen (1  $\mu$ M と 5  $\mu$ M)、Myr (12.5  $\mu$ M と 25.0  $\mu$ M) とともに細胞毒性が認められなかった。

#### ( 4 ) HepG2 細胞を用いたセラミド合成阻害剤の NAFLD 予防・改善作用の検討

構築した in vitro NAFLD モデル細胞を用いてセラミド合成阻害剤の NAFLD 予防作用を検討した。その結果、5  $\mu$ M の Fen は PA による脂肪蓄積を抑制する効果が認められた。続いて、セラミド合成阻害剤の NAFLD 改善効果を検討したところ、PA 添加によって蓄積した脂肪は 5  $\mu$ M の Fen 添加によって減少した。一方、Myr については両実験で一貫した結果が得られなかった。以上より、セラミド合成阻害剤である Fen は NAFLD の予防・改善に有効であることが示唆された。Fen と Myr は同じセラミド合成阻害剤であるが作用機序が異なっている。したがって、NAFLD の予防・改善には DEGS1 の阻害が効果的である可能性が考えられる。

#### ( 5 ) HepG2 細胞を用いた RPH の細胞毒性の検討

動物実験の結果から、RPH は高脂肪食に起因する肝障害を抑制すること、またセラミド合成酵素の発現量を低下させることが示された。そこで、上述の Fen による NAFLD 予防・改善効果の検討と同様の実験条件を用いて RPH による NAFLD 予防・改善効果を検討した。

初めに、添加濃度を決定するため RPH の細胞毒性を検討した。その結果、2 mg/mL で細胞生存率の有意な低下が認められた。一方、1.2 mg/mL では細胞生存率の有意な低下は認められなかった。したがって、RPH の添加濃度は 1.2 mg/mL までとした。

#### ( 6 ) HepG2 細胞を用いたセラミド合成阻害剤の NAFLD 予防・改善作用の検討

構築した in vitro NAFLD モデル細胞を用いて RPH の NAFLD 予防作用を検討した。その結果、RPH (0.6 ~ 1.2 mg/mL) は PA による脂肪蓄積を抑制することが示唆された。一方、RPH は PA による細胞生存率の低下を抑制できず、RPH の最終濃度 1.0 ~ 1.2 mg/mL では PA 添加に比べ細胞生存率の低下が認められた。以上より、RPH は PA による脂肪蓄積を抑制するが、PA による細胞生存率の低下に対しては有効性を示さず、濃度によってはむしろ PA の細胞毒性を強めることが示

唆された。この動物実験と矛盾した結果の原因は実験条件にあると予想し、PA 添加の 4 時間前から RPH を添加する条件に変更したところ、RPH (0.5~1.0 mg/mL) は PA による細胞生存率の低下を抑制する傾向を示した。今後はこの条件でさらなる検討を行っていきたい。

続いて RPH の NAFLD 改善効果を検討したが、PA 添加によって蓄積した脂肪の量は RPH 添加により減少しなかった。以上の結果から、RPH は脂肪毒性に対しては一定の有効性を示す食品成分であると考えられる。

本研究では RPH しか検討できていないが、今後は複数の米由来成分について検討していく予定である。それらによって NAFLD を改善する米由来成分を見出すことができれば、肝臓がんリスクを低減させる食事療法の提言や有効成分の含有量に着目した品種改良などが期待できる。また、RPH 摂取によりセラミド合成酵素の遺伝子発現量に変化が認められることから、NAFLD のみならずセラミド代謝との関連が指摘されている他の代謝性疾患への展開も期待できる。

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 0件）

1 . 著者名 Matsumoto Yu、Iwasaki Yu、Hosokawa Megumi、Suzuki Tsukasa、Inoue Jun、Shigemura Yasutaka、Takano Katsumi、Yamamoto Yuji	4 . 巻 70
2 . 論文標題 Effect of extracted rice protein hydrolysate on high-fat diet induced obesity in mice	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	6 . 最初と最後の頁 177-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/nskkk.NSKKK-D-22-00090	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 -

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

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
---------	---------