

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 4 月 10 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790753

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスに対する漢方薬の効果

研究課題名（英文） Effects of Japanese herbal medicines on model mice of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

高橋 芳久 (TAKAHASHI YOSHIHISA)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：70334381

研究成果の概要（和文）：本研究で、我々は2種類の NASH モデルマウス（メチオニン・コリン欠乏（MCD）食負荷 db/db マウスと高脂肪（HF）食負荷 db/db マウス）に対する漢方薬の効果調べた。その結果、MCD 食負荷モデルでは小柴胡湯（TJ-9）と十全大補湯（TJ-48）に有意な NASH の抑制効果が見られ、HF 食負荷モデルでは TJ-9, TJ-48 に加えて茵陳蒿湯（TJ-135）に有意な NASH の抑制効果が見られた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined the effects of Japanese herbal medicines on two kinds of model mice of NASH (methionine- and choline-deficient (MCD) diet-fed db/db mice and high-fat (HF) diet-fed db/db mice). As a result, sho-saiko-to (TJ-9) and juzen-taiho-to (TJ-48) significantly inhibited NASH in the MCD diet model, and inchin-ko-to (TJ-135) in addition to TJ-9 and TJ-48 significantly inhibited NASH in the HF diet model.

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	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学

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) / 非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) はメタボリック症候群に関連する肝疾患であり、全世界的に非常に増加している。NAFLD の重篤な型である NASH は、肝硬変や肝細胞癌に進展する可能性をもつ進行性の疾患である。

NAFLD/NASH の病理発生として two-hit 説あるいは multiple-hit 説が唱えられており、NAFLD の発生には肝臓における脂質の沈着が必要であり、NASH の発生にはさらに酸化

的障害や炎症性サイトカインの増加、抗炎症性サイトカインの減少等が必要と考えられている。

NAFLD/NASH の病理発生を解明したり、新たな治療法を開発するためには動物モデルが有用である。NAFLD/NASH の動物モデルとしては遺伝子モデルや栄養負荷モデルがあるが、肝組織像や病態生理をヒトの NAFLD/NASH により近づけるために遺伝子と栄養負荷の両者を組み合わせたモデルがしばしば用いられている。

NAFLD の治療は現在のところライフスタイルの改善による体重減少が主体であるが、

肥満者がライフスタイルの改善を維持することはしばしば困難であるため、薬物治療の開発が望まれている。漢方薬は抗酸化作用や抗炎症作用を有することから NASH に対して有効である可能性が考えられるが、これまでに漢方薬の NAFLD/NASH に対する効果を調べた研究はごくわずかしかない。

2. 研究の目的

本研究は、4 種類の漢方薬(小柴胡湯 (TJ-9)、茵陳蒿湯 (TJ-135)、十全大補湯 (TJ-48)、桂枝茯苓丸 (TJ-25)) の NASH モデルマウスに対する効果を調べることを目的としている。NASH モデルマウスとしては、メチオニン・コリン欠乏 (methionine- and choline-deficient: MCD) 食負荷 db/db マウスと、高脂肪 (high-fat: HF) 食負荷 db/db マウスという、遺伝子と栄養負荷を組み合わせた 2 種類のモデルを用いた。

3. 研究の方法

(1) MCD 食負荷実験

① 動物実験のプロトコール

36 匹の雄 db/db マウス (9 週齢) を以下の 6 群に分けた(各群 6 匹): コントロール食群、MCD 食群、TJ-9 群、TJ-135 群、TJ-48 群、TJ-25 群。TJ-9、TJ-135、TJ-48、TJ-25 群のマウスには、それぞれ 1.5% の TJ-9、TJ-135、TJ-48、TJ-25 を添加した MCD 食を与えた。全マウスを 4 週間後に屠殺し、以下に述べる様な種々の解析を行った。

② 血清生化学的解析

マウス屠殺時に採血し、血清を分離した。血清 aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、総コレステロール (total cholesterol: T-Cho)、トリグリセリド (triglyceride: TG)、血糖値をオートアナライザーを用いて通常の方法で測定した。血清インスリン、レプチン、アディポネクチン値は市販のキットを用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。

③ 肝臓の組織学的解析

肝臓の大きな 2 葉の中心部をホルマリン固定し、通常の方法で標本化し、組織学的解析を行った。HE 染色に加えて、線維化を評価するためにシリウスレッド染色も施行した。Kleiner らの方法に準じて、肝臓の脂肪化、小葉内炎症、肝細胞の ballooning、線維化ステージを半定量的に評価した。また、NAFLD 活動性スコア (NAFLD activity score: NAS) を脂肪化、小葉内炎症、ballooning のスコアの総和として計算した。

④ 画像解析

シリウスレッド染色標本および α -平滑筋アクチン (smooth muscle actin: SMA) の免疫染色標本を用いて画像解析を行った。なお、シリウスレッド染色は線維化を評価するための染色であり、SMA の免疫染色は活性型肝星細胞 (肝線維化に関連する細胞) を評価するための染色である。個々のシリウスレッド染色および SMA 免疫染色標本において、肝小葉内のランダムに選択した 400 倍視野 3 カ所の顕微鏡写真を撮影し、陽性部分の面積率を画像解析ソフト WinROOF を用いて解析した。

