

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790586

研究課題名(和文)酸化ストレスと非アルコール性脂肪肝発症の関係解明

研究課題名(英文)Relationship of oxidation stress and onset of the non-alcoholic fatty liver

研究代表者

山崎 雅之 (Yamasaki, Masayuki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60379683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：我々の以前の研究によって、日本人は軽度な肥満にもかかわらずメタボリックシンドローム、高中性脂肪血症が多いことが明らかとなった(Lancet 2004)。これは、高炭水化物食摂取による肝臓での酸化ストレスと脂肪新生(de novo lipogenesis)が原因と考えられ、脂肪肝(NAFLD)の発症にも大きく関与している。そこで、食事誘導モデルマウスを用い、高炭水化物食の影響を解析した。さらにヒト介入研究、断面研究でのサンプルを用いて、食行動や脂質代謝に関連する遺伝子多型と肥満、血中パラメーターを解析した。日本人に適したメタボリックシンドローム、脂肪肝の予防について検討した。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies indicated that there were high prevalence of metabolic syndrome and hypertriglyceridemia in Japanese, and it were considered that its high prevalence were led by high carbohydrate diet intake. It was expected that the intake of the high carbohydrate diet contributed to the onset of the non-alcohol fatty liver diseases (NAFLD), through liver oxidative stress and de novo lipogenesis, in the Japanese. In this studies, we performed the analysis of the influence on onset of NAFLD lead by the high carbohydrate diet in the diet induced model mice. In addition, we analyzed the influence on physical and blood parameters by the genetic polymorphism related to the dietary behavior and the lipid metabolism by using the samples of human intervention studies and cross sectional studies. Based on our results, we discussed about the prevention suitable for a Japanese of metabolic syndrome and NAFLD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：酸化ストレス 非アルコール性脂肪肝 肥満 栄養 NAFLD de novo lipogenesis

1. 研究開始当初の背景

(1)近年のメタボリックシンドローム、2型糖尿病の増加の食事原因として動物性脂肪の過剰摂取が強調されているが、高炭水化物食や砂糖の過剰摂取に注意が払われていない。欧米では、現在、メタボリックシンドロームや糖尿病の発症への高炭水化物食の関与についての研究が注目されつつある。Parks EJ. (Br J Nutr 2002, Review) は、ヒトでの試験、Hudgins LC.(Proc Soc Exp Biol Med 2000(Review), J Nutr Biochem 2008)は、ヒトとマウスを用いた実験により、高炭水化物が体重増加を促し、さらにVLDLトリグリセライドの血中濃度を上昇させることを報告している。さらに、ヒトとマウス両実験で、肝臓で脂質新生が亢進すること、肝臓中の中性脂肪量が増加することを報告している。しかしながら、これらの報告があるにもかかわらず、高炭水化物による肥満、代謝異常の遺伝子発現プロファイルなど分子メカニズムは解析されていない。

(2)日本で急増するメタボリックシンドロームと糖尿病の予防政策。健康日本21などの活動によっても、日本人の2型糖尿病有病者数は減少せず、1370万人(1997)から2210万人(2007)に増加している(厚生労働省糖尿病実態調査)。これに伴い、糖尿病での年間死亡者数も1万4千人(2009厚生労働省人口動態)となり、虚血性心疾患では、2008年に80万8千人の患者数が公表された(厚生労働省患者調査)。このため、医療費は現在以上に高騰することが予想され、これらの発症予防が国家的な急務となっている。厚生労働省はメタボリックシンドローム、2型糖尿病予防に高い優先度を設定しているが、メタボリックシンドロームのコア病態である内臓肥満やインスリン抵抗性の病態解明が不十分であり、有効な予防策研究についても、日本をはじめとするアジアでは遅れている。以上のような実情から、日本を含めたアジア各国では、有効な予防政策が確立されていない。

