

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07335

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝疾患における薬用植物ヨモギの肝保護作用に関する研究

研究課題名（英文）Hepatoprotective effect of Mugwort on nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

伊 敏 (YI, MIN)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：40292007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の病態進展の主要な原因は脂質の異常蓄積による肝細胞傷害が指摘されている。本研究では、薬用植物ヨモギの肝細胞障害に対する抑制効果を検討した。マウス肝細胞では、ヨモギは濃度依存的に飽和脂肪酸負荷による酸化ストレス、小胞体ストレスの応答を軽減し、アポトーシス抑制効果を有する知見が得られた。一方、高濃度のヨモギはかえって小胞体ストレス応答促進に寄与し、肝細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。以上の結果から、ヨモギの投与量が適切であれば、NAFLDの治療に有用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

NAFLDは極めて注目度の高い疾患となっている一方、有効な治療法は未だに確立されていない。本研究で得られた成果はNAFLDの予防薬・治療薬としてヨモギの可能性を示し、ヒトの病態へfeed backすることによりNAFLDの薬物療法の開発に繋がることを期待される。また、NAFLDをはじめ、メタボリック症候群の予防・治療における伝統医薬の有効利用に科学的なエビデンスを提供したことは社会的な意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：The hepatocyte lipoapoptosis induced by saturated fatty acids is strongly conducive for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) development. This study aimed to explore the therapeutic potential of Artemisia princeps Pampanini (APP), a traditional Chinese medicine, on palmitic acid (PA)-induced lipoapoptosis by using a cellular NAFLD model. It was observed that treatment with the low concentrations of APP attenuated the severity of PA-induced lipoapoptosis in mouse hepatocyte cells along with the reduced production of oxidative stress and ER stress. However, the high concentrations of APP led to a marked increase in the hepatocyte lipoapoptosis, which were accompanied by a augmentation in ER stress. Overall, APP at low concentrations exerts a protective effect on hepatocytes against lipoapoptosis, whereas it could injury these cells at high concentrations.

研究分野：肝臓学、内科学

キーワード：Artemisia princeps P. NAFLD アポトーシス 酸化ストレス ERストレス 肝細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

非アルコール性脂肪性肝疾患における薬用植物ヨモギの肝保護作用に関する研究

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群は内臓脂肪蓄積を基盤とした病態である。その肝臓表現型として知られている非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は、単純性脂肪肝から重症型である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)までを含む肝臓の進行性慢性疾患である。特に NASH は肝硬変や肝臓癌の原因となるため、NASH の発症をいかに抑制するかが大きな課題となっている。NAFLD の有病率は増加傾向である。一方、有効な予防法・治療法が未だに確立されていない。これらの背景から伝統医薬の効能研究と有効利用はメタボリック症候群の予防および治療に益々重要になってきている。「東洋の代表的薬草」と呼ばれるヨモギ(*Artemisia princeps Pampanini*)は古くから多様な効能が認められている。近年、ヨモギの血中脂質低下作用や糖代謝促進作用、抗酸化作用などの薬理効果や作用機序が現代医学的研究により解明されつつある。一方、NAFLDをはじめ、各種慢性肝疾患におけるヨモギの有効性はまだ報告されておらず、その機能解析および臨床応用の可能性の検討が待たれている。

2. 研究の目的

NAFLD の単純性脂肪肝から NASH への病態進展の主要な原因は脂質の異常蓄積による肝細胞傷害が指摘されている。特に、体内組成が多い飽和脂肪酸は肝細胞にアポトーシスを誘導し、NAFLD の進展に寄与している可能性が示唆され、そのメカニズムの解明が進められている。そこで、我々は *in vitro* においてマウス肝癌細胞株を利用し、飽和脂肪酸の代表であるパルミチン酸の肝細胞負荷により細胞障害を引き起こすメカニズム、および肝細胞障害や脂肪蓄積における薬用植物ヨモギの効能を検討することを目的として本研究を開始した。また、*in vivo* において高脂肪食摂取により NAFLD モデルマウスを作製し、*in vitro* で得られたヨモギの効能を動物レベルで検証することを目指した。

3. 研究の方法

3-1. マウス肝癌細胞株 Hepa1-6 に飽和脂肪酸パルミチン酸(0.33mM)を20時間負荷し、またはヨモギの水抽出液(100 μ g/ml、200 μ g/ml、500 μ g/ml、1000 μ g/ml)で4時間前処置した後にパルミチン酸を負荷した。未処理 Hepa1-6 細胞は control として使用した。

細胞死様式の判定：Annexin V assay kit を用いてフローサイトメトリーにて細胞死様式について検討した。

(a) caspase 3/7 活性の測定：アポトーシスを媒介する caspase 3/7 の活性を、Caspase-Glo® 3/7 luminescence assay を用いてプレートリーダーにて測定した。

(b) 活性酸素種(ROS)の測定：処理後各細胞中の ROS の蓄積を、ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA-を用いてフローサイトメトリーにて検討した。

(c) アポトーシス関連分子発現の解析：細胞の各種遺伝子発現を real-time PCR により解析した。Bax、Bcl-2、HO-1 の蛋白質発現、ER ストレス活性化マーカーとして eIF2 α リン酸化、JNK リン酸化、CHOP 蛋白質発現を western blot により検討した。

(d) 細胞内トリグリセリド(TG)の測定：細胞内トリグリセリド(TG)蓄積を adipogenesis colorimetric/fluorometric assay kit により測定した。

