

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350158

研究課題名(和文) NASH発症予防における希少糖 D-アロースの投与効果および栄養療法の探索研究

研究課題名(英文) Effect of Administration of Rare Sugar D-Allose And Exploratory Research on Nutritional Therapy in NASH Onset Prevention

研究代表者

中村 強 (Nakamura, Tsuyoshi)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：30581912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： STAMマウスを用い、D-アロース及びビタミンE投与によるNASH発症予防効果の作用機序の解明を試みた。さらに、これまで投与効果を示してきたD-アロース、ビタミンE、ロイシンやイソロイシンについて、同時投与による併用効果を検討した。

作用機序の解明では、網羅的な代謝関連遺伝子解析を試みた結果、Serum Amyloid A1の遺伝子発現量が大きく変化し、D-アロース投与による影響が観察された。一方、各種栄養素の併用効果は観察されなかった。加えて、直近の結果では、STAMマウスは発症程度が安定せず、また死亡個体も散見するなど、モデル作製に問題があり、これを解決したうえで再検討すべき結論された。

研究成果の概要(英文)： By utilizing STAM mice, we tried to clarify the action mechanism of NASH preventive effect through the administration of D-allose and vitamin E. Also, we examined the combined effect of the simultaneous administration of D-allose, vitamin E, leucine and isoleucine, which until now have shown administration effect.

In the clarification of the action mechanism, as a result of attempting a comprehensive metabolism-related genetic analysis, the gene expression level of Serum Amyloid A1 was greatly changed, and the impact of D-allose administration was observed. On the other hand, the combined effect of various nutrients was not observed. In addition, the latest results show problems in the modeling, such as the onset degree of STAM mice not being stable and occasional appearance of dead specimens, and we have concluded that a re-examination is necessary after resolving these issues.

研究分野：栄養学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 モデル作製法 炎症状態 STAMマウス

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は常習飲酒歴とは無関係に肝組織にて壊死・炎症を伴い、脂肪肝を呈する疾患である。現在のところ、本疾患は肥満人口の増加や生活習慣の欧米化に伴って、更なる増加が想定されている。また、肝硬変や肝ガンへの進展、さらには生命予後にも大きく影響することから、近年では軽視できない重要な生活習慣病の一つとされている。

しかし、発症機序や有効な予防法・治療法が未だ明確にされず、かつ薬物療法では耐糖能改善薬や肝機能改善薬などの使用が試みられているが、現状は的確な効果が見いだされていない。

これまでの科研費研究にて、STAM®マウスは新規で有用性な NASH 病態モデルであること、この STAM マウスを用いて各種栄養素の有効性を探索した結果、抗酸化物質ビタミン E (VE)、希少糖 D - アロース (DA)、分岐鎖アミノ酸のなかでもイソロイシン (Ile) とロイシン (Leu) は、いずれも NASH 発症の予防効果、すなわち脂肪肝から NASH への進展を抑制する効果を有することを示唆している。また、効果を示したいずれの栄養素は毒性の極めて小さい物質であることから、今後、「特殊機能食品」あるいは「治療薬」としての応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、継続して有用性な病態動物である STAM マウスを用い、以下の検討を行う。

a) 希少糖 D - アロース (DA) 及び日常的な摂取量における VE 投与による NASH 発症予防における投与効果および作用機序の解明。

さらには、

b) これまで投与効果が検証されている希少糖 DA、ビタミンとして VE、アミノ酸である Leu や Ile について併用投与に伴う相乗効果。

c) 加えて糖質投与の効果や腸内菌叢への影響及びモデルの評価。

以上の3点を中心として検討課題とし、研究目的とする。

3. 研究の方法

a) 希少糖 DA や VE の投与効果および作用機序の解明。

生活習慣病に特化した DNA マイクロアレイ、すなわち代謝関連遺伝子を中心に搭載したカスタムチップを用いて、NASH の発症に伴う代謝関連遺伝子の経時的変化を明らかにすること、ならびに DA 投与及び日常的な摂取量における VE 投与の NASH 発症予防に対する