(2)日本人の肥満の増加には高炭水化物食が影響している。

今までの我々の研究によって、近似した遺伝的背景をもつ日本、韓国、モンゴルで、炭水化物を多食する日本人や韓国人では、肥満が軽度な割にメタボリックシンドロームが多いことが明らかとなった(Lancet (2004), Eur J Clin Invest (2004), Clin Chim Acta (2005))。日本人、韓国人では肥満と糖・脂質代謝異常との関係は欧米人と異なっていることが明らかであり、高炭水化物である白米や雑穀の多食が高トリグリセライド血症等の脂質代謝異常に、さらにインスリン抵抗性、インスリン分泌不全の糖代謝異常に寄与していることを示唆した。高炭水化物食は肥満、糖・脂質代謝異常、肝臓での脂質新生

(*de novo lipogenesis*) を誘導する。

(3)高炭水化物食は肥満、糖・脂質代謝異常、肝臓での脂質新生(*de novo lipogenesis*)を誘導する。

これまでにヒトでの研究結果をもとに、マウスにて高炭水化物食投与実験を行い、肥満とともに、高血糖症、高インスリン血症、高トリグリセライド血症を発症しやすいことを確認した。さらに肝臓での糖から脂質への変換、つまり脂肪新生(*de novo lipogenesis*)により中性脂肪の蓄積が増大し、脂肪肝(NAFLD)、脂肪肝炎(NASH)を発症する可能性を示唆した(J Rural Med. 2007, Shimane J Med Sci. 2007)。このモデルマウスは、脂肪肝を併発しやすい日本人のメタボリックシンドロームに近似した病態と捉えることができる。

2. 研究の目的

我々の研究によって、日本人や韓国人では、軽度な肥満にもかかわらずメタボリックシンドロームが多いことが明らかとなった(Lancet (2004), Eur J Clin Invest (2004))。これは、高炭水化物食摂取による肝臓での脂肪新生(*de novo lipogenesis*)が原因と考えられ、脂肪肝(NAFLD)の発症にも大きく関与している。そこで、マウスで高炭水化物食による食後の遺伝子発現量の変化、さらに、すでに確立した高炭水化物食誘導メタボリックシンドローム、脂肪肝マウスを解析することで、高炭水化物食の影響を明確にする。マウスで得られた結果を基に、ヒト介入研究、断面研究での食事、遺伝子多型、血中パラメーターを解析することで、日本人に適したメタボリックシンドローム、脂肪肝の予防に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)これまでの研究で確立した高炭水化物食誘導メタボリックシンドローム発症モデルマウス、あるいは通常マウスを用い、各臓器での遺伝子発現プロファイルを解析した。

これまでの研究で確立した高炭水化物食誘導によるメタボリックシンドローム、脂肪肝発症させたモデルマウスの各臓器での遺伝子発現プロファイルを明らかにすることで、高炭水化物の長期摂取の影響を明らかにする。特に、本モデルマウスは、肝臓での脂肪新生(*de novo lipogenesis*)によって脂肪肝(NAFLD)を発症していると考えられるため、脂肪肝発症時の遺伝子発現プロファイルを解析した。

各臓器での形態学的影響、そこでの遺伝子発現プロファイルを合わせ、高炭水化物食による各臓器での分子挙動の変化を明確にし、高炭水化物食によるメタボリックシンドローム発症の分子メカニズムを検討した。

(2)当教室で行っているヒト介入試験、島

根大学疾病予知予防研究拠点で行っているヒト断面研究、コホート研究を利用し、遺伝子多型、血中パラメーター解析を行った。

(3) マウス実験で得られた結果とヒト試験での食事、遺伝子多型、血中パラメーターの結果を総合的に判断し、日本人におけるメタボリックシンドローム、脂肪肝発症の予防を検討した。

4. 研究成果

(1) 高炭水化物誘導メタボリックシンドローム、脂肪肝 (NAFLD) モデルマウスの飼育と脂肪肝発症の分子メカニズム解析

8週齢のICRマウスのオスに、高炭水化物食(主にコーンスターチ)、高脂肪食(低炭水化物食、バターを含む)、普通食を等カロリー(各群マウス1匹あたり17.45kcal/日)投与した。

