

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870865

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎の食事療法の有効性とそのメカニズム

研究課題名(英文)Efficacy and mechanism of dietary intervention for nonalcoholic steatohepatitis

## 研究代表者

玉田 葉月(TAMADA, Hazuki)

金城学院大学・生活環境学部・助教

研究者番号：70581403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の発症には生活習慣が関与するとされている。我々の研究グループは、食事の摂取により線維症を伴う脂肪性肝炎を発症するモデル動物SHRSP5/Dmcrを開発した。これを用いて、NASHに対する食事介入の有効性について評価することを本研究の目的とした。NASHは重症化すると肝硬変を含む肝線維症を発症するが、線維化が観察される以前の介入は生化学的、組織学的に改善が認められた。また、線維化進展以降の介入であっても、線維化を進展させるシグナル伝達系の発現は抑制されており、食事介入の意義が示された。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is related to lifestyle, particularly dietary habit. We developed dietary-induced fibrotic steatohepatitis model SHRSP5/Dmcr. We aimed to clarify the efficacy of dietary intervention for the disease. Male SHRSP5/Dmcr were divided into control, NASH and intervention groups. The intervention groups were fed control diet as dietary intervention after high-fat and -cholesterol diet feeding before/after hepatic fibrosis appeared. The intervention before fibrosis appeared significantly improved the steatosis, and reset the increased some serum parameters. However, the intervention after fibrosis appeared was no influence the formed hepatic fibrosis contents, though it improved the increased TGF- $\beta$ 1 and  $\alpha$ -SMA expressions. Together, dietary intervention for fibrotic steatohepatitis improved steatosis, while could not show any improvement of fibrosis, though improved the signal transduction of fibrosis.

研究分野：総合領域、生活科学、食生活学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 食事療法 メタボリックシンドローム SHRSP5/Dmcr

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) は、単純性脂肪肝から肝線維症までを幅広く含む疾患概念である。また、これは肝硬変や肝臓などに進展する可能性のある進行性の疾患であることも報告されている。この疾患は、肥満や2型糖尿病が重要な危険因子 (発症に必須ではない) であり、メタボリックシンドロームの肝における表現型であるということから、本邦においても有病率の増加が懸念されている。

これまでにこの疾患に関するいくつかのモデル動物が報告されている。食餌性モデル、化学物質曝露モデル、遺伝子ノックアウトモデルに大別されるが、ヒトの食習慣と整合しないことや、発症に化学物質を用いている等の欠点があった。われわれの研究グループは、高脂肪・高コレステロール (high-fat and -cholesterol: HFC) 飼料の摂取により、肝への脂肪沈着、小葉内炎症、線維化が観察されるモデルラット stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) 5/Dmcr を開発した (Kitamori. et al., 2012)。ヒトの NASH 患者は食事からのコレステロール摂取量が多いと報告されており、この SHRSP5/Dmcr はヒト患者の生活習慣をよく反映した優れたモデル動物であると考えられる。

メタボリックシンドロームとの関連から、この疾患の治療の第一選択は食事療法であるとされているが、効果とそのメカニズムに関して定量的に評価を行っている報告は少ない。現時点においては、治療方法に関して完全なコンセンサスは得られていないという状況であり、根拠に基づいた治療方法の確立が急務である。

### 2. 研究の目的

本研究では、前述のモデルラット SHRSP5/Dmcr を用いて食事介入 (特に食事による脂質コントロール) の有効性を生化学的、組織学的に評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

動物実験は金城学院大学実験動物委員会に承認され、ガイドラインに沿って実施された。

動物の飼育スケジュールを図 1 に示した。10 週齢雄の SHRSP5/Dmcr を与える飼料ごとに control 群、HFC 群、HFC/control 群の 3 群に分けた。control 群はさらに 3 つのサブグループに分けられ、それぞれ control 飼料を 2、8、14 週間与えられた (control 2w、8w、14w 群)。HFC 群も同様に、HFC 飼料を与えられる期間ごとに 3 つのサブグループに分けられた (HFC 2w、8w、14w 群)。HFC/control 群は食事介入群であり、一定期間 HFC 飼料を与えて病態を進展させた後、control 飼料に切り替えて飼育を行い、改善効果の評価する群とした。この群も同様に 3 つのサブグループに分けられ、HFC 飼料を与

