

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590864

研究課題名（和文）メチル化カテキンは NASH（非アルコール性脂肪性肝炎）の治療薬として有効か？

研究課題名（英文）Whether methylated-(3'')-epigallocatechin gallate is useful for the therapy of NASH (nonalcoholic steatohepatitis) ?

研究代表者

上野 隆登 (UENO TAKATO)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究者番号：70176618

研究成果の概要（和文）：メチオニン・コリン欠乏食 (MCD) 投与非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルマウスに「べにふうき」緑茶メチル化カテキンを投与後、炎症細胞浸潤、風船化肝細胞、Mallory-Denk body、肝細胞周囲線維化が改善した。肝細胞内 80hdG 免疫反応産物の発現は明らかに減少し酸化ストレスも抑制された。TNFR、pAkt、pNF κ B の蛋白発現は明らかに減少し抗炎症作用が見られ、pIRS-1 の蛋白発現は増加しインスリン感受性も回復した。メチル化カテキンは MCD による NASH モデルマウスの肝病変を改善した。

研究成果の概要（英文）：After methylated-(3'')-epigallocatechin gallate (MethyleGCG) was treated in the nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model mice fed a methionine-choline-deficient diet (MCDD), infiltration of inflammatory cells, ballooning hepatocytes, Mallory-Denk body and pericellular fibrosis in the liver tissues improved. In addition, 8-hydro-2'-deoxyguanosine (80hdG) -immunoreactive products in the hepatocytes were decreased, and the oxidative stress was suppressed. The protein expression of TNFR, pAkt and pNF κ B was clearly decreased, and that of pIRS-1 was increased. From these results, MethyleGCG improved the liver injuries in the NASH model mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、治療、メチル化カテキン、酸化ストレス、炎症、インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

ポリフェノールのひとつで、緑茶から抽出されるカテキンは抗酸化作用が注目されている。申請者らは抗ウイルス、抗線維化もふくめ総合的治療戦略の研究をすすめて来た。メチル化カテキンはカテキンに比べより強い抗酸化作用があり、実際、申請者らはカテキ

ンより低濃度のメチル化カテキンが in vitro のみならず in vivo においても抗酸化作用を示すことを AACR で報告した (Hashimoto O, Ueno T, et al: AACR Annual Meeting 2008 Proceedings, 145, 2008)。

2. 研究の目的

申請者らは強力な抗酸化作用を持つメチル化カテキン (epigallocatechin-3-(3',5'-O-methyl) gallate; 3',5'-O-methyl-EGCG) が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の治療薬になり得るか否かを検討した。

3. 研究の方法

本研究では以下の (1) ~ (3) の研究計画と方法で研究期間内に研究課題を明らかにする。

(1) 緑茶カテキンよりさらに強力な抗酸化作用を持つ「べにふうき」緑茶メチル化カテキンが非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を改善するか否かを検討した。生後 7 週目雄性 C57BL/6 マウスにメチオニン・コリン (M/C) 欠乏飼料を摂取させ NASH モデルを作製した。18 週目から M/C 欠乏飼料とともに、20%メチル化カテキン含有緑茶エキスを投与した群 (高濃度群)、2%メチル化カテキン含有緑茶エキスを投与した群 (低濃度群)、メチル化カテキン以外の緑茶カテキンを投与した群、M/C 欠乏飼料のみ投与した群の 4 群を作製した。28 週目に殺戮し、1) 肝体重比の算出、2) 血液生化学的検査、3) 肝組織学的評価、4) 抗 8-hydro-2'-deoxyguanosine (8OhdG) 抗体を用いた免疫組織化学による酸化ストレスの評価、5) TNF α シグナル系の観察では抗 TNF α 、Akt、p (リン酸化) Akt、NF κ B、pNF κ B 各抗体を用いて、インスリンシグナル系では抗 IRS、pIRS 抗体による Western Blot を行った。

