

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700907

研究課題名（和文） トランス脂肪酸が肝臓での発癌、抗原特異的な免疫機能に与える影響の解明

研究課題名（英文） The effect of trans fatty acids on carcinogenesis in the liver and antigen-specific adaptive immune responses

研究代表者

三宅 映己（ Miyake Teruki ）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80573659

研究成果の概要（和文）：人体への悪影響が危惧されているトランス脂肪酸の肝臓への作用は不明である。トランス脂肪酸が肝発癌に与える影響を、トランス脂肪酸高含有食でマウスを飼育し免疫学的な観点と酸化ストレスの観点から検討した。抗原特異的な免疫能の変化は、コントロール群と比較し低下していたが、他の脂肪酸高含有食でもほぼ同等であった。しかし、通常食群、他の脂肪酸高含有食群と比較し、肝内の酸化ストレスの亢進、発癌の増加が確認された。

研究成果の概要（英文）：Absolute mechanism of trans fatty acid on its negative effect to the liver is unknown. We investigated the effect of trans fatty acid on liver carcinogenesis from immunity and oxidative stress standpoint using high trans fatty acid diet fed mice. Antigen-specific immunity was decreased compared to the control diet, but did not differ among mice fed by other high fatty acid diets. However, oxidant stress and carcinogenesis of the liver was significantly increased in mice fed by high trans fatty acid diet compared to the control diet and other high fatty acid diets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：トランス脂肪酸，脂肪

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化により肥満者が増加し、糖尿病、高脂血症、脂肪肝など生活習慣病が増加している。また、一方でこれら生活習慣病の治療の基本は食事療法であり、食事量だけでなく、食事内容、成分に対する意識も高くなっている。

申請者らは、これまでに高脂肪食誘導肥満マウスを用いて、肥満状態での免疫能について研究を行ってきた。高脂肪食が原因の肥満では、抗原非特異的な免疫能の亢進がみられ

るが、ワクチンに対する抗体産生能、抗原特異的なリンパ球増殖能の低下がみられ、これらの抗原特異的な免疫異常には免疫反応の開始点で働く樹状細胞の機能低下が関与していることを証明した。また、これらの肥満マウスでは、血清中の脂肪酸分画の異常がみられ、パルミチン酸刺激が樹状細胞の機能低下の原因の一つであることを報告した。さらに、この実験過程で高脂肪食を用いて長期間飼育することにより、多くのマウスの肝臓での発癌を確認し、樹状細胞機能異常が発癌に

も関与することが示唆された。以上のことから、脂肪摂取増加に伴う肥満と免疫機能異常、発癌、易感染状態には密接な関係があることが考えられる。しかし、高脂肪食の成分、含有脂肪酸の種類に対する検討は十分ではない。

近年、食用油の製造・加工過程で生じるトランス脂肪酸が注目されている。トランス脂肪酸は、日常生活でよく食するマーガリンやスナック菓子にも含まれているが、一方で人体への影響が危惧されている。トランス脂肪酸は脂質代謝異常から動脈硬化を促進することや、乳癌の危険因子であることなどが報告されているが、その代謝産物には抗炎症作用や癌の抑制作用があることなどの報告もあり不明な点が多い。さらに、脂質の合成・代謝の中心臓器である肝臓でも、トランス脂肪酸が脂肪肝を増悪させることを報告されている。しかしながら、脂肪性肝疾患での発癌や抗原特異的な免疫能に対する影響はわかっていない。トランス脂肪酸の肝臓での発癌や抗原特異的な免疫異常に与える影響を解明することは、脂肪の加工食品を使用する国々において急務である。

## 2. 研究の目的

トランス脂肪酸が肝臓での発癌に与える影響を、免疫学的な観点と脂肪酸代謝により生じる酸化ストレスの観点から検討し、日常生活で使用するトランス脂肪酸の安全性を検証するための足がかりとする。

## 3. 研究の方法

各種脂肪酸(トランス脂肪酸, パルミチン酸, オレイン酸)の高含有高脂肪食と通常食でマウスを飼育し、血清中の炎症性サイトカインの変化、肝臓内での脂肪化の変化、酸化ストレスの変化、発癌状況、免疫学的機能変化の解析を行う。

(パルミチン酸は飽和脂肪酸、オレイン酸は不飽和脂肪酸のコントロールとして用いる。)

