

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350918

研究課題名(和文) 脂肪肝における肝細胞と免疫担当細胞の相互作用解析

研究課題名(英文) The analysis of interaction between hepatocytes and immune cells in nonalcoholic fatty liver

研究代表者

山崎 聖美 (YAMAZAKI, TOMOMI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・基礎栄養研究部・室長

研究者番号：00218439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食餌誘発性肥満マウスに対する低炭水化物食摂取により肥満改善効果がみられたのは摂取開始後3週までであり、その後体重は増加に転じ、24週では高脂肪食摂取群と同程度の体重まで増加した。肝臓TG量は全期間で高脂肪食摂取群と同程度あるいはそれ以上に増加していた。脂肪肝発症から非アルコール性脂肪性肝炎へ進展するモデルマウス作製には、脂肪のみならずスクロースの投与も必要で、かつ長期投与する必要があることが明らかになった。さらに、in vitroの研究から、マクロファージ由来培養細胞と肝臓由来培養細胞がクロストークしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The ddY mice feeding high-fat diet for 8 weeks became obese. Thereafter, they were divided into 2 groups, high-fat diet fed and low-carbohydrate diet fed group. There was a significant decrease in the body weight of the low-carbohydrate diet fed mice at 3weeks. But the low-carbohydrate diet fed mice became obese as well as high-fat diet fed mice at 24weeks. Although there was a dramatic decrease in the body weight of the mice in the low-carbohydrate diet at 3 weeks, the liver TG content of the low-carbohydrate diet fed mice was equal to that in the high-fat diet fed mice at 3 and 24 weeks, indicating an increase equal to that in the high-fat diet fed mice. Not only fat but also sucrose is needed for inducing nonalcoholic statohepatitis from nonalcoholic fatty liver in mice. Moreover, it was shown that the cultured macrophages and hepatocytes interact each other in vitro.

研究分野：分子栄養学

キーワード：脂肪肝 生活習慣病

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪肝は可逆性があるがゆえに良性疾患と考えられてきたが、日本人中年男性を対象とした研究より2型糖尿病の危険因子であると報告され (Shibata M. et al., *Diabetes Care*, 30:2940-2944, 2007)、さらにインスリン抵抗性の危険因子であることも示され (Musso G. et al., *Diabetes Care*, 31:562-568, 2008)、臨床的に重要な疾患として認識されつつある。肥満者は脂肪肝を発症している場合が多いが、標準体重でも脂肪肝を発症している場合があり、その場合、将来メタボリックシンドロームを発症する可能性が高くなることが報告されている (Kim HJ, et al., *Arch Intern Med*, 164: 2169-2175, 2004)。メタボリックシンドロームは、動脈硬化を進行させ、心臓病や脳卒中といった命にかかわる病気を急速に招くことから、早期に発見して対策をたてる必要があるとされている。従って、脂肪肝発症予防、および脂肪肝改善は重要な課題である。

脂肪組織の肥大化には、脂肪細胞由来の飽和脂肪酸がマクロファージを活性化させ、活性化されたマクロファージは炎症性サイトカインとして知られる TNF- $\alpha$  を産生して脂肪細胞から遊離脂肪酸を産生させ、さらに炎症性変化を増大させ「悪循環」に陥らせてしまうことが知られている (Suganami T. et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25:2062-2068, 2005)。

肝臓にも免疫担当細胞が多く存在するため、マクロファージ系の細胞が肝臓において脂肪肝発症、炎症惹起に関与していると考えられる。

また、人の肥満改善に高脂肪・低炭水化物食が用いられる場合があり、マウスでも体重増加抑制がみられ、エネルギー消費増加によることが報告された (Kennedy AR. et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292:E1724-E1739, 2007)。このマウスの肝臓の状態については関心が集まっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、他臓器からの影響を考慮した上

で、脂肪肝発症と増悪にかかわる免疫担当細胞の作用機序についての解明を行う。

また、食事によって肥満させたマウスを用いて低炭水化物食で体重が減少するか調べ、さらに肝臓について解析を行い、脂肪肝発症予防・改善、NASH 予防のための食事の中の脂肪、炭水化物、タンパク質の組成、等についても検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 高脂肪・高スクロース食投与による NASH 発症モデルマウスの作製

ddY マウス (オス、7週齢) に、高脂肪 (60 エネルギー%) 食あるいは高脂肪・高スクロース食を投与し、毎週 1 回体重測定を行った。6ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月投与を行い、肝臓脂肪量について調べ、肝臓 mRNA 発現量、血清解析を行った。