(2) 「べにふうき」メチル化カテキンが非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を改善するか否かを検討した。生後 7 週目雄性 C57BL/6 マウスにメチオニン・コリン (M/C) 欠乏飼料を摂取させ NASH モデルを作製した。18 週目から M/C 欠乏飼料とともに、20%メチル化カテキン含有緑茶エキスを投与した群 (高濃度群)、2%メチル化カテキン含有緑茶エキスを投与した群 (低濃度群)、メチル化カテキン以外の緑茶カテキンを投与した群、M/C 欠乏飼料のみ投与した群の 4 群を作製した。28 週目に殺戮し、1) 肝体重比の算出、2) 肝組織学的評価、3) 抗 8-hydro-2'-deoxyguanosine (8OhdG) 抗体を用いた免疫組織化学による酸化ストレスの評価、4) TNF α シグナル系の観察では抗 TNF 受容体 (R)、Akt、リン酸化 (p) Akt、NF κ B、pNF κ B 各抗体を用いて、インスリンシグナル系では抗 IRS-1、pIRS-1 抗体による Western Blot を行った。

(3) 肥満、耐糖能異常、高脂血症などヒトの生活習慣病類似病態を呈する生後 7 週目の雄性 KKA y マウスにメチオニン・コリン欠乏食 (MCD) を 4 週間摂取させ NASH モデルを作

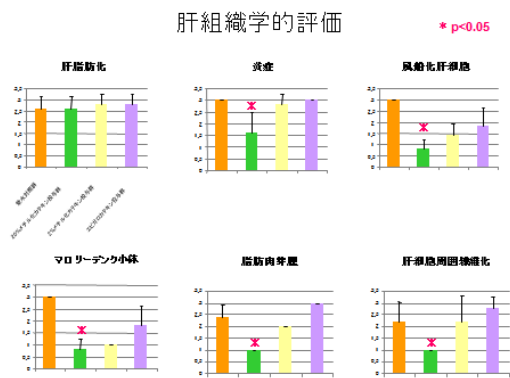
製した。MCD と同時に、通常餌投与対照 (A) 群、MCD+Zn, Se 微量元素強化餌投与 (B) 群、MCD+分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 強化餌投与 (C) 群、MCD+微量元素+BCAA 強化餌投与 (D) 群、MCD+微量元素+BCAA+ビタミン強化餌投与

(E) 群を作製した。5 週目に殺戮し、1) 体重、肝重量を測定し肝体重比の算出、2) 血液生化学的検査、3) 肝組織学的評価、4) 抗 8-hydro-2'-deoxyguanosine (8OhdG) 抗体、4-hydroxynonenal 抗体を用いた免疫組織化学による酸化ストレスの評価、5) 炎症系を観察するためリン酸化 (p) NF κ B、NF κ B 各抗体を用いて、脂質代謝系を観察するため抗 SREBP-1c、pAcetylCoA 抗体、また ER stress 関連では抗 Grp78、PERK、pELF、ATF6 抗体による Western Blot を行った。

4. 研究成果

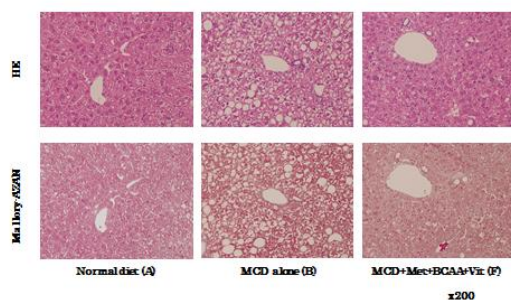
(1) 肝体重比は 4 群間でほぼ同様の値を呈し有意差は見られなかったが、高濃度群の血中 ALT、血糖値は他の群に比較して有意に低値であった。4 群間で脂肪沈着の程度には有意差は見られなかったが、炎症細胞浸潤、風船化肝細胞、肝細胞周囲線維化の程度は他の群に比較して高濃度群で有意に低値であった。高濃度群の肝細胞内 8OhdG 免疫反応産物の発現は他の 3 群に比較して明らかに減少し酸化ストレスも抑制された。Western Blot による検討では、高濃度群の肝臓における TNF α 、Akt、リン酸化 (p) Akt、NF κ B、pNF κ B の蛋白発現は他の群に比較して明らかに減少したが、IRS、pIRS の蛋白発現は明らかに増加していた。

(2) 肝体重比は 4 群間でほぼ同様の値を呈し有意差は見られなかった。4 群間で脂肪沈着の程度には有意差は見られなかったが、炎症細胞浸潤、風船化肝細胞、Mallory-Denk body、肝細胞周囲線維化の出現頻度は他の群に比較して高濃度群で有意に低値であった。高濃度群の肝細胞内 8OhdG 免疫反応産物の発現は他の 3 群に比較して明らかに減少し酸化ストレスも抑制された。Western Blot による検討では、高濃度群の肝臓における TNFR、pAkt、pNF κ B の蛋白発現は他の群に比較して明らかに減少したが、pIRS-1 の蛋白発現は増加していた。メチオニン・コリン (M/C) 欠乏食による NASH モデルマウスにおいてメチル化カテキンは他の緑茶カテキンより強い抗酸化作用とともに抗炎症作用を惹起し、インスリン感受性も回復させ NASH を改善した (図 1)。



(図1) 肝組織像のモルフォメトリー

(3) 平均肝体重比はA群、B群、C群、D群、E群に従い低値となった。血液生化学検査ではC、D、E群の総ビリルビン、LDH、ALT、AST、およびヒアルロン酸の値が他の群に比較して有意に低値であった。肝組織像の検討ではC、D、E群の脂肪沈着、細胞浸潤、マロリー・デンク小体、線維化の程度が他の群に比較して改善していた。また免疫組織化学による酸化ストレスの検討でC、D、E群の抗酸化作用も他の群に比較して有意に改善していた。Western Blotでは、微量栄養素の種類が増えるにつれ脂質代謝系のSREBP-1c発現が減弱する一方pAcetylCoA発現は増加し、ER stress関連のGrp78、PERK、pELF、ATF6の発現はE群が最も減少していた。炎症系のpNFκBの発現は微量栄養素の種類が増えるにつれ減少していた。以上の結果から、分岐鎖アミノ酸はNASHの発症進展に関わる脂質代謝異常、ERstress、酸化ストレス、炎症に対し抑制的に作用するとともに微量元素、ビタミン類が更に効果を増強することが明らかとなり、NASHに対する新たな治療薬として活用できる可能性も推察された(図2)。



(図2) 肝組織像の比較

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12件)

- Hotta K, et al (36人中25番目), Association between type 2 diabetes genetic susceptibility loci and visceral and subcutaneous fat area as determined by computed tomography, *J Hum Genet*, 査読有, 56, 2012, 716-719.
- Tonan T, Fujimoto K, Qayyum A, Morita Y, Nakashima O, Ono N, Kawahara A, Kage M, Hayabuchi N, Ueno T, CD14 expression and Kupffer cell dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis: Superparamagnetic iron oxide-magnetic resonance image and pathologic correlation, *J Gastroenterol Hepatol*, 査読有, 27, 2012, 789-796.
- Hotta K, et al (35人中24番目), Genetic variations in the CYP17A1 and NT5C2 genes are associated with a reduction in visceral and subcutaneous fat areas in Japanese women, *J Hum Genet*, 査読有, 57, 2012, 46-51.
- Ueno T, et al, Adiponectin suppresses endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic steatohepatitis, *Exp Ther Med*, 査読有, 2, 2011, 1035-1040.
- Hotta K, et al (33人中22番目), Computed tomography analysis of the association between the SH2B1 rs7498665 single-nucleotide polymorphism and visceral fat area, *J Hum Genet*, 査読有, 2011, 716-719.
- Hotta K, et al (30人中20番目), Association of variations in the FTO, SCG3 and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population, *J Hum Genet*, 査読有, 56, 647-651.
- 上野 隆登, 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者のリハビリテーション, *臨床リハ*, 査読無, 20, 328-333.
- Nakamura A, Ueno T, et al, Human primary cultured hepatic stellate cells can be cryopreserved, *Med Mol Morphol*, 査読有, 43, 2010, 107-115.
- 上野 隆登, NAFLDに対する食事・運動療法, *肝胆膵*, 査読無, 60, 2010, 999-1005.
- Ueno T, Torimura T, Nakamura T, Sivakumar R, Nakayama H, Otabe S, Yuan X, Yamada K, Hashimoto O, Inoue K, Koga H, Sata M, Epigallocatechin-3-gallate improves nonalcoholic steatohepatitis model mice expressing nuclear sterol regulatory element binding protein-1c in adipose tissue, *Int J Mol Med*, 査読有, 24, 2009, 12-22.
- Nakayama H, Otabe S, Yuan X, Ueno T, Hirota N, Fukutani T, Wada N, Hashinaga T, Yamada K, Effects of adiponectin

transgenic expression in liver of nonalcoholic steatohepatitis model mice, *Metabolism: Clin & Exp*, 査読有, 58, 2009, 901-908.