体重に関して、投与14日目(2週間)までは、高炭水化物食投与群は対照食投与群に対して有意な体重の増加は認められなかったが、投与16日目以降では、有意な体重の増加を示した。最終的に投与4週間では、対照食群に対して、高炭水化物食投与群は、12%体重が多かった。肝臓重量、副睾丸白色脂肪組織重量では、高炭水化物食投与群で有意な増加が認められた。血液生化学試験では、対照食投与群に対して、高炭水化物食投与群では中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロールで有意な高値が認められた。また、HDLコレステロールでは、有意な低値が認められた。血糖値に関しては、有意差は認められなかった。肝臓の中性脂肪含量では、有意差は認められなかったものの、対照食投与群に対して、高炭水化物食投与群で、総含量、相対含量ともに明らかな高値が確認された。グリコーゲン含量では、有意差は認められなかった。

(2) 高炭水化物誘導メタボリックシンドローム、脂肪肝 (NAFLD) モデルマウスの肝臓遺伝子発現解析

肝臓での脂質生合成関連遺伝子の発現量では、脂肪酸合成酵素の中心的役割である fatty acid synthase (FAS) が高炭水化物食投与群で対照食投与群に対して、明らかな高値であった。また、脂肪酸合成の初期に働く acetyl-CoA carboxylase (ACC) は、高炭水化物食投与群が有意に高値であった。中性脂肪合成で鍵となる遺伝子である stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) は、有意に高値であった。解糖系酵素である PKF は、有意な差はなかった。コレステロール合成遺伝子である Hmgr は高炭水化物食投与群が対照食投与群に対して、有意に高値であった。これらと同時に、NADPH oxidase の主要サブユニットである gp91phox (Nox2) も有意に変化していた。このことから高炭水化物摂取による酸化

ストレスが肝臓の脂質代謝関連遺伝子に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

今回実験では、高炭水化物食も、対照食も1匹あたり17.45kcal/日投与した。同じ熱量を投与したにもかかわらず、高炭水化物食群は、投与2週間を過ぎてから、有意な体重増加を示した。副睾丸白色脂肪組織も増大しており、肥満の重篤化が亢進していると考えられた。また、肝臓においても、中性脂肪含量には明らかな差があった。これは、高炭水化物摂取後の高血糖による膵臓β細胞からのインスリンの大量放出が刺激となり、肝臓への糖の流入の増大と脂質新生の活性化が起きていると考えられた。同時に高炭水化物食群は、肝臓での脂質合成遺伝子の発現量の明らかな増加が認められ、中性脂肪合成が活性化していた。さらに、肝臓での中性脂肪合成の活性化に加え、血中中性脂肪の増加から、門脈へのVLDLの放出が増加していることも考えられる。脂肪組織においても、血糖取り込み増加による中性脂肪合成の増加と門脈に放出された中性脂肪を脂肪酸の状態に取り込み、中性脂肪再合成して蓄積していると考えられた。また、遊離脂肪酸濃度の増加から、肥大した脂肪組織から門脈への遊離脂肪酸の放出も増加し、放出された遊離脂肪酸は再び肝臓で取り込まれ中性脂肪へ合成されていることが考えられた。

今回の実験から高炭水化物食摂取によって、肝臓遺伝子発現において酸化ストレスと脂質代謝異常が誘導されていること示唆されたが、NADPH oxidase等の酸化ストレス関連遺伝子と脂質代謝関連遺伝子の分子的な関連は不明であった。

(3) ヒト介入研究での肥満関連遺伝子の多型解析

炭水化物の摂取の多い日本人では、高炭水化物食が肥満の発症、肝臓での脂肪合成の亢進に関係していることを示唆してきた。肝臓での脂肪合成の亢進は、マウス実験でも示されたように、脂肪肝 (NAFLD) の発症につながっていると考えられた。そこで当教室でこれまでに行ったヒト教育介入研究DNAを抽出し、これまで食事と肥満と関連が指摘されている遺伝子の多型の関連を解析した。