### (1) マウスの飼育

①トランス脂肪酸, パルミチン酸, オレイン酸高含有高脂肪食(脂肪量 60%)と通常食でマウスを飼育する。

②各群のマウスの経時的な体重変化を測定する。

### (2) 血清を用いた実験

高脂肪食開始 3 ヶ月後、12 ヶ月後に採血を行い、

①炎症性サイトカインの測定を行う。

②酸化ストレスの測定を行う。

### (3) 肝臓を用いた実験

高脂肪食開始後 3 ヶ月後、12 ヶ月後にマウスより肝臓を摘出し、

①肝臓内の脂質の定量を行う。

②各群の肝臓の組織を用いて、酸化ストレスマーカーの免疫染色を行う。

④肝臓内の発癌状況について確認する。

### (4) 免疫学的な実験

高脂肪食開始後 3 ヶ月後に

①各群の抗原特異的な液性免疫、細胞性免疫を測定するため HB ワクチンを接種する。

②HBs 抗体を測定。(液性免疫)。

③リンパ球を HBs 抗原で刺激し、リンパ球幼若化刺激試験。(細胞性免疫)

## 4. 研究成果

### (1) マウスの身体的な変化

各種脂肪酸高含有高脂肪食(トランス脂肪酸, パルミチン酸, オレイン酸)で飼育したマウスは、通常食群に比べて、食事開始 1 週間後より体重増加がみられた。(各種高脂肪食群間は、ほぼ同じ体重であった。)

### (2) 肝臓内の脂肪量の変化

各種脂肪酸高含有高脂肪食開始後 3 ヶ月で、通常食群に比べて、各高脂肪食群のマウスは有意に肝臓内の中性脂肪量の増加がみられた。さらに、各脂肪酸群で比較したところ、高トランス脂肪酸含有食群が最も肝臓内の脂肪酸の量の増加がみられた。

### (3) 免疫学的な変化

高脂肪食開始 3 ヶ月後に採取した血清中の炎症性サイトカイン濃度に、コントロール群を含め、各脂肪酸群に有意な差はなかった。また、HB ワクチンに対する抗体産生能は、コントロール群に対して、各高脂肪酸群では有意な低下がみられたが、各脂肪酸群間では有意な差はなかった。抗原特異的リンパ球幼若化能も同様であった。

### (4) 発癌

各種脂肪酸高含有食開始 12 ヶ月後の肝臓では、コントロール群に発癌は見られなかったが、各種脂肪酸高含有食では発癌がみられた。各種脂肪酸群間では、トランス脂肪酸高含有群が最も発癌率が高く、パルミチン酸高含有群、オレイン酸高含有群と続いた。

### (5) 酸化ストレスの変化

各種脂肪酸高含有食開始 12 ヶ月後の肝臓での、8-OHdG の免疫染色を用いた酸化ストレスの評価では、トランス脂肪酸高含有群が最も酸化ストレスが強く、パルミチン酸高含有

群、オレイン酸高含有群はほぼ同等であった。

(6) 今後の展望

当初予定していた、抗原特異的な免疫能に関しては、各種高脂肪酸含有食群でほとんど差が見られなかったため、さらなる解析は変更を余儀なくされた。しかし、長期間飼育後の肝臓での発癌率に差がみられ、追う発癌群では酸化ストレスの亢進が確認された。今後は、発癌に及ぼした酸化ストレスの産生亢進に関与した機序についての解析を中心に行う予定である。

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)

[雑誌論文] (計9件)

① Nonalcoholic fatty liver disease: Factors associated with its presence and onset. Miyake T, Kumagi T, Furukawa S, Tokumoto Y, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 (in press) 査読あり

② Body mass index is the most useful predictive factor for the onset of nonalcoholic fatty liver disease: a community-based retrospective longitudinal cohort study. Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Furukawa S, Koizumi M, Tokumoto Y, Ueda T, Yamamoto S, Abe M, Kitai K, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. *J Gastroenterol*. 2013 Mar;48(3):413-22. doi: 10.1007/s00535-012-0650-8. 査読あり

③ 【生活習慣と肝胆膵疾患】 非アルコール性脂肪性肝疾患に関わる生活習慣リスク因子(解説/特集). 三宅 映己, 徳本 良雄, 恩地 森一. *消化器内科*(1884-2895) 56 巻 1 号 Page99-103(2013.01). 査読なし.

④ Reply to the letter by Lai et al. regarding "Body mass index is the most useful predictive factor for the onset of nonalcoholic fatty liver disease: a community-based retrospective longitudinal study" Miyake T, Kumagi T, Furukawa S, Abe M, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. *J Gastroenterol*. 2012, 査読あり

⑤ B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. Miyake T, Abe M, Tokumoto Y, Hirooka M, Furukawa S, Kumagi T, Hamada M, Kawasaki K, Tada F, Ueda T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M.