⑤ リアルタイム reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

肝臓におけるサイトカインやレセプター遺伝子の mRNA の発現レベルを解析するため、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-6、peroxisome proliferators-activated protein (PPAR) α 、PPAR γ 、transforming growth factor (TGF)- β 1 の発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。

⑥ 肝臓の malondialdehyde (MDA) レベルの測定

肝臓における酸化的障害の程度を調べるため、脂質過酸化による生成物 MDA のレベルを市販のキットを用いて測定した。

(2) HF 食負荷実験

MCD 食の代わりに HF 食を用い、また屠殺時期を 6 週間後として (1) と同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) MCD 食負荷実験

① 血清生化学データ

血清 AST 値は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9 群が MCD 食群よりも有意に低かった。血清 ALT 値は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9、TJ-48 群が MCD 食群よりも有意に低かった。血清 T-Cho 値は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9 群が MCD 食群よりも有意に低かった。血清 TG 値は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に低く、TJ-135、TJ-25 群が MCD 食群よりもさらに有意に低かった。血糖値は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に低く、TJ-48 群が MCD 食群よりも有意に高かった。血清レプチン値は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-135、TJ-48、TJ-25 群が MCD 食群よりも有意に低かった。血清アディポネクチン値は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-135 群が MCD 食群よりも有意に低かった。

② 肝組織像

脂肪化の程度は、TJ-48 群が MCD 食群よりも有意に軽度であった。小葉内炎症や肝細胞の ballooning の程度は、TJ-9、TJ-48 群が MCD 食群よりも有意に軽度であった。NAS は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9、TJ-48 群が MCD 食群よりも有意に低かった。線維化のステージは、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9 群が MCD 食群よりも有意に低かった。

③ 肝臓の画像解析データ

肝小葉内における、シリウスレッド染色陽性の領域の割合（線維化の程度を反映する）は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9、TJ-135、TJ-48、TJ-25 群が MCD 食群よりも有意に低かった。SMA の免疫染色陽性の領域の割合（肝臓の線維化をもたらす、活性型肝星細胞の数を反映する）は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9、TJ-48、TJ-25 群が MCD 食群よりも有意に低かった。

④ 肝臓におけるサイトカインやレセプター分子の mRNA の発現解析

炎症性サイトカインである TNF- α の発現は、TJ-48 群が MCD 食群よりも有意に低かった。IL-6 の発現は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-135 群が MCD 食群よりも有意に低かった。PPAR α の発現は漢方薬投与により影響を受けなかったが、PPAR γ (NASH の抑制に関与すると考えられているレセプター) の発現は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に低く、TJ-9 群が MCD 食群よりも有意に高かった。TGF- β 1 (肝線維化に関連するサイトカイン) の発現は、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-48、TJ-25 群が MCD 食群よりも有意に低かった。

⑤ 肝臓における MDA のレベル

肝臓における、酸化障害のマーカーである MDA のレベルは、MCD 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-135、TJ-48、TJ-25 群が MCD 食群よりも有意に低かった。

(2) HF 食負荷実験

① 血清生化学データ

血清 ALT 値は、HF 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9、TJ-135、TJ-48 群が MCD 食群よりも有意に低かった。血清インスリン値は、TJ-9、TJ-48、TJ-25 群が HF 食群よりも有意に低かった。

② 肝組織像

小葉内炎症の程度は、HF 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9、TJ-48 群が

HF 食群よりも有意に低かった。肝細胞の ballooning の程度は、HF 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-135 群が HF 食群よりも有意に低かった。NAS は、HF 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9、TJ-48 群が HF 食群よりも有意に低かった。

③ 肝臓の画像解析データ

肝小葉内における、シリウスレッド染色陽性の領域の割合は、HF 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9 群が HF 食群よりも有意に低かった。SMA の免疫染色陽性の領域の割合は、HF 食群がコントロール食群よりも有意に高く、TJ-9、TJ-135、TJ-48 群が HF 食群よりも有意に低かった。

④ 肝臓におけるサイトカインやレセプター分子の mRNA の発現解析

一通り解析を行ったが、解釈の難しい結果であった。

⑤ 肝臓における MDA のレベル

肝臓における MDA のレベルに、各群間で有意差は見られなかった。

以上、本研究により漢方薬が NASH モデルマウスに対して有意な抑制効果を発揮することが示され、また MCD 食負荷モデルにおいては、肝臓における TNF- α 、IL-6、PPAR γ 、TGF- β 1 の発現調節や抗酸化作用が漢方薬による NASH 抑制に関与している可能性が示唆された。これまでに NAFLD の動物モデルに対する漢方薬の効果を調べた研究は 1 つしかない。その研究では、漢方薬投与により血漿 AST、ALT 値は有意な改善を示しておらず、また肝臓の組織病理学的解析や肝臓におけるサイトカインおよびレセプター分子の発現解析は行われていない。従って、本研究は(1)漢方薬が NAFLD/NASH の動物モデルの血清アミノトランスフェラーゼ値や肝組織像を有意に改善すること、(2)その機序として肝臓におけるサイトカインやレセプター遺伝子の発現調節が関与している可能性、を初めて示した研究である。漢方薬は NASH の治療薬として有望であり、臨床研究を含む今後のさらなる研究が必要である。

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 0 件)
(現在、投稿準備中)

[学会発表] (計 0 件)
(第 102 回日本病理学会総会で発表予定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 芳久 (TAKAHASHI YOSHIHISA)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：70334381

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし