

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15950

研究課題名（和文）レジスタントスターチによる腸内環境の改善と脂肪肝抑制効果の検討

研究課題名（英文）Improvement of intestinal environment and inhibition of fatty liver by resistant starch

研究代表者

畑澤 友里（Hatazawa, Yuri）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10898745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：難消化でんぷんであるレジスタントスターチは脂肪肝を改善する効果があることが知られていたが、その詳細なメカニズムはわかっていなかった。一方で脂肪肝は多因子疾患ではあるが、その一因に腸内細菌の関係があることが示されている。本研究では、高脂肪食を用いた脂肪肝モデルマウスを用いた研究により、レジスタントスターチが腸内細菌叢を変化させ、bifidobacteriumやlactobacillusといった短鎖脂肪酸を産生する菌群がふえることにより、脂肪肝の発症を抑制することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、食物繊維に多く含まれるレジスタントスターチ（難消化性でんぷん）がbifidobacteriumやlactobacillusといった短鎖脂肪酸を産生する菌群がふえることにより、高脂肪食で生じた著しい腸内細菌叢の乱れを是正することによって脂肪肝改善につながっていることを明らかとした。肥満、脂肪肝が社会的に問題となる中、レジスタントスターチが脂肪肝抑制効果を持つことの科学的に検証されたと考えている。

研究成果の概要（英文）：Resistant starch, an indigestible starch, has been known to improve fatty liver, but the detailed mechanism of this effect was not known. On the other hand, fatty liver is a multifactorial disease, but it has been shown that intestinal bacteria are related to one of its factors. In this study, using a mouse model of fatty liver fed a high-fat diet, it was shown that resistant starch alters the intestinal microbiota and suppresses the development of fatty liver by increasing the number of short-chain fatty acid-producing bacteria such as Bifidobacterium and Lactobacillus. The results of this study are as follows

研究分野：肝臓病学

キーワード：レジスタントスターチ 脂肪肝 腸内細菌叢 短鎖脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

脂肪性肝疾患は、腸内細菌叢の乱れを含む腸内環境の恒常性破綻により、門脈を介してリポポリサッカライド等の炎症を惹起する分子が肝臓に流入することが疾患増悪に関与し、慢性肝炎（脂肪性肝炎）に進行するとされる。近年脂肪性肝炎は肝硬変肝臓の原因として急増し、その対策は急務である。

これまでの我々の高脂肪食によるマウスの脂肪性肝炎モデルを使用した予備検討において、食物繊維に多く含まれるレジスタントスターチ（難消化性でんぷん）が高脂肪食で生じた著しいdysbiosisを是正することによって体重増加の抑制、脂肪蓄積の抑制と脂肪肝の回避につながることを確認していた。腸内細菌はレジスタントスターチを分解して短鎖脂肪酸を豊富に産生し、短鎖脂肪酸は受容体であるGPR43等に認識されて宿主の代謝に影響を及ぼすとされるが、脂肪肝への影響に対してその詳細な機序はまだ十分にはわかっていなかった。本課題では短鎖脂肪酸およびそのGPR43の役割りを含め、レジスタントスターチによる脂肪肝の抑制効果を腸内細菌叢の変化の面から詳細に検討し、脂肪性肝疾患の発症・進行抑止につながる予防法開発につなぐシーズ研究とした。

2. 研究の目的

、本課題では食生活（高脂肪食）による乱れた腸内細菌叢（Dysbiosis）による脂肪肝が、レジスタントスターチが恒常性を保つ腸内細菌叢（Symbiosis）によって是正され、菌叢の活動性、機能が変化した結果改善したと仮説をたて、レジスタントスターチを含む高脂肪食を用い、脂肪肝が改善する機序を、腸内細菌叢の変化、短鎖脂肪酸およびその受容体GPR43の役割と宿主の代謝などの学術的側面から解明し、将来的な脂肪肝の発生および脂肪性肝疾患の進行抑止につながる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

雄のC57BL/6Jマウスを同体重の3群にグループ分けした。7週齢から22週齢まで各群のマウス（ $n=10$ 、1ケージあたり2匹または3匹）に、高脂肪食（HFD）、RS4を添加した高脂肪食（HFD+RS4）、または通常食（AIN93G）を与えた。RS4には、アミロース含有量が高いトモロコシ澱粉に酸処理を加えて作成したアミロファイバーSH（Jオイルミルズ社）を用いた。マウスの体重は毎週測定した。21週齢の3日間にわたり、食物摂取量および便の重量を測定した。22週齢で、体重、白色脂肪組織重量、肝臓重量を測定し、血液検査、肝臓組織、肝脂肪蓄積に関与する遺伝子の発現レベル、盲腸便検体中の短鎖脂肪酸含量、腸内細菌叢を分析した。

