

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17883

研究課題名(和文) コレステロール - 胆汁酸代謝に着目した非アルコール性脂肪肝炎の食事療法の開発

研究課題名(英文) Search for functional ingredients and foods altering cholesterol-bile acid metabolism for prevention of NASH development

研究代表者

清水 真祐子 (SHIMIZU, Mayuko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：20759021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の発症予防を目的として、生薬であるオウバクおよびその主成分のベルベリンをNASHモデルマウスに投与したところ、肝臓中のコレステロール量の低下とともにNASHの特徴的所見である脂肪変性および炎症の程度の減弱がみられた。また、NASHの進展病態である肝線維化もベルベリンの投与によって有意に抑制された。肝細胞の脂質代謝関連因子を定量したところベルベリン投与による有意な変化はみられなかったが、脂質を貪食したマクロファージの集簇像がベルベリン投与群で減ったことから、ベルベリンはマクロファージへの作用を介してNASHの炎症や線維化を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではオウバクおよびその主成分ベルベリンの摂取がNASHおよび肝線維化の程度を抑制する可能性とその作用機序の一端を示した。NASHやその進展病態である肝線維化に対する特効薬は未だ開発途上であるが、本研究の成果はNASHおよび肝線維化の食事療法や治療薬の開発の基礎的なエビデンスになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the preventive effect of Phellodendron bark (PB) and its component berberine against non-alcoholic steatohepatitis (NASH). To test this, mice were fed a high-fat and high-cholesterol (HFC) diet which was containing 5% PB or 0.06% berberine powder. Histological steatohepatitis including steatosis, lobular inflammation and fibrosis (stage 1 or 2) were seen in mice fed the HFC diet. Administration of PB and berberine attenuated steatosis and lobular inflammation with decreasing cholesterol content in the liver. Histologically, Mac-2 positive-stained multinuclear giant cells, that is macrophages, were frequently observed in the HFC-diet fed mice, but they were rarely seen in the berberine-fed mice. Liver fibrosis, which is an advanced condition of NASH, was significantly suppressed in the berberine-fed mice. It was suggested that berberine may suppress hepatic inflammation and fibrosis through its action on macrophages during NASH development.

研究分野：栄養病理学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 NASH コレステロール マクロファージ 肝線維化 肝線維化モデル動物
オウバク ベルベリン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH, non-alcoholic steatohepatitis) は、偏食や運動不足などが原因で発症する生活習慣病 (肥満、糖尿病など) を基盤として生じ、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型といわれている。単純な脂肪肝とは異なり、NASH の 5 ~ 20% は肝硬変や肝癌など致死的な病態へ進展することが知られ、2020 年には NASH が肝移植の原因疾患の第 1 位になることが予想されている。しかし、NASH の発症機序は十分に解明されておらず、したがって特效薬を含む有効な治療法も確立されていないのが現状である。研究代表者をはじめ、多くの研究者が肝臓におけるコレステロールの蓄積と NASH の発症の関連性を指摘している。その一方で、研究代表者は独自の NASH モデル動物において、より高度な組織病変 (肝線維化) を伴う NASH では、コレステロール異化産物である胆汁酸の代謝が肝臓において破綻していることを見出した (Ichimura M, et al. Hepatol Res 2015)。ヒトにおいてもその現象が確認されており (Okushin K, et al. J Gastroenterol 2016)、コレステロール / 胆汁酸の代謝促進が NASH 予防・治療の鍵となると考えられる。

2. 研究の目的

NASH の予防法の開発に貢献するため、コレステロールおよび胆汁酸代謝を改善する機能的食品成分を探索し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、コレステロール代謝改善作用を有する食品および成分の文献的探索をし、候補物質を選出した。高脂肪食投与とマウスに対して候補物質 (難消化性糖質、アミノ酸、生薬) を投与して肝臓のコレステロール蓄積量を比較検討した。候補物質 (オウバクおよびその成分ベルベリン) を高脂肪・高コレステロール食誘導 NASH 線維化モデルに投与し、その効果を検討した。

