

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700764

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪肝炎進展に与える脂肪・コレステロールの影響とそのメカニズム解析

研究課題名（英文） Effect and mechanistic analysis of fat・cholesterol in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

北森 一哉（KITAMORI KAZUYA）

金城学院大学・生活環境学部・准教授

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。我々は非アルコール性脂肪肝炎（NASH）進展に与える脂肪・コレステロールの影響とそのメカニズムの解析を目的とした。非アルコール性脂肪肝炎モデル動物の肝障害は高脂肪・高コレステロール飼料の容量依存的に悪化し、その障害はコレステロールの存在下で増悪された。

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 effect and mechanistic analysis of fat・cholesterol in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Degree of liver failure in animal NASH model was high-fat and high-cholesterol diet-dependent manner, has deteriorated in the presence of cholesterol.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：脂肪、コレステロール、NASH

## 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）までを含む幅広い病態である。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、さまざまな動物モデルが使用されてきた。化学物質曝露モデル、メチオニンコリン欠乏食モデル、食事性モデル。これ等は、化学物質によって肝臓への脂質の蓄積や線維化が発症し、これらのメカニズム解析に貢献してきたが、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

った。また、普段の食事でメチオニンコリンの欠乏が起きにくいことや、重度な線維化が発症しないなど様々な問題も存在した。

我々が開発した、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。この動物モデルは高脂肪・コレステロール (HFC) 飼料の比較的短い期間の摂取で、NASH のほぼ全てのステージ (脂質沈着・炎症・線維化による偽小葉形成) に進展することを確認している。

## 2. 研究の目的

SHRSP5/Dmcr は、HFC 飼料の摂取で、NASH のほぼ全てのステージに進展するが、NASH 進展に脂肪とコレステロールのどの成分が主要な役割を担うのか興味を持たれる。そこで、摂取する HFC の量を段階的に変化させることにより、HFC が NASH 進展に及ぼす役割を明らかにすることと、コレステロールの添加の有無により、コレステロールが NASH 進展に及ぼす役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

全ての実験動物は specific pathogen-free 条件、室温 (23±2°C)、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飼料として使用される SP diet を使用した。高脂肪負荷飼料として、HFC diet を使用した。

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した。

### (1) HFC の量が NASH 進展に及ぼす影響

動物は雄性 SHRSP5/Dmcr 10 週齢とする。24 匹を 4 群に分ける。HFC 飼料：コントロール (SP) 飼料の比率を①100：0、②50：50、③10：90、④0：100 とする。摂餌期間は 10 週齢から 8 週間自由摂取で与えた。ペントバルビタール麻酔下で腹部大動脈より採血し、血清と肝臓を採取した。サンプルは-80°Cで保存し、血清から生化学検査を行い、肝臓から組織学的試験として、脂質の沈着、炎症、線維化の度合いを組織標本を作製して評価した。

### (2) HFC の NASH 進展に及ぼす成分の検討

動物は雄性 SHRSP5/Dmcr 10 週齢 18 匹を 3 群に分ける。①HFC の成分にコレステロールを添加した群、②コレステロールを添加しない群。③コントロール (SP) とする。摂餌期

間は 10 週齢から 8 週間自由摂取で与えた。ペントバルビタール麻酔下で腹部大動脈より採血し、血清と肝臓を採取した。サンプルは-80°Cで保存し、血清から生化学検査を行い、肝臓から組織学的試験として、脂質の沈着、炎症、線維化の度合いを組織標本を作製して評価した。

### (3) 解析

全てのデータは平均±標準偏差で示した。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

### 【主な結果】

#### (1) HFC の量が NASH 進展に及ぼす影響

##### ①体重変化

どの群も体重は週齢が増すごとに徐々に増加したが、各群間に大きな変化はみられなかった。HFC:SP=100:0 は体重が増加していなかった (図 1)。解剖前に測定した体重では、HFC 含量の高いものほど低値となり、HFC:SP=10:90 と 100:0 との間に有意差がみられた (図 2)。