*Hepatol Int*. 2012, 査読あり

⑥ High serum palmitic acid is associated with low antiviral effects of interferon-based therapy for hepatitis C virus. Miyake T, Hiasa Y, Hirooka M, Tokumoto Y, Watanabe T, Furukawa S, Ueda T, Yamamoto S, Kumagi T, Miyaoka H, Abe M, Matsuura B, Onji M. *Lipids*. 2012 Nov;47(11):1053-62. doi: 10.1007/s11745-012-3716-8. 査読あり

⑦ Long-term branched-chain amino acid supplementation improves glucose tolerance in patients with nonalcoholic steatohepatitis-related cirrhosis. Miyake T, Abe M, Furukawa S, Tokumoto Y, Toshimitsu K, Ueda T, Yamamoto S, Hirooka M, Kumagi T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. *Intern Med*. 2012;51(16):2151-5. 査読あり

⑧ 【最新臨床糖尿病学 下-糖尿病学の最新動向-】 糖尿病合併症・糖尿病関連疾患 糖尿病に起因、関連する疾患 NAFLD、NASH(解説/特集). 三宅 映己, 恩地 森一. *日本臨床*(0047-1852) 70 巻増刊 5 最新臨床糖尿病学(下) Page528-532(2012.07) 査読なし.

⑨ Metabolic markers and ALT cutoff level for diagnosing nonalcoholic fatty liver disease: a community-based cross-sectional study. Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Koizumi M, Furukawa S, Ueda T, Tokumoto Y, Ikeda Y, Abe M, Kitai K, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. *J Gastroenterol*. 2012 Jun;47(6):696-703. doi: 10.1007/s00535-012-0534-y. 査読あり

[学会発表] (計9件)

① 三宅 映己, 徳本 良雄, 阿部雅則. 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)発症において BMI は最も有用な予測因子である. 第99回日本消化器病学会総会. 2013年3月21-23日. 鹿児島市.

② Miyake T, Furukawa S, Abe M, Kawasaki K, Tada F, Yamamoto S, Kumagi T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. B cell activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. 9th IDF-WPR Congress and 4th AASD Meeting. (2012.11.24-27., Kyoto)

③ Miyake T, Hiasa Y, Tokumoto Y, Hirooka

M, Watanabe T, Furukawa S, Kumagi T, Abe M, Matsuura B, Onji M. High serum palmitic acid levels are associated with the low antiviral effect of interferon-based therapy in patients infected with Hepatitis C virus. The 10th JSH Single Topic Conference. (2012. 11. 21-22., Tokyo)

④Miyake T, Kumagi T, Furukawa S, Hirooka M, Koizumi M, Tokumoto Y, Yamamoto S, Abe M, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. The predictive factor for the onset of nonalcoholic fatty liver disease. 3rd Asian-Pacific Topic Conference. (2012. 11. 2-3., Tokyo)

⑤Miyake T, Abe M, Furukawa S, Hamada M, Ueda T, Yamamoto S, Niiya T, Kumagi T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. Induction of Insulin Resistance by B Cell Activating Factor (BAFF) via Alternation in Adipokine Production. American Diabetes Association's 72nd Scientific Sessions. (2012. 6. 8-12., Philadelphia, USA.)

⑥Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Koizumi M, Furukawa S, Koizumi M, Ueda T, Tokumoto Y, Ikeda Y, Abe M, Kohichiro Kitai, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. Metabolic Markers and ALT Cutoff Level for Diagnosing Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Japanese: A Community-based Cross-sectional Study. Digestive Disease Week 2012. (2012. 5. 19-21., San Diego, USA)

⑦三宅映己, 上田晃久, 山本晋, 阿部雅則, 徳本良雄, 多田藤政, 川崎敬太郎, 濱田麻穂, 古川慎哉, 日浅陽一, 松浦文三, 恩地森一. B cell activator factor (BAFF)とNAFLDの肝組織所見との関連. 第2回肥満と消化器疾患研究会. 2012年4月21日. 東京都.

⑧三宅映己, 徳本良雄, 恩地森一. 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)に関わる生活習慣リスク因子の解析. 第98回日本消化器病学会総会. 2012年4月19-21日. 東京都

⑨三宅映己, 古川慎哉, 上田晃久, 山本晋, 真柴寿枝, 宮岡弘明, 酒井武則, 中西征司, 恩地森一, 松浦文三. 耐糖能異常発症予測因子の検討 肝疾患スクリーニング検査をもとに. 日本糖尿病学会中四国地方会49回総会. 2011年11月10-11日. 徳島市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三宅 映己 (Miyake Teruki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80573659