4. 研究成果

まず、コレステロール代謝改善作用を有する食品および成分の文献的探索から候補物質を選出し、生薬として知られるオウバクを C57B16 マウスに高脂肪食を投与して誘導した非アルコール性脂肪肝モデルに投与したところ、肝臓中のコレステロール量の低下が確認された。コレステロール代謝経路に対するオウバクの作用点を明らかにするため、オウバク投与群の肝臓の脂質代謝に関わる因子を網羅的に Real-time PCR で解析した結果、肝臓のコレステロール異化や排出因子が増加したなどといった結果は得られなかった。

次に生薬オウバクを構成しているベルベリンやリモニンなどのいずれの成分が肝臓脂質代謝に関与しているかを高脂肪食誘導性 NASH モデルマウスに各成分を投与して比較検討した。非投与群に比べてベルベリン投与群で肝臓コレステロール量低値、血清 ALT 低値、ならびに組織学的に肝脂肪化の改善がみられたことから、ベルベリンが肝臓の脂質代謝の改善作用を有することが示された。また、病理組織学的に病態コントロール群の肝臓では肝実質細胞の間に明るく大きな細胞がみられ、それは脂質を貪食したマクロファージの集簇像であることがわかった。その数は生薬投与群で少なく、これがオウバクやベルベリンによる肝臓のコレステロール低下作用に関連している可能性を考えた。

NASH を発症した肝臓ではマクロファージの活性化を含む慢性的な炎症によって線維化を発症することが知られている。これまでの結果から、オウバクおよびその成分がマクロファージを介して肝線維化の発症抑制にも効果を示すことが予想されたため、最後に NASH の進展病態である肝線維化に対するベルベリンの作用を検討した。本実験のため、食餌によって誘導される肝線維化モデル動物を開発した。A/J マウスに高脂肪高コレステロール食を摂取させると、肝組織学的にマクロファージが巨細胞を形成するとともに、マクロファージ周囲から線維が進展する所見がみられたことから、本モデルはマクロファージと線維化の関連を可視化しやすいモデル動物と考えられた。A/J-NASH 線維化モデルマウスにオウバクおよびベルベリンを投与した結果、ベルベリン投与群の NASH 病変および肝線維化の組織学的なグレードおよびステージは、非投与群と比較して低値を示していた (図 1)。その作用機序としてベルベリンによるマクロファージの集簇抑制が関与していることを Mac-2 抗体による免疫染色によって示した (図 1、2)。