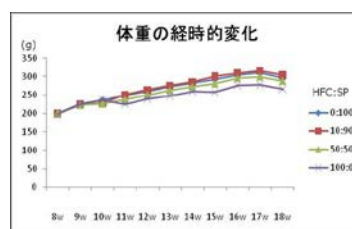


図 1

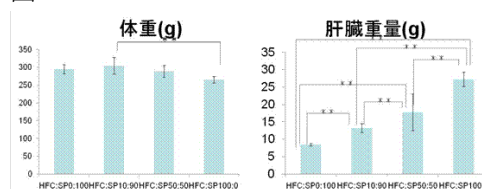


図 2

##### ②肝臓肉眼的変化

肝臓重量は、HFC 含量の増加に伴い、有意に増加した (図 2)。肉眼的所見では、HFC 含量が多い群ほど肝臓全体の白色化が進行し、肝臓の肥大がみられた。HFC:SP=100:0 では、肝臓の硬化が認められた (図 3)。



図 3 HFC: SP=10:90 0:100

### ③肝臓組織学的変化

H. E. 染色にて脂肪沈着や炎症性細胞の浸潤を観察した結果、HFC: SP=0:100では肝細胞が密で、形ははっきりとしており脂肪滴や線維化はみられなかった。HFC:SP=10:90では、肝細胞の中に小脂肪滴がみられ、炎症性細胞の浸潤もみられた。HFC:SP=50:50では、HFC:SP=10:90に比べて小脂肪滴の数が増加し、小脂肪滴が複数集まってできた大脂肪滴がみられた。それらによって、肝細胞が風船化し肥大していた。HFC:SP=100:0では、肝細胞の大部分が大脂肪滴で占められており、脱核している肝細胞が多くみられた。また、NASHのタイプ分類に使用されるマロリー体も確認できた(図4)。

アザン染色にて線維化を観察した結果、HFC: SP=0:100, 10:90では線維化はみられなかった。HFC: SP=50:50では細胞周囲と門脈周囲に線維化が確認された。HFC: SP=100:0では、HFC: SP=50:50と比べて線維化が進行していた(図5)。

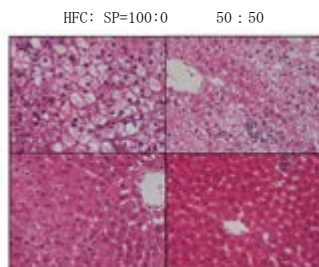


図 4 HFC: SP=10:90 0:100

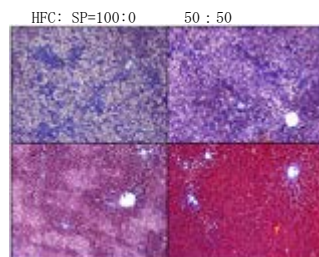


図 5 HFC: SP=10:90 0:100

### ④血清生化学検査

ASTはHFC含量の増加に伴い高値を示した。HFC: SP=100:0とHFC: SP=0:100,10:90,50:50との間に有意差がみられた。ALTはHFC含量

の増加に伴い、有意に高値を示した。 $\gamma$ -GTPはHFC: SP=0:100, 10:90, 50:50では検出限界(3.0IU/l)以下であったが、HFC: SP=100:0では有意に高値を示した。

Alb/TPはHFC含量の増加により、Alb/TPは低値を示し、HFC:SP=0:100とHFC:SP=100:0との間に有意差がみられた。

グルコースはHFC含量の増加に伴い、血清中グルコースは低値を示し有意差がみられた。

遊離脂肪酸は、各群間で有意差はみられなかった。トリグリセリドはHFC含量の増加により、有意に低値を示した。総コレステロールはHFC含量の増加に伴い、有意に高値を示した。

肝臓中MMP2の減少・TIMP1の増加はHFC: SP=100:0、HFC: SP=50:50で認められた。

### (2) HFCのNASH進展に及ぼす成分の検討

#### ①体重・血圧

解剖時体重はSP飼料群に比較し、HF飼料群・HFC飼料群は低値を示した。解剖時血圧変化はそれぞれの群に差が認められなかった。

#### ②肝臓の変化

肉眼的所見から、SP飼料群に比べHF飼料群はやや薄い色が認められた。さらに、HFC飼料群ははっきりとした白色が観察でき、表面の凹凸と硬化が確認された(図6)。

肝臓重量は、SP飼料群、HF飼料群の間に有意差は認められなかった。しかし、HFC飼料群はSP飼料群、HF飼料群に比べ有意な高値を示した。



図 6 SP HFC HF

### ③肝臓組織学的変化

HFC飼料群では肝臓への大脂肪滴の沈着が認められ、炎症性細胞の沈着が認められた。また、NASHのタイプ分類に使用されるマロリー体も確認できた。これらの変化はSP飼料群では認められなかった。HF飼料群では大脂肪滴が一部認められたが、SP飼料群に近いものであった。