(2) 食餌誘発性肥満マウスに対する低炭水化物食投与による肥満への影響及び解析

ddY マウス (オス、7週齢) に高脂肪食 (60 エネルギー%) を投与して肥満させた後、高脂肪食あるいは低炭水化物食 (超高脂肪食) を 3 週間投与し短期投与による肥満改善効果について調べた。体重測定、各組織重量測定、血清解析、各組織における mRNA 発現について調べた。さらに、長期投与による効果及び変化について調べるため、同様の実験を 1、3、12、24 週間行い同様に解析を行った。

(3) 共培養細胞系を用いた肝細胞とマクロファージ相互作用の解析

マクロファージ細胞として RAW264 細胞を、肝細胞としてマウス hepatocyte cell line AML12 及び Hepa 1-6 細胞を用いた。アルブミン結合脂肪酸や糖存在下、あるいは非存在下で肝細胞とマクロファージを共培養し、培地中に増加するサイトカイン、肝臓から分泌される因子について検索を行った。対照とし

て、それぞれの細胞のみ培養した場合の培地と比較した。共培養後の培地を用い、マクロファージあるいは肝細胞をその培地中で培養し、mRNA 発現変化等について調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高脂肪・高スクロース食投与による NASH 発症モデルマウスの作製と解析

ddY マウス(オス、7週齢)に、高脂肪(60 エネルギー%)・高スクロース食を投与した結果、同じ割合の脂肪を含む高脂肪食(60 エネルギー%)を投与したマウスと比べて、早期に肥満、脂肪肝を発症した。さらに、その後の増悪化も早いことが明らかになった。しかし、6ヶ月投与した時点で高脂肪・高スクロース食摂取群と高脂肪食摂取群の肝臓において線維化の程度に違いはみられず、高脂肪・高スクロース食摂取群の肝臓に非アルコール性脂肪性肝炎は観察されなかった。しかし、18ヶ月間の長期投与を行った結果、肝臓において脂肪肝の増悪化のみならず、線維化を示す分子の mRNA 増加など肝炎の症状がみられた。また、血清マーカーに関しても肝炎を発症していることが確認された。同じ割合の脂肪を含む高脂肪食(脂肪 60 エネルギー%)を投与したマウスでは、脂肪肝を発症していたものの肝炎は発症しなかった。したがって、脂肪肝発症から非アルコール性脂肪性肝炎へ進展するモデルマウス作製には、脂肪のみならずスクロースの投与も必要であることが明らかになった。

##### (2) 食餌誘発性肥満マウスに対する低炭水化物食投与による肥満への影響及び解析

ddY マウス(オス、7週齢)に高脂肪食(60 エネルギー%)を投与して肥満させた後に低炭水化物食(超高脂肪食)を投与した結果、短期投与(3週間)では肥満が改善されたが、脂肪肝は高脂肪食摂取群と同程度であり全く改善されなかった。肝臓における炎症に関

与する分子の遺伝子発現について調べた結果、高脂肪食摂取によって炎症に關与する分子の遺伝子発現は増加したが、高脂肪・低炭水化物食摂取によってこれらの増加を抑制することはなかった。長期低炭水化物食摂取による影響について調べるために、高脂肪食摂取によって肥満させた ddY マウス(雄)に、低炭水化物食を 1、3、12、24 週間摂取させ、体重、血中インスリン濃度、肝臓トリグリセリド(TG)量、肝臓コレステロール量、肝臓及び白色脂肪組織における mRNA 発現量について測定し、高脂肪食摂取を続けた場合と比較した。その結果、低炭水化物食摂取により肥満改善効果がみられたのは摂取開始後 3 週までであり、その後体重は増加に転じ、24 週では高脂肪食摂取群と同程度の体重まで増加した。血中インスリン濃度は全期間を通じて高脂肪食摂取群に比べ有意に低い値を示した。一方、肝臓 TG 量は全期間で高脂肪食摂取群と同程度あるいはそれ以上に増加していた。肝臓コレステロール量は両群の間で差はみられなかった。肝臓 mRNA 発現について解析を行った結果、高脂肪食摂取による脂肪肝発症で増加することが知られている転写因子 PPARgamma の発現量が、高脂肪食摂取群・低炭水化物食摂取群ともに同程度であった。一方、de novo 脂肪酸合成を司る転写因子 SREBP-1c 及びその標的遺伝子の発現は低炭水化物食摂取群において減少がみられた。白色脂肪組織重量変化は体重変化と同様であり、長期摂取により脂肪細胞の肥大化が観察された。白色脂肪組織における mRNA 発現は、初期には低炭水化物食摂取群において炎症誘導性マクロファージの割合が増加したが、長期摂取により抗炎症性マクロファージの増加がみられた。また、初期においてのみ褐色化が観察された。また、同時に膵臓からのインスリン分泌に変化がみられることが明らかになった。