以上より、ベルベリンは NASH における脂肪変性だけでなく重要な進展病態である線維化に対して抑制的な効果を示すことが明らかとなった。

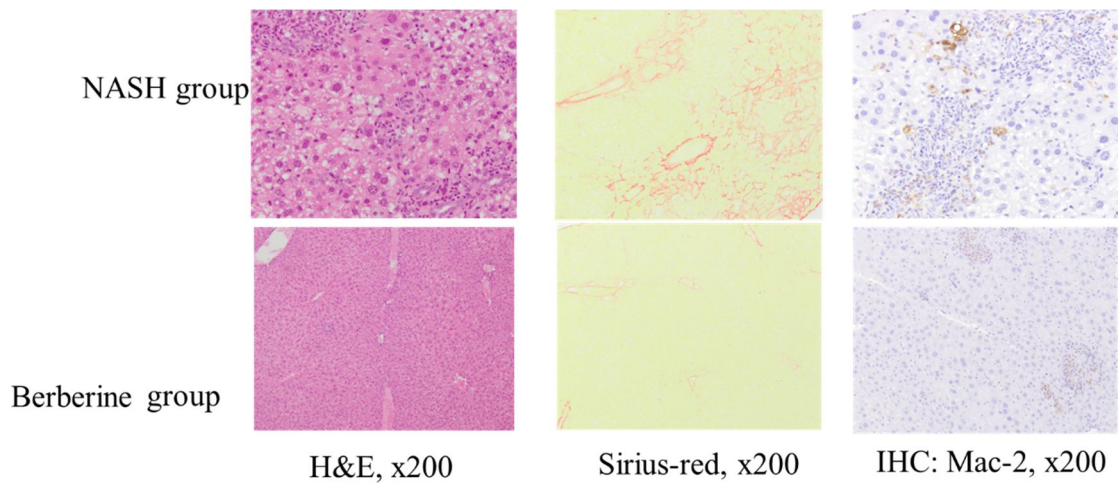


図1 高脂肪・高コレステロール食を摂取したマウス (NASH group) とベルベリン添加高脂肪・高コレステロール食を摂取したマウス (Berberine group) の肝組織像
 左: NASH group では脂肪変性および炎症細胞の浸潤がみられるが、Berberine group では脂肪変性および炎症とともに減弱された。(ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色、200 倍)
 中: NASH group ではステージ 1 ~ 2 の線維化がみられたが、Berberine group では線維化の程度は減弱された。(シリウスレッド染色、200 倍)
 右: 抗マクロファージ抗体 Mac-2 免疫染色像。NASH group では集簇したマクロファージに陽性像を示したが、Berberine group では陽性細胞数は減少した。(免疫染色 [IHC]、200 倍)

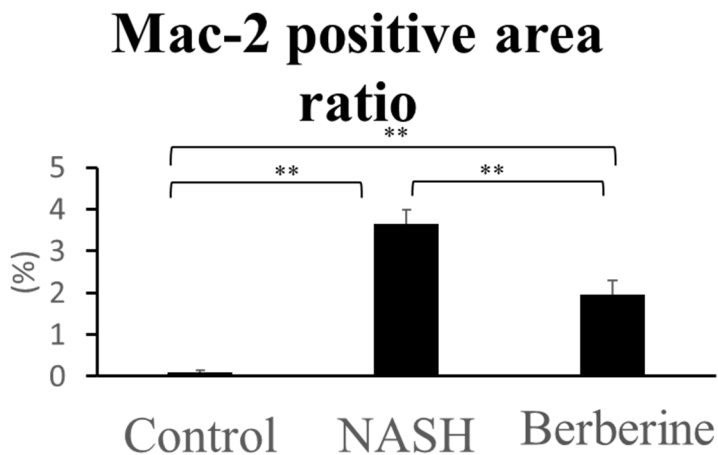


図2 抗マクロファージ抗体 Mac-2 陽性細胞面積比率
 Mac-2 陽性細胞面積比率は NASH group では Control group に比較して有意に高値を示したが、その値は NASH group に比べて Berberine group で有意に低値を示した (平均値 ± 標準誤差)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Mayuko Ichimura-Shimizu, Koichi Tsuneyama
2. 発表標題 Phellodendron bark and its component berberine prevent nonalcoholic steatohepatitis-related fibrosis in mice
3. 学会等名 APASL 2020 (The Asian Pacific Association for the Study of the Liver) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayuko Ichimura, Takeshi Oya, Koichi Tsuneyama
2. 発表標題 Fibrogenesis of nonalcoholic steatohepatitis begins around cholesterol-laden macrophage in the experimental mouse model
3. 学会等名 UEG week 2019 (UEG: United European Gastroenterology) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市村真祐子、平修、松本穰、尾矢剛志、小川博久、常山幸一
2. 発表標題 NASH線維化肝におけるpathogen lipidsの同定
3. 学会等名 徳島医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市村真祐子、尾矢剛志、小川博久、大曲勝久、常山幸一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスにおける肝線維化発症とコレステロール貪食マクロファージの関連
3. 学会等名 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayuko Ichimura, Koichi Tsuneyama
2. 発表標題 Fibrosis begins around lipid-phagocytic macrophages in high fat/cholesterol/choleate diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model
3. 学会等名 Liver meeting (AASLD:American Association for Study of Liver Diseases) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayuko Ichimura, Hirohisa Ogawa, Minoru Matsumoto, Koichi Tsuneyama
2. 発表標題 Establishment of a novel dietary-induced mouse model showing steatohepatitis with severe fibrosis
3. 学会等名 UEG week 2019 (UEG: United European Gastroenterology) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野 久実, 中川 友希江, 市村 真祐子, 辻 愛, 北岸 靖子, 松田 覚
2. 発表標題 オウバク成分は非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)改善に関与するか?,
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川 友希江, 天野 久実, 市村 真祐子, 辻 愛, 北岸 靖子, 松田 覚
2. 発表標題 脂肪性肝障害に対する少量アセトアルデヒド摂取の影響
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----