効果を遺伝子レベルで評価した。

DNA マイクロアレイ (各群 n=3) での遺伝子の発現量に及ぼす影響をクラスター解析にて検討した。遺伝子検討項目は代謝および炎症関連遺伝子を中心に検討したが、やや DA で改善傾向が見える結果になっており、遺伝子発現レベルでは実際の表現型 (症状の改善傾向) と遺伝子発現への影響とが一致しないと判断された。理由として、表現型への影響するほど、遺伝子には大きな影響を与えないこと、もしくは DA 投与のみで全体的な発現変動を示す大きな遺伝子変動はなく、特定の鍵となる遺伝子がある可能性も考えられる。ただし、炎症に関わる遺伝子として、Serum Amyloid A1 (Saa1) の発現量が約3分の1にまで、Serum Amyloid A2 (Saa 2) では、コントロール群の約2分の1にまで、ともに著しく減少していた。ヒトでは炎症マーカーとして CRP-1 が定常的に測定されているが、マウス/ラットでは測定できない。今回の結果から、NASH の炎症状態は Saa の測定にて鋭敏に評価できる指標となる可能性が示唆されたことから、今後 Saa の血中濃度測定することで試験物質の抗炎症効果を評価していきたい。

b) DA、VE、Leu や Ile の併用投与による効果検討

発症予防を検討するための栄養成分として、希少糖である DA 及び食品中の抗酸化成分である VE、さらには分岐鎖アミノ酸に着目して、同時投与の効果について、生活習慣病の予防のため、日常的な摂取を考慮した投与量を設定し、効果検証を行った。

ただし、本年度から動物飼育室を変更したため、再現性のないデータが得られた。その理由に以前の飼育室の違い、すなわち飼育環境もしくは飲料水、さらにはモデル作製に使用した薬物の変更 (メーカーが異なる) の影響が考えられ、これを現在検討中である。可能性としては飲料水が異なること、使用薬物の違いが示唆されている。

加えて、DA 投与の効果の再現性を確認するとともに、有効性を示す投与量に関する検討を実施した。しかし、DA 投与群の2群とも多飲・多尿の傾向が見られ、またゲージ内の環境は劣悪で、NASI 協態は極めて重篤であった。結果として、DA 投与の効果は観察されず、DA 投与の NASH 発症抑制の効果の再現性ならびに適切な投与量も見出せなかった。明確な改善策は確定できないものの、何らかの改善策を踏まえ、今後再検討すべきと考える。さらに最近ではあるが、NASH 病態モデル (STAM マウス) の発症が安定しないとの結果が発生しており、安定的な作製方法に向けた改善、もしくは別のモデル作製法につき、再検討し、また希少糖以外の糖質の効果も踏まえ、以下の結果を得た。

c) 糖質投与の効果や腸内菌叢への影響

陽性対照としてフルクトオリゴ糖 (FOS) を投与した STAM マウス群 (FOS 群) を設定した。その結果、FOS は血漿中の GLP-1 濃度や門脈血漿中の短鎖脂肪酸濃度を高める効果が示唆され、このことから NASH の予防効果が期待された。従って、STAM マウスはこれらの指標を用いることで投与物質の有効性が評価できる可能性が見出された。

4. 研究成果

これまでの検討結果を踏まえ、その成果および NASH 病態モデルとして使用した STAM マウスの評価について考察及び結論を以下に示す。また、この考察を踏まえ、今後の課題としたい。

すなわち、腸内菌叢の改善結果も含めて FOS 投与群は幾つかの指標にて好ましい結果が得られたが、発症予防効果は見出されていない。すなわち、STAM マウス試験にて、FOS 群を設定することで興味ある指標は見出されたものの、主として検討した STAM マウスの病態モデルの再評価では、例えば直近 1, 2 年間の STAM マウス群 (コントロール群) の血清生化学検査値や肝臓中の中性脂肪含量のデータでは、過去に実施したコントロール群と同様な結果 (再現性) が得られていないこと、さらに飼育途中に死亡する個体が比較的多く散見していることなどから、NASH 発症が安定していないことが再確認された。