本解析では、対象を2001-2007年に出雲市民を対象とした3か月間の肥満の教育介入試験参加者212人とし、肥満関連遺伝子多型 (ACE I/D, UCP1 -3826 A/G, α2B-ADR Glu12/Glu9, β3-ADR Trp64Arg, PON1 Q192R等)を解析し、各群でのフィジカルパラメーター、血液パラメーターの介入前、介入後、変化量を解析した。介入前には、ACE I/D 遺伝子型または D/D 遺伝子型をもつ集団は、I/I 遺伝子型をもつ集団と比較して、BMIが有意に高かった。その他の遺伝子多型では有意差は認めら

れず、さらにこれらの遺伝子多型の累積による相加効果も認められなかった。教育介入は、参加者全員では BMI を 0.8 ± 0.8 kg/m² 減少させた。ACE I/D 遺伝子型または D/D 遺伝子型をもつ集団は、I/I 遺伝子型をもつ集団と比較して有意に BMI の減少が認められた。この BMI 減少は、年齢・性、介入前の BMI、エネルギー出納などの交絡因子で調整後も統計学的に有意であった。以上の結果より、遺伝子・環境因子相互作用では、ACE I/D 遺伝子型または D/D 遺伝子型では I/I 遺伝子型に比較して介入前の BMI は高かったが、食事の変化により BMI をより低下させることが明らかになった。ACE I/D 遺伝子型または D/D 遺伝子型をもつ集団は、血中中性脂肪、肝機能マーカーの低下が認められたことから、脂肪肝の亢進の抑制につながっている可能性がある (Shimane journal of medical science 2012; 29:1-12, Genetic testing and molecular biomarkers 2013;17: 16-22)。

(4) ヒト断面研究での肥満、食行動関連遺伝子の多型解析

近年、Genome-wide association study (GWAS) 等の進展により、中枢神経システム (CNS) で作用し、肥満、2 型糖尿病、高血圧、脂質異常症などの心血管疾患の危険因子との関係する遺伝子多型の報告が続いている。これらの肥満関連遺伝子で中枢神経システムで作用が認められる因子は、ヒトの食行動に影響を及ぼし、肥満を発症させている可能性がある。そこで、島根大学疾病予知予防研究拠点で行っているコホート研究のベースラインデータを利用し、遺伝子多型、肥満、血中パラメーター等の解析を行った。本研究の対象者は、島根県雲南市、出雲市の住民健診者のうち、研究参加承諾者 (1452 人) とした。

白人を対象とした横断研究でカンナビノイドレセプター 1 (CNR1) 遺伝子多型が肥満と関連しているとの報告がある。しかし、日本人と白人の肥満の表現系は大きく異なっていることから、日本人における CNR1 遺伝子多型と肥満の関係を解析した。本研究の対象者は、対象者は、島根県雲南市、出雲市の住民健診者のうち、研究参加承諾者 (1452 人) とした。男性において、CNR1 4895C/T の CC 遺伝子型をもつ集団は、TT または TC 遺伝子型をもつ集団と比較して、BMI、腹囲、収縮期血圧が有意に高値であった。また、CC 遺伝子型では肥満者 (BMI ≥ 25) 割合も有意に高く、オッズ比 1.7 (95%信頼区間 1.1-2.6, $P=0.01$) であった。女性では、男性と同様の傾向が見られたものの有意差は認められなかった。以上の結果により、日本人、特に中高年男性における CNR1 4895C/T の CC 遺伝子型が肥満と高血圧に関係して

いる可能性を明らかにした (Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 2013;19:779-785)。