える期間をそれぞれ 2、2、8 週間、その後 control 飼料に切り替えて飼育を行う期間を 6、12、6 週間とし、それぞれ HFC/control 2/6w、2/12w、8/6w 群とした。用いたモデルラット SHRSP5/Dmcr は HFC 飼料の 2 週間摂取により脂肪肝を呈するが、線維化は観察されないことが報告されている。一方、8 週間以上の摂取では肝臓に重篤な線維化を引き起こすことが報告されているため、HFC/control 2/6w および 2/12w の群では線維化が観察される前における介入、8/6w 群では線維化後における介入の効果に関して評価を行った。全てのサブグループはそれぞれ n=6 とした。飼育期間終了後、動物をペントバルビタール麻酔下 (70mg/kg) で解剖し、血液および肝臓サンプルを得た。

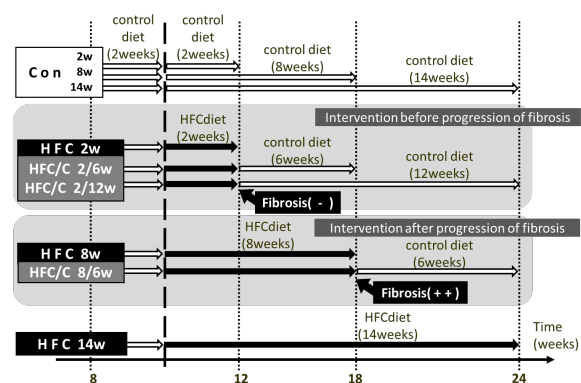


図 1 SHRSP5/Dmcr 飼育計画

Con: control group, HFC: HFC group, HFC/C: HFC/control group

### 4. 研究成果

実験の実施により、以下に記すデータを得た。

#### (1) 体重、肝重量への影響

以前の報告 (Kitamori. et al., 2012) のとおり、HFC 群では control 群と比較して、著しく体重が減少していた。しかし、その後食事介入を行った群は、control 群と同程度の体重であった。

一方、肝重量は HFC 群で増加し、顕著な肝肥大が観察されたが、食事介入により改善が認められた。しかし、線維化後の介入においては control 群と同程度までは戻らなかった。

#### (2) 血液生化学検査結果

得られた血液サンプルを用いて血液検査を行った。HFC 群では、HFC 飼料の摂取により血清総コレステロール (total-cholesterol: T-cho) 値の顕著な増加が認められた。その後の食事介入により改善が認められた。一方、血清中性脂肪 (triglyceride: TG) 値は、T-cho 値とは異なる挙動を示した。肝障害のマーカーとなる aspartate aminotransferase (AST) 値およ

び alanine aminotransferase (ALT) 値は、T-cho 値と同様に、HFC 群で顕著に増加し、食事介入群で改善した。しかし、線維化後の介入において、ALT は control 群と同程度まで回復はしなかった。

### (3) 肝脂質含量

摘出した肝組織より脂質を抽出し、定量を行った。肝中に含まれる T-cho 量は血清中と同様に HFC 群で著しく増加したが、食事介入により改善した。しかし、線維化後の介入では、control 群と同程度までは回復しなかった。肝中に含まれる TG 量はそれとは異なり、HFC 飼料の摂取により初期で顕著に増加するが、その後の病態の進展に伴い、低下する傾向にあった。増加した肝 TG 量は食事介入により低下した。