線維化はHFC飼料群においてのみ顕著に認められた。

### ④血清生化学検査

血清AST値は、SP飼料群・HF飼料群に大きな変化は見られず、HFC飼料群はSP飼料

群・HF 飼料群に比べ有意な高値を示していた。血清 ALT 値は、HF 飼料群、HFC 飼料群は SP 飼料群に比較し、有意に高値を示した。

$\gamma$ -GTP は、SP 飼料群・HF 飼料群に変化は見られず、HFC 飼料群は SP 飼料群・HF 飼料群に高値を示していた。

トリグリセライドは、HFC 飼料群において、SP 飼料群に比較し有意に低値を示した。

総コレステロールは、HFC 飼料群において、SP 飼料群に比較し有意に高値を示した。

#### 【国内外における位置づけ】

これまでの研究で、SHRSP5/Dmcr の NASH モデルとしての可能性を示してきた。今回の研究で、その肝障害が高脂肪・高コレステロール飼料の容量依存的に悪化することが明らかになった。また、肝障害は高脂肪の負荷があってもコレステロールの負荷がないと軽度であることが明らかとなった。

#### 【今後の展望】

SHRSP5/Dmcr を用いたこれまでの研究で、食事性コレステロール摂取が、NASH 病態の重症化や肝臓に蓄積する脂質の「量」に関係することは明らかになった。しかし、食事性コレステロール摂取と蓄積する脂肪酸の「質」については明らかになっていない。そこで今後はコレステロール摂取が蓄積する脂肪酸の「質」に及ぼす影響を明らかにしたい。

#### 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 Moriya T, Kitamori K, Naito H, Yanagiba Y, Ito Y, Yamagishi N, Tamada H, Jia X, Tsuchikura S, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Simultaneous changes in high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis and those underlying molecular mechanisms in novel SHRSP5/Dmcr rat. *Environ Health Prev Med.* 2012 Nov;17(6):444-56. 査読有
- ② Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Yamagishi N, Wang D, Yanagiba Y, Ito Y, Wang J, Tanaka N, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. The modulation of hepatic adenosine triphosphate and inflammation by eicosapentaenoic acid during severe fibrotic progression in the SHRSP5/Dmcr rat model. *Life Sci.* 2012 Jun 14;90(23-24):934-43. 査読有

- ③ Kitamori K, Naito H, Tamada H, Kobayashi M, Miyazawa D, Yasui Y, Sonoda K, Tsuchikura S, Yasui N, Ikeda K, Moriya T, Yamori Y, Nakajima T. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. *Environ Health Prev Med.* 2012 May;17(3):173-82. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 玉田葉月、北森一哉、内藤久雄、賈小芳、Husna Yetti、那須民江. 非アルコール性脂肪性肝炎モデル動物 SHRSP5/Dmcr における脂肪の蓄積と摂取の関連. 第 83 回日本衛生学会学術総会 2013. 3. 24-26. 金沢.
- ② 滝仁志、内藤久雄、新藤守孝、北森一哉、玉田葉月、林由美、那須民江. SHRSP5/Dmcr ラットの脂肪摂取量と脂肪肝・肝炎・線維化との関連性. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 2012. 3. 24-26. 京都.
- ③ 賈小芳、内藤久雄、Husna Yetti、玉田葉月、北森一哉、林由美、王棟、柳場由絵、王軍彩、那須民江. EPAは高脂肪食による胆汁酸のグルクロン酸、硫酸抱合の低下を抑制する. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 2012. 3. 24-26. 京都.
- ④ 北森一哉、内藤久雄、土倉覚、安井菜穂美、池田克巳、家森幸男、那須民江. SHRSP5/Dmcr の非アルコール性脂肪性肝疾患モデルとしての可能性. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2011. 9. 6-7. 北海道.
- ⑤ Naito H, Jia X, Tamada H, Kitamori K, Uekusa R, Yanagiba Y, Wang D, Husna Y, Yamori Y, Nakajima T. Differential Response to High-fat and High-cholesterol Diet-induced Hepatic Fibrogenesis in SHRSP5/Dmcr and SHRSP Rats. The Nine JSH Single Topic Conference "NASH 2010". 2010. 11.18-19. Tokyo.

#### 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・准教授  
研究者番号：80387597