メラノコルチン 4 レセプター (MC4R) の遺伝子多型 (rs17782313 C/T) も、ヒトの食行動に影響を及ぼし、肥満、脂質代謝異常等を亢進させている可能が報告されている。本研究の対象者は、島根県雲南市の住民健診者のうち、研究参加承諾者 (1250 人) とした。TC+CC 遺伝子型をもつ集団が、TT 遺伝子をもつグループと比較して、BMI、hCRP、HbA1c、HOMA-IR (Homeostasis model assessment of insulin resistance)、さらには肝機能マーカーである AST が有意に高値であった。性・年齢調整後でも、BMI ($P=0.016$)、HbA1c ($P=0.025$) とともに有意に高値を示した。さらに、HbA1c では、性・年齢・BMI で調整後でも、有意に高値を示した ($P=0.002$)。重回帰分析でも、MC4R rs17782313(C/T) 遺伝子多型が、性、年齢、BMI、LDL-コレステロール、HOMA-IR、HOMA- β (Homeostasis model assessment of beta cell function) とは独立して、影響を及ぼしていることが明らかとなった ($\beta=0.08; P=0.003$)。HbA1c は、直近の 1 ヶ月もしくは 2 ヶ月の血糖の変動を示すマーカーであり、血糖は炭水化物の摂取で上昇する。以上のことから、MC4R の遺伝子多型が日本人の食事、特に高炭水化物の摂取に関連している可能性が考えられた (Endocrine research, Posted online on October 23, 2013)。

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 6 件)

Yamasaki M (correspondence), Ogawa T, Wang L, Katsube T, Yamasaki Y, Sun X, Shiwaku K., Anti-obesity effects of hot water extract from Wasabi (*Wasabia japonica* Matsum.) leaves in mice fed high-fat diets. Nutrition Research and Practice, 査読有り, Vol.7, No.4, 2013, 267-272.

DOI: 10.4162/nrp.2013.7.4.267

山崎雅之 (correspondence)、塩飽邦憲、野菜に多く含まれるケルセチンの生活習慣病予防効果、島根医学 (生涯教育講座)、査読無し、第 33 巻 2 号、2013、1-7.

http://www.shimane.med.or.jp/medicine/?vol33_2

Mutombo PB, Yamasaki M (correspondence), Shiwaku K., UCP2 I/D Modulated Change in BMI During a Lifestyle Modification Intervention Study in Japanese Subjects, GENETIC TESTING

AND MOLECULAR BIOMARKERS, 査読有り, Vol. 17, No.1, 2013, 16-22.

DOI: 10.1089/gtmb.2012.0229

Mutombo PB, Yamasaki M, Nabika T, Shiwaku K., Cannabinoid Receptor 1 (CNR1) 4895 C/T Genetic Polymorphism was Associated with Obesity in Japanese Men. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 査読有り, Vol. 19, No.8, 2013, 779-785.

DOI: 10.5551/jat.12732

Mutombo PB, Yamasaki M (correspondence), Hamano T, Isomura M, Nabika T, Shiwaku K., MC4R rs17782313 gene polymorphism was associated with glycosylated hemoglobin independently of its effect on BMI in Japanese: the Shimane COHRE study, Endocrine research, 査読有り, Posted online on October 23, 2013 DOI: 10.3109/07435800.2013.844163

Yang J, Yamasaki M, Mutombo PB, Iwamoto M, Nogi A, Nabika T, Shiwaku K., Interactions Between ACE Deletion Allele and Obesity During Intervention With Lifestyle Modification in Mild Obese Japanese, Shimane journal of medical science 査読有り, Vol. 29, 2012, 1-12.

http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AA00841586/ISS0000488687_ja.html

〔学会発表〕(計 13 件)

山崎雅之、濱野強、武田美輪子、岩本麻実子、塩飽邦憲、日本人における MC4R rs17782313 (C/T) 遺伝子多型のヘモグロビン Alc への影響、第 62 回日本農村医学会学術総会、2013 年 11 月 7 日- 8 日、福島市福島グリーンパレス

Yamasaki M, Mutombo PBW, Hamano T, Nabika T, Shiwaku K., MC4R rs17782313 gene polymorphism alters glycosylated hemoglobin values independently of its effect on BMI in Japanese, The 4th International Congress on Abdominal Obesity, 2013 年 9 月 12 日-14 日, Grand Hilton Seoul, Seoul, Korea.