### (4) 組織標本観察による脂肪沈着への影響の評価

摘出した肝組織より、組織標本を作製して hematoxylin and eosin (HE) 染色を施し、光学顕微鏡下で観察を行った (図 2)。

以前の報告 (Kitamori, et al., 2012) のとおり、control 群では脂肪滴の沈着は認められなかった。2 週間の HFC 飼料摂取では肝組織全体に小滴性脂肪中心の脂肪滴沈着が認められた。これは、その後の食事介入によりほぼ完全に消失した。一方、8 週間の HFC 飼料摂取も肝組織への顕著な脂肪沈着を誘導し、一部で肝細胞の膨化が観察された。その後の食事介入は脂肪滴を減少させたが、大滴性脂肪様脂肪滴の出現が認められた。

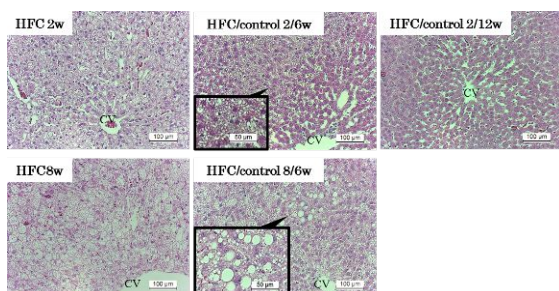


図 2 肝組織の HE 染色像 (倍率: 200 倍、拡大像: 400 倍)

CV: central vein

### (5) 脂質代謝因子発現への影響

得られた肝組織から Western blot 用のサンプルを調製し、化学発光法を用いて検出を行った (図 3)。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準として用いた。肝細胞における TG 合成の制御を行う diacylglycerol acyltransferase (DGAT) -1 および -2 の発現は HFC 群で著しく減少した。同様に、脂肪酸のβ酸化に参与する carnitine palmitoyltransferase (CPT) -1、脂肪酸合成に参与する

acetyl-CoA carboxylase (ACC) の発現も HFC 群で著しく減少した。これらの発現は HFC/control 群で改善した。すなわち、HFC 飼料の摂取により病態が進展すると、ミトコンドリアを含む肝細胞における脂質代謝に異常を来すが、食事介入によりそれらの機能が回復するということが示された。

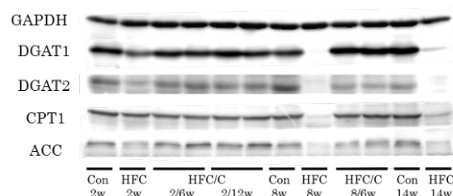


図 3 Western blot 法を用いた脂質代謝因子の発現の分析

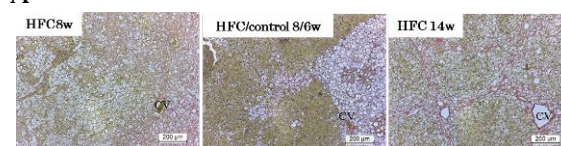
Con: control group、HFC: HFC group、HFC/C: HFC/control group

### (6) 組織標本観察による線維化所見の評価

摘出した肝組織より、組織標本を作製して elastica van gieson (EVG) 染色を施し、光学顕微鏡下で観察を行った (図 4A)。

以前の報告 (Kitamori, et al., 2012) のとおり、control 群では線維化所見は観察されなかった。2 週間の HFC 飼料の摂取でも明らかな線維化は観察されなかった。8 週間の HFC 飼料の摂取は重篤な肝線維化を誘導し、この所見は特に肝組織の辺縁部で顕著であった。14 週間の HFC 飼料の摂取ではさらに線維化が進展し、偽小葉の形成が観察された。8 週間の HFC 飼料摂取後の食事介入は沈着した線維を減少させることはなかった。しかし、HFC 飼料の摂取を継続した HFC 14w 群と比較して、線維化面積は抑制される傾向にあった (図 4B)。