以上の理由から、本実験にて使用している STAM マウスは極めて基本的な部分で、作製方法に問題があったと考えている。今後は、より個体差の少ないモデルの作製法を再検討すべきであり、以下の 2 点につき、再検討すべきと判断した。モデル作製時の環境はマウスを極めて安静化した状態にて飼育すること、TSOD (Tsumura Suzuki Obese Diabetes) マウスなど、他の NASH 病態モデルを用いること、を今後の検討課題とし、特に については作製法や発症程度の検討を開始した。

なお、本研究の主題テーマ (DA の投与効果) は投与物質の影響がより明確に検出できるような、かつ安定的に発症するモデルを用いて再検討し、本演題の結論としたい。

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 1 件)

- 1) Dietary d-Allose Ameliorates Hepatic Inflammation in Mice with Non-alcoholic Steatohepatitis., R. Yamamoto, A. Iida, K. Tanikawa, H. Shiratsuchi, M. Tokuda, T. Matsui and T. Nakamura : Food Science and Technology Research, 23 (2), 319-327,

2017 (査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1) NASH 病態モデルマウス (STAM[®]マウス) の病態評価、飯田綾香、山元涼子、濱野桃子、上田京子、若松恭子、米山博之、中村 強 : 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 (北海道) 平成 26 年 5 月
- 2) 希少糖 D-アロース投与による非アルコール性脂肪肝炎の発症抑制効果、山元涼子、江頭美咲、飯田綾香、濱野桃子、米山博之、谷川 健、南 久則、徳田雅明、中村 強 : 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 (北海道) 平成 26 年 5 月
- 3) NASH 発症に及ぼす分岐鎖アミノ酸投与の効果、飯田綾香、濱野桃子、山元涼子、若松恭子、米山博之、中村 強 : 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会 (熊本) 平成 26 年 10 月
- 4) ロイシン及びイソロイシン投与による NASH 発症抑制効果、飯田綾香、濱野桃子、山元涼子、若松恭子、米山博之、中村 強 : 日本アミノ酸学会学術大会 (東京) 平成 26 年 11 月
- 5) Preventive effects of Vitamin E on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in a novel mouse model using streptozotocin and a high-fat diet.、Kinoshita Wakako, Iida Ayaka, Nakamura Mizuho, Yamamoto Ryoko, Hamano Momoko, Katagiri Yoshinori, Wakamatsu Kyoko, Komeyama Hiroyuki, Nakamura Tsuyoshi1 : 12th ACN (Yokohama)、平成 27 年 6 月
- 6) NASH 病態モデル (STAM マウス) の有用性評価、及びビタミン E 投与における NASH 発症予防効果の検討、木下和歌子、飯田綾香、濱野桃子、山元涼子、中村 強 : 日本栄養改善学会学術総会 (福岡) 平成 27 年 9 月
- 7) 非アルコール性脂肪肝炎の発症へ及ぼす新規水溶性食物繊維 (WSCA) の効果、秋山 萌、山内良子、濱野桃子、木下和歌子、小林弘司、中村敏和、島本 周、中村 強 : 日本栄養改善学会学術総会 (福岡) 平成 27 年 9 月
- 8) 非アルコール性肝障害 (NASH) と酸化ストレスとの関連、吉田康一、梅野 彩、堀江祐範、室富和俊、七里元督、都地未希、沈 穎昇、太田雅規、中村 強 : 日本酸化ストレス学会 (仙台) 平成 28 年 8 月
- 9) 自発的運動が健常マウス及び NASH 病態モデルマウスの酸化ストレスに及ぼす影響、中村 強、飯田綾香、沈 穎昇、都地未希、幸 里美、吉田佳歩、太田雅規、梅野 彩、堀江祐範、七里元督、室富和俊、吉田康一 : 日本栄養・食糧学会大会 (沖縄) 平成 29 年 5 月

〔図書〕(計 件)
なし

〔産業財産権〕
なし

出願状況(計 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 件)
なし

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

中村 強 (Nakamura Tsuyoshi)
福岡女子大学 国際文理学部 教授
研究者番号：30581912

(2) 研究分担者

飯田綾香 (Iida Ayaka)
神奈川県立保健福祉大学 保健福祉学部
助教
研究者番号：70739169

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()