Yamasaki M, Mutombo PBW, Nabika T, Shiwaku K., Cannabinoid receptor 1 (CNR1) polymorphism was associated with obesity in Japanese men, The20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, 2013 年 6 月 23 日 -27 日, Seoul Convention and Exhibition Centre, Seoul, Korea.

Sun F, Yoneyama T, Hamano T, Yamasaki M, Shiwaku K, Associations of smoking behavior with social support and activity in rural elderly Japanese

men: a cross-sectional study, The20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, 2013 年 6 月 23 日 -27 日, Seoul Convention and Exhibition Centre, Seoul, Korea.

Hamano T, Kimura Y, Takeda M, Yamasaki M, Isomura M, Nabika T, Shiwaku K., Effect of Environmental and Lifestyle factors on Hypertension in an Aging Region in Japan: Shimane COHRE Study, The20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, 2013 年 6 月 23 日 -27 日, Seoul Convention and Exhibition Centre, Seoul, Korea.

Shiwaku K, Maniwa R, Yamasaki M, Iwamoto M, Yoneyama T, Intervention by milk ingestion and physical activities for the frail elderly in community, The20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, 2013 年 6 月 23 日 -27 日, Seoul Convention and Exhibition Centre, Seoul, Korea.

Yamasaki M, Yang J, Iwamoto M, Nogi A, Shiwaku K., Interactions between ace deletion allele and obesity during intervention with lifestyle modification in mild obese Japanese, The8th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition (APCCN2013), 2013 年 6 月 9 日-12 日, Tokyo Bay Maihama Hotel Club, Tokyo.

Yamasaki M, Mutombo PBW, Nabika T, Shiwaku K., Association of cannabinoid receptor1 (CNR1) 4895C/T gene variant (rs806368) with obesity in Japanese men, The8th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition (APCCN2013), 2013 年 6 月 9 日-12 日, Tokyo Bay Maihama Hotel Club, Tokyo.

山崎雅之、ムトンボ ベヤ ワ ビタディ、並河徹、塩飽邦憲、カナビノイドレセプター 1 (CNR1) 遺伝子多型は、日本人男性の肥満と関係している、第 83 回日本衛生学会総会 (若手優秀演題賞) 2013 年 3 月 24 日-26 日, 金沢 金沢大学、金沢美術工芸大学

孫旭峰, 山崎雅之, 勝部拓矢, 塩飽邦憲, 桑およびモロヘイヤ由来のポリフェノールの抗酸化作用と糖・脂質代謝に及ぼす影響, 第 83 回日本衛生学会総会 2013 年 3 月 24 日-26 日, 金沢 金沢大学、金沢美術工芸大学

山崎雅之, 馬庭瑠美, 岩本麻実子, 塩飽邦憲, 農村高齢者の栄養不足と牛乳摂取, 第 61 回日本農村医学会学術総会 [シンポジウム 食と健康] 2012 年 11 月 1 日-2 日, 島根 松江島根県民会館

山崎雅之, 濱野 強, 塩飽邦憲, メタボリ

ックシンドロームの動脈硬化予知因子としての検討, 第 71 回日本公衆衛生学会総会, 2012 年 10 月 24 日-26 日, 山口 山口市市民会館, サンプルート国際ホテル山口
Mutombo PB, Yamasaki M, Shiwaku K, Cannabinoid receptor 1 (CNR1) 4895 C/T genetic polymorphism was associated with obesity in Japanese men, 第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2012 年 7 月 19 日-20 日, 福岡 ヒルトン福岡シーホーク

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/epm/index.html>

<https://www.cohre.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 雅之 (YAMASAKI, Masayuki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60379683

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：