12. Hotta K, et al (31人中20番目), Association between obesity and polymorphisms in SEC16B, TMEM18, GNPDA2, BDNF, FAIM2 and MC4R in a Japanese population, *Am J Pathol*, 査読有, 176, 2009, 168-176.

[学会発表] (計13件)

1. Ueno T, What microscopy can tell us about liver diseases ?, The 11th Interamerican Congress on Microscopy (CIASEM 2011), 2011.9.29, Merida, Yucatan, Mexico.

2. Ueno T, Therapeutic effects of metals and branched-chain amino acids in nonalcoholic steatohepatitis, The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 2011.11.7, San Francisco, USA.

3. 上野 隆登, アディポネクチンは肝での ER stress を軽減し NASH の進展を抑制する, 第47回日本肝臓学会総会, 2011.6.2, 東京.

4. 上野 隆登, 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に対する抗酸化微量栄養素の効果, 19th JDDW, 2011.10.21, 福岡.

5. 東南 辰幸, NASH における Kupffer 細胞機能評価: SPIO-MRI と病理学的所見との相関, 第18回肝血流動態イメージ研究会, 2012.1.28, 神戸.

6. Nakayama H, Adiponectin expressed in liver directly improves nonalcoholic steatohepatitis (NASH) by way of anti-inflammation and anti-oxidative stress, The 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 2010.4.16, Vienna, Austria.

7. Ueno T, Green tea catechin improves steatohepatitis in transgenic mice overexpressing nSREBP-1c in adipose tissue, 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, 2010.8.29, Pasadena, USA.

8. Ueno T, Adiponectin suppresses endoplasmic reticulum (ER) stress in nonalcoholic steatohepatitis (NASH), The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 2010.11.1, Boston, USA.

9. Ueno T, Cytokine regulation in NASH, The 9th Single Topic Conference (JSH) "NASH 2010", 2010.11.18, Tokyo, Japan.

10. 上野隆登, 緑茶エピガロカテキンガレートは NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) 肝の Kupffer 細胞を減少させ、抗炎症、抗酸化、インスリン感受性を誘導する, 第38回日本肝臓学会西部会, 2009.12.4, 米子.

11. Hashimoto O, Molecular targeted therapy using natural food, Benifuki Tea methylEGCG (Methylated-(3')-epigallocatechin gallate) in hepatoma, 3rd International Kobe Liver Symposium on HCC with a JSH-ILCA Joint Scientific Session, 2009.6.7, Kobe, Japan.

12. 上野 隆登, 緑茶カテキンは NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) を改善する - nSREBP1-c トランスジェニック NASH モデルマウスによる検討 -, 第45回日本肝臓学会総会, 2009.6.4, 神戸.

13. 上野 隆登, NAFLD の発症病態に基づく治療戦略 - nSREBP1c トランスジェニックマウスを用いた検討, 第95回日本消化器病学会総会, 2009.5.7, 札幌.

[図書] (計4件)

1. 上野 隆登, 学際企画, 病気の分子形態学, 2011, 370.

2. 花田 慎一郎, 上野隆登, 他, 東洋書店, アルコールと医学生物学, 140.

3. 中山ひとみ, 上野隆登, 他, 株式会社メディカルトリビューン, 酸化ストレスと肝疾患, 6, 2010, 130.

4. 森田恭代, 上野隆登, 他, メディカルトリビューン, 酸化ストレスと肝疾患, 5, 2009, 147.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

1. 名称: 非アルコール性脂肪性肝炎の改善用組成物

発明者: 上野 隆登, 橋本 修

権利者: 久留米大学

種類: 特許

番号: 特願2010-172131

出願年月日: 平成22年7月30日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/liver/content.html>

6. 研究組織

研究代表者

上野 隆登 (UENO TAKATO)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授
研究者番号: 70176618

連携研究者

中山 ひとみ (NAKAYAMA HITOMI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20368955

橋本 修 (HASHIMOTO OSAMU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50289427