### A



### B

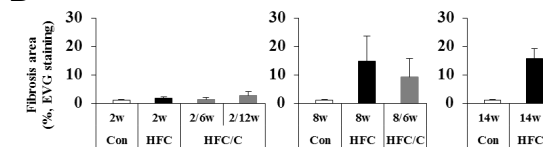


図 4 肝組織の EVG 染色像 (倍率: 100 倍) および線維化面積

CV: central vein、Con: control group、HFC: HFC group、HFC/C: HFC/control group

### (7) 線維化関連因子発現への影響

得られた肝組織から Western blot 用のサ

サンプルを調製し、化学発光法を用いて検出を行った(図5)。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内部標準として用いた。HFC 飼料の摂取は transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1、 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)の発現を著しく増加させたが、食事介入はその発現を低下させた。

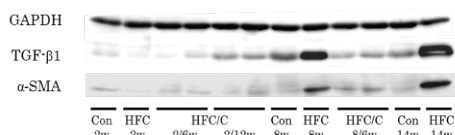


図5 Western blot法を用いた線維化関連因子の分析

Con: control group、HFC: HFC group、HFC/C: HFC/control group

#### (8) CD68 免疫染色による分析

摘出した肝組織より、組織標本を作製してCD68 免疫染色を施し、光学顕微鏡下で観察を行った(図6)。CD68はクッパー細胞のマーカーとなり、その活性化は肝における炎症と線維化進展において重要な役割を演ずるものである。HFC2w群の肝臓では、肝実質においてCD68陽性細胞が観察されたが、その後の食事介入によりそれらはほぼ消失した。HFC8w群の肝臓においても肝実質全体に多くのCD68陽性細胞が散在している様子が観察された。HFC/control 8/6w群の肝臓においてはそれらが減少したものの、残留しており、その局在は線維化部分に限られていた。

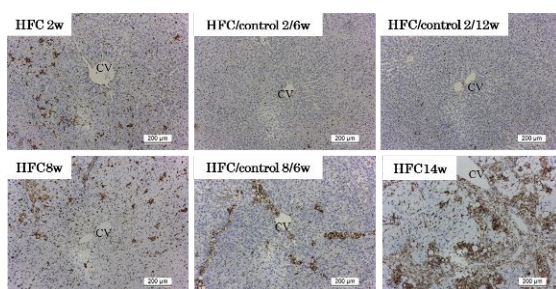


図6 肝組織のCD68免疫染色像(倍率:100倍)

CV: central vein

#### (9) まとめ

以上の結果より、HFC 飼料の摂取により惹起されたSHRSP5/Dmcrにおける線維症を伴う脂肪性肝炎は、脂質コントロールを主体とした食事介入により改善効果が認められた。特に、肝線維化が観察される以前の介入では、生化学所見、組織学所見ともにほとんどの所見がベースラインレベルにまで改善された。一方で、肝線維化進展以降の介入では、一部の所見が完全には改善せず、また、血液生化学検査値が改善されても、組織

所見においては病巣が残留していることが明らかとなった。これは、これまでに肝障害マーカーとして広く一般的に用いられている血中ASTおよびALTレベルが肝線維化の状態と必ずしも一致するわけではないという可能性を示すものであり、ヒト患者への治療においても注意するべき点であると考えられる。しかし、食事介入による肝線維化の明らかな改善が認められなくても、線維化に関わるシグナル伝達は顕著に改善しており、病態進展の抑制が期待できるということから、肝線維化以降であっても食事介入を行う意義が充分にあるということが示された。

#### 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)

〔学会発表〕(計 1件)

玉田 葉月、内藤 久雄、北森 一哉、Yetti Husna、那須 民江、非アルコール性脂肪性肝炎に対する脂質コントロール影響、第84回日本衛生学会学術総会、2014年5月25-27日、岡山コンベンションセンター

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

玉田 葉月 (TAMADA, Hazuki)  
金城学院大学・生活環境学部・助教  
研究者番号: 70581403