(3) 共培養細胞系を用いた肝細胞とマクロファージ相互作用の解析

マウスマクロファージ由来培養細胞とマウス肝臓由来培養細胞との共培養において、アルブミン結合脂肪酸の添加により、IL-1b や IL-6 といったサイトカイン遺伝子の mRNA 発現量がマウスマクロファージ由来培養細胞において増加したが、M1 や M2 マクロファージに特徴的な遺伝子の発現量には全く変化がみられなかった。また、FGF21 等の分子の mRNA 発現量がマウス肝臓由来培養細胞において増加した。しかし、用いる肝臓由来培養細胞によっても結果が異なり、肝細胞内の何らかの因子が関与している可能性が示唆された。すなわち、マウスマクロファージ由来培養細胞とマウス肝臓由来培養細胞の共培養により、マクロファージ由来培養細胞単独あるいは肝臓由来培養細胞単独とは明らかに異なる環境が作られていることが明らかとなり、マクロファージ由来培養細胞と肝臓由来培養細胞がクロストークしている可能性が示唆された。

#### 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)

[学会発表](計 10 件)

山崎聖美. 肥満マウスに対する肥満改善における低炭水化物食の短期効果と各組織への影響. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会: 2016.5.14: 武庫川女子大学(西宮)

Tomomi Yamazaki, The Effects of Weight Loss in Very-low Carbohydrate and Low-fat Isoenergetic Diets in Diet-induced Obese Mice  
The XIII International Congress on Obesity, 2016.5.1-2, Vancouver, Canada

山崎聖美. 肥満改善のための食事療法の肥満マウスへの影響の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会: 2015.12.2: 神戸ポートアイランド

山崎聖美. 肥満マウスに対する肥満改善における食事療法の各組織への影響.  
第 36 回日本肥満学会: 2015.10.3: 名古屋国際会議場

斉藤孝太、山崎聖美、桑田有. 肥満予防における食事内容と運動時間帯の違いが及ぼす効果に関する研究. 第 62 回日本栄養改善学会学術総会: 2015.9.25: 福岡国際会議場

Tomomi Yamazaki, The Nutritional Composition of the Most Effective Diet on Weight Loss in Obese Mice, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015.5.15, Yokohama

山崎 聖美. 高脂肪食摂取により肥満したマウスの肥満改善における低炭水化物食と低脂肪食の効果. 第 35 回日本肥満学会: 2014.10.25: シーガイアコンベンションセンター(宮崎)

Tomomi Yamazaki, EFFECTS OF A LOW-CARBOHYDRATE AND A LOW-FAT WEIGHT REDUCTION DIETS ON WEIGHT LOSS IN OBESE MICE, 3rd international conference on Recent Advances and Controversies in Measuring Energy Metabolism, 2014.10.11, Tokyo

Tomomi Yamazaki, Effects of a low-carbohydrate and a low-fat diet on weight loss in obese mice, 12th International Congress on Obesity, 2014.3.19-20, Kuala Lumpur, Malaysia

山崎 聖美、江崎 治. 脂肪摂取により血中トリグリセリド濃度増加を示すマウス. 第 34 回日本肥満学会: 2013.10.11: 東京国際フォーラム

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 聖美 (YAMAZAKI TOMOMI)

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養  
研究所 国立健康・栄養研究所・基礎栄養研  
究部・室長

研究者番号：00218439