3-2. 動物実験は通常食摂取マウス、高脂肪食摂取 NAFLD マウス、5%ヨモギ摂取マウス、およびヨモギ/NAFLD マウスを使用した。定期的に一部の動物を安楽死させ、血液、肝臓を摘出して生化学検査、病理学検査および分子生物学的解析を行った。これらの動物実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、北海道大学動物実験委員会に承認された動物実験計画に基づいて実施した。

4. 研究成果

4-1. パルミチン酸負荷による細胞死におけるヨモギの作用

まず、パルミチン酸負荷による細胞死様式の評価を行った。未処理の control 細胞を Annexin V-FITC、Propidium Iodide (PI) で共染色すると、Annexin V 陽性細胞、または Annexin V、PI ともに陽性の細胞はわずかであった。それに対し、パルミチン酸負荷の Hepa1-6 細胞では、Annexin V 陽性細胞、または Annexin V、PI ともに陽性の細胞が増加した。また、同処理により caspase 3/7 活性の増加が認められた。よって、パルミチン酸に誘導された肝細胞死は主にアポトーシスを介した細胞死であることが分かった。ヨモギ (100 μ g/ml、200 μ g/ml、500 μ g/ml) で前処理した後にパルミチン酸を負荷した Hepa1-6 細胞では、アポトーシスを引き起こした細胞数がヨモギ濃度依存的に減少したとともに、caspase 3/7 活性も低下した。一方、高濃度のヨモギ(1000 μ g/ml)とパルミチン酸の共処理によりアポトーシス細胞の数は顕著に増加した。これに一致して caspase 3/7 活性上昇が認められた。ヨモギ単独処理では、低濃度のヨモギ (100 μ g/ml、200 μ g/ml) は細胞のアポトーシスに寄与しなかったが、高濃度のヨモギ (500 μ g/ml、1000 μ g/ml) はパルミチン酸による細胞アポトーシスを増強することが認められた。

4-2. 肝細胞アポトーシスの誘導経路におけるヨモギの作用

肝細胞アポトーシスの制御には Bcl-2 family 蛋白質、caspase family 酵素、酸化ストレスおよび小胞体ストレスが重要な役割を果たしているため、本研究はこれらのシグナル伝達経路の主要な分子の発現変動を指標にしてヨモギのアポトーシスへの調節作用を解析した。パルミチン酸処理により Hepa1-6 細胞内の ROS 産生は誘導されたものの、強い抗酸化作用を有する HO-1 の発現量が遺伝子レベル、蛋白質レベルともに上昇した。同処理により Bcl/Bax 比の減少が確認された。また、これらの細胞では、小胞体ストレス応答マーカである IRE1 経路の JNK リン酸化、PERK 経路の eIF2 α リン酸、および CHOP 発現が増加した。低濃度のヨモギとパルミチン酸で処理した Hepa1-6 では、ヨモギ濃度依存的に HO-1 発現上昇、ROS 産生低下および Bcl/Bax 比の上昇が見られたが、CHOP 発現と JNK リン酸化の上昇、eIF2 α の脱リン酸化が確認された。一方、高濃度のヨモギとパルミチン酸で処理した細胞では、eIF2 α の脱リン酸化はさらに進行し、eIF2 α の脱リン酸化酵素 GADD34 の発現が著しく上昇した。高濃度のヨモギ単独処理の細胞でも eIF2 α の脱リン酸化が顕著に認められた。

4-3. パルミチン酸による肝細胞の脂質蓄積、炎症惹起およびヨモギ作用の検討

アポトーシスは、細胞膜が破れないため、細胞内の物質の細胞外への放出が起こらず、炎症は殆ど起こらないと報告された。本研究では、パルミチン酸による細胞炎症に関わる分子の発現変化が確認できなかったことから、パルミチン酸による細胞死は主にアポトーシスであることが証明された。ヨモギの前処理は細胞炎症反応を惹起しなかった。また、パルミチン酸負荷の肝細胞では TG 蓄積が見られた。ヨモギの前処理は脂質蓄積抑制よりむしろ増加の傾向を示したもの

の、有意差は認められなかった。よって、肝細胞アポトーシスは TG 量に依存しない可能性が考えられる。

4-4. NAFLD マウスモデルを用いた検討

NAFLD モデルマウスに比較し、ヨモギ/NAFLD マウスの体重変化は有意差が見られなかった。一方、血清 ALT 値の低下、血糖上昇の抑制が確認された。今回 *in vitro* で得られたヨモギの効果が NAFLD モデルマウスにおいてどの程度発揮するかという点については明らかにすることはできていないため、本研究期間内ではヨモギの肝保護作用の評価には至らず、検討を続けている。

以上の結果から、ヨモギは濃度依存的にパルミチン酸負荷による肝細胞の酸化ストレス、小胞体ストレスを軽減し、細胞アポトーシスを抑制する効果を持っている一方、高濃度のヨモギはかえって eIF2 α の脱リン酸化を介してアポトーシスを悪化することが示唆された。ヨモギは体内への投与量が適切であれば、NAFLD の治療に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊敏、神繁樹、五十嵐元子、津田弓子
2. 発表標題 脂肪毒性による肝細胞障害におけるヨモギの効果の検討
3. 学会等名 和漢医薬学会
4. 発表年 2023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
研究協力者	神 繁樹 (JIN Shigeki)	北海道大学・大学院医学研究院・講師 (10101)	
研究協力者	五十嵐 元子 (IGARASHI Motoko)	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所・薬用植物資源研究センター 北海道研究部・主任研究員 (84420)	
研究協力者	津田 弓子 (TSUDA Yumiko)	北海道大学・大学院医学研究院・技術職員 (10101)	

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