血液検査は、血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、総コレステロール（TC）、低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）、高密度リポタンパク質コレステロール（HDL-C）、トリグリセリド（TG）濃度を測定した。

肝組織はヘマトキシリン・エオジン（HE）染色し、脂肪細胞が存在する肝細胞の割合を評価した。また、抗PPAR γ 抗体を用いて肝組織の免疫染色も行った。

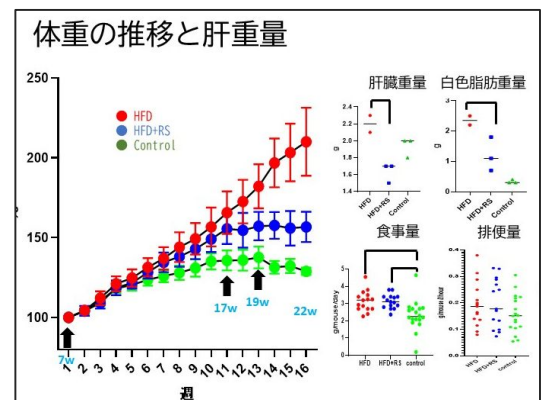
肝脂肪蓄積に関与する遺伝子の発現レベルについては、肝組織からRNAを抽出、cDNAを合成し、リアルタイムPCRにより脂肪酸合成関連遺伝子（アセチルCoAカルボキシルーゼ：ACC、脂肪酸合成酵素：FAS、ステロール調節エレメント結合タンパク質1：SREBP1）、脂肪蓄積関連遺伝子であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ （PPAR γ ）を評価した。

盲腸便中の短鎖脂肪酸（酪酸、酢酸、プロピオン酸）をガスクロマトグラフィーにより測定した。また、盲腸便から16S rRNAシーケンス解析によって腸内細菌叢を解析した。

データは平均値 $\pm$ 平均値の標準誤差（SEM）で示し、2群間の差異を評価するために一元配置分散分析に続いてTukeyの検定で評価した。 $p < 0.05$ を統計的に有意であるとみなした。

4. 研究成果

HFD群とHFD+RS4群の間で、餌の摂取量と排便量にはいずれも有意差が認められなかった。22週齢時での7週齢時に対する体重比は、HFD+RS4群（ $148.8 \pm 5.66\%$ ）ではHFD群（ $167.2 \pm 3.87\%$ ）に比べて有意に抑制された（ $p=0.0076$ ）。また、22



週齢時の肝重量もHFD+RS4群 ($1.37 \pm 0.047\text{g}$) はHFD群 ($1.62 \pm 0.053\text{g}$) より低く ($p=0.0112$)、白色脂肪組織の重量も、HFD+RS4群 ($1.06 \pm 0.11\text{g}$) はHFD群 ($1.73 \pm 0.14\text{g}$) より低かった ($p=0.0003$)。

肝組織の組織所見では、HFD群の約半数に脂肪肝を認めたが、HFD+RS4群およびコントロール群では脂肪肝は認めず、RS4が高脂肪食によるマウスの脂肪肝の発生を抑制する可能性を示した。

血液検査では、HFD + RS4 群とHFD群を比較すると、AST値に有意差は見られなかったが、ALT値 (12.0 ± 0.69 vs. 19.1 ± 2.46 IU/L, $p=0.0115$)、総コレステロール値 (99.9 ± 7.88 vs. 165.5 ± 9.45 mg/dL, $p<0.0001$)、LDL-C値 (6.5 ± 0.93 vs. 10.2 ± 0.96 mg/dL, $p<0.0001$)、HDL-C値 (58.0 ± 2.81 vs. 76.4 ± 2.15 mg/dL, $p<0.0001$)、TG値 (29.1 ± 5.27 vs. 61.0 ± 8.80 mg/dL, $p=0.0303$) は、いずれもHFD+RS4 群ではHFD群に比べて有意に低かった。

リアルタイムPCRによる肝組織を用いた脂肪蓄積に関連する遺伝子の発現レベルについては、ACC、FAS、SREBP1にはいずれも3群間に有意差は認められなかった。PPAR γ に関しては、リアルタイムPCR でHFD+RS4群とHFD群で有意差はないが、差がある傾向が見られた (0.73 ± 0.069 vs. 0.99 ± 0.087 , $p=0.1915$)。しかし免疫染色ではPPAR γ の発現は3 群間で同程度であり、HFD+RS4群とHFD群で違いは認められなかった。

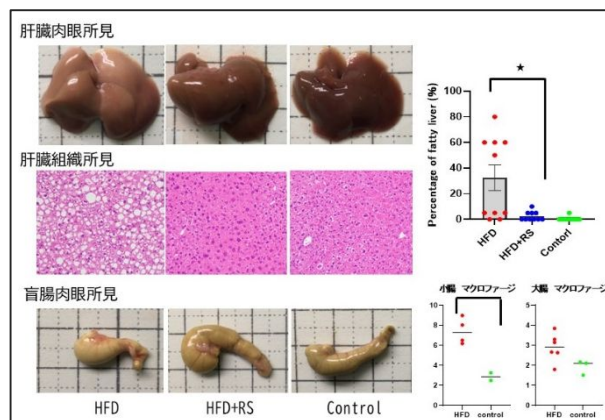
16S rRNAシーケンスによって腸内細菌叢を解析すると、 α diversity (Chao 1 index, Shannon index) に関しては3群間で有意差はなかったが、 β diversityは3群でそれぞれ異なる傾向が見られた。また、HFD+RS4 群はHFD群と比較して、短鎖脂肪酸を産生するBifidobacterium ($17.99 \pm 1.94\%$ vs. $3.59 \pm 0.69\%$, $p=0.0019$) およびLactobacillus ($14.79 \pm 3.44\%$ vs. $0.72 \pm 0.23\%$, $p=0.0045$) の割合が有意に増加していた。

盲腸便中の短鎖脂肪酸に関して、HFD+RS4群ではHFD群と比較して、酢酸 (18.83 ± 1.10 vs. 13.28 ± 1.20 $\mu\text{mol/g}$, $p=0.0027$) およびプロピオン酸 (3.50 ± 0.45 vs. 1.77 ± 0.16 $\mu\text{mol/g}$, $p=0.0159$) が有意に多かった。酪酸では、有意差は認められないもののHFD+RS4群ではHFD群と比較して、多い傾向は見られた (4.00 ± 0.60 vs. 2.98 ± 0.31 $\mu\text{mol/g}$, $p=0.5978$)。

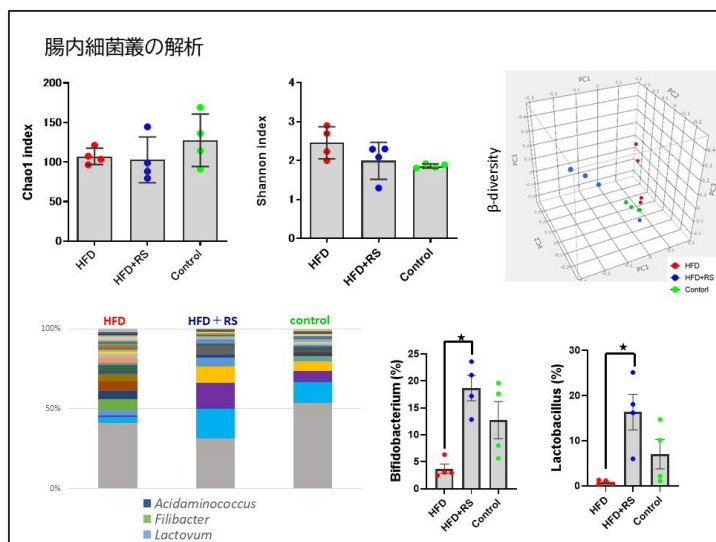
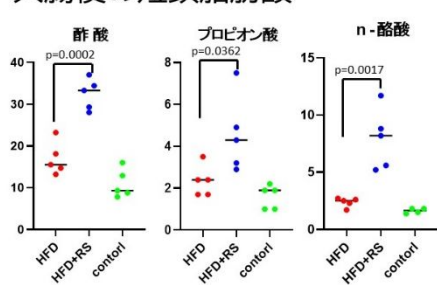
は酢酸、プロピオン酸、酪酸の増加が確認された。しかしながら GPR43 KO 群とコントロール群において体重、脂肪肝の程度、血液検査値に有意差は見られなかった。Bacteroides 菌群を投与して腸内細菌叢の変化について検討したが、Wild type と GPR43 KO マウスでは有意差は見られず、高脂肪食の投与下でも有意な違いは認められなかった。

文献

Yoshida R, Yano Y, Hoshi N, Okamoto N, Sui Y, Yamamoto A, Asaji N, Shiomi Y, Yasutomi E, Hatazawa Y, Hayashi H, Ueda Y, Kodama Y. Acid-treated high-amylose corn starch suppresses high-fat diet-induced steatosis. J Food Sci. 2022 May;87(5):2173-2184. doi: 10.1111/1750-3841.16146. Epub 2022 Apr 11.



大腸便の短鎖脂肪酸



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------