

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282017

研究課題名(和文)カロテノイドの炎症制御機構に着目した高機能型食品創出のための研究開発

研究課題名(英文) Development of novel pharmacological treatments for nonalcoholic steatohepatitis: an application of carotenoid compound

研究代表者

太田 嗣人(Ota, Tsuguhito)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・准教授

研究者番号：60397213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、異所性脂肪蓄積から生じるインスリン抵抗性や慢性炎症を病態基盤とし、肝硬変・肝がんへと進行する。本研究では、身近な食品素材で強い抗酸化作用を持つカロテノイドの-クリプトキサンチンとアスタキサンチンに着目し、NASHへの有効性と安全性を検証した。独自に開発したモデル動物に対し、-クリプトキサンチンは、肝臓のクッパー細胞やT細胞の浸潤抑制という炎症への作用を主として、アスタキサンチンは肝臓の脂質過酸化の抑制を主たる作用として、NASHを抑制した。カロテノイドは治療法の確立されていないNASHを予防・抑制する新たなNutraceuticalとして期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease. It is characterized by a wide spectrum of hepatic changes, which may progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and cirrhosis. Carotenoids are potent antioxidants and anti-inflammatory micronutrients that have been used to prevent and treat NAFLD. In addition to their antioxidative action, carotenoids can regulate macrophage polarization and thereby halt the progression of NASH. In this study, we found the novel molecular mechanisms of macrophage polarization and the function of liver macrophages/Kupffer cells in NAFLD. We propose that dietary carotenoids, such as -cryptoxanthin and astaxanthin, can be as a novel nutraceutical and be used to prevent or treat NAFLD through the regulation of macrophage polarization and liver homeostasis.

研究分野：内分泌代謝学、食生活学

キーワード：-クリプトキサンチン アスタキサンチン インスリン抵抗性 脂肪肝 NASH マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

飽食の時代と云われて久しい現代において、肥満人口や糖尿病患者の急激な増加を背景に、非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)は増加の一途をたどっている。NAFLD は単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)からなるが、両疾患の予後は大きく異なる。脂肪化に続いて炎症・線維化が生じる NASH は肝硬変・肝がんへと進展することから、NASH の治療法確立は、現代医学の重要課題である。

しかし、NASH は成因と病態が複雑であるがゆえ、薬物療法は確立されていない。近年の無作為対照比較試験(RCT)では、インスリン抵抗性改善薬等の既存の糖尿病薬は、ビタミン E に比べても NASH への有効性は乏しいという成績が発表され注目されている。一方、NASH の発症・進展には酸化ストレスが関与し、また、抗酸化剤であるビタミン E が NASH の進展抑制に一定の効果を示すことが知られている。そこで NASH を予防・抑制する生理活性物質として、強い抗酸化作用や抗炎症効果を持つ身近な食品由来のカロテノイド(脂溶性色素)中でも果物や野菜、魚介類に豊富に含まれる  $\beta$ -クリプトキサンチンとアスタキサンチンに着目した。

ヒトの血液中に存在する主なカロテノイド6種のうち、ウンシュウミカン(以下、ミカン)に多く含まれる  $\beta$ -クリプトキサンチンは、ミカンを日常的に摂取する日本人において特に血中濃度が高いカロテノイドとして知られている。ミカン産地の疫学研究(三ヶ日町研究)において、杉浦らは、 $\beta$ -クリプトキサンチンの血中濃度と酸化ストレスやインスリン抵抗性指標、さらにはメタボリック症候群や肝疾患との間に負の相関がみられること、 $\beta$ -カロテンをはじめとする他のカロテノイドと比べても、疾患リスクの低減は  $\beta$ -クリプトキサンチンが優れている可

能性を報告している。また、富山県の企業により開発されたアスタキサンチンは淡水に生息する藻や鮭・鯛の筋肉、エビ・カニ等の骨格に多く含まれる赤い色素で、強い抗酸化作用と高い体内吸収性を有し、眼疾患や皮膚疾患を中心にアンチエイジング効果や一部の生活習慣病に対する予防改善効果が知られている。

## 2. 研究の目的

身近な食品素材で体内吸収が良く、強い抗酸化作用を発揮するカロテノイド系化合物の炎症抑制作用に着目し、慢性炎症を病態基盤とするメタボリック症候群や脂肪肝の予防効果を基礎的研究とヒト臨床試験の両面から明らかにする。カロテノイドとしてウンシュウミカンに多く含まれる  $\beta$ -クリプトキサンチン、赤色魚介類に含まれるアスタキサンチンの2つのキサントフィル類カロテノイドを用い、生活習慣病に対する共通および固有の機能性を明らかにする。具体的には、(1)メタボリック症候群および脂肪肝モデル動物を用いた2種のカロテノイドの有用性評価とマクロファージの活性化を指標とした炎症抑制機構の解明、(2)ヒト介入試験によるカロテノイドの脂肪肝の予防改善効果と安全性の評価を行う。日本の伝統食材に多く含まれるカロテノイドを用いた、代謝疾患の予防と改善につながる高機能型食品の開発システムの構築を最終目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 基礎研究

$\beta$ -クリプトキサンチンによる NASH モデルへの有効性評価については、8週齢の C57BL/6J マウスを以下の4群に分類し、12週間自由摂食させた。通常食群(NCと省略)、通常食に0.003%の  $\beta$ -クリプトキサンチンを混餌した群(NC+CX)、高コレステロール高

脂肪食群 (CL と省略) (12)、高コレステロール高脂肪食に 0.003%の  $\beta$ -クリプトキサンチンを混餌した群 (CL+CX) の 4 群である。

また、アスタキサンチンによる NASH モデルへの有効性評価については、8 週齢の C57BL/6J マウスを同様に、通常食群 (NC)、通常食に 0.02%のアスタキサンチンを混餌した群 (NC+AX)、高コレステロール高脂肪食群 (CL)、高コレステロール高脂肪食に 0.02%のアスタキサンチンを混餌した群 (CL+AX) の 4 群に分類した。

2つのカロテノイドの NASH 抑制効果が、NASH の病態基盤となるインスリン抵抗性や糖脂質代謝異常の改善、肝脂肪化の抑制、または単純性脂肪肝から NASH への進展過程における炎症・線維化の抑制によるものかを各ステージ別に、肝臓の病理組織および発現遺伝子解析、血清肝機能値、アディポカイン・サイトカイン濃度、マクロファージや T 細胞等の数・極性等を検討した。

## (2) 臨床研究

NAFLD 患者に対するアスタキサンチンの有効性と安全性を無作為割付臨床試験 (RCT) によって検証する。金沢大学附属病院内外科来患者から、2 型糖尿病または耐糖能異常を有し、肝機能異常 (ALT31 以上) 及び画像検査から診断した NAFLD (NASH を含む) 患者から被験者をリクルートし、書面同意取得後、アスタキサンチン高含有カプセル剤群およびプラセボ群 (実薬及び偽薬は作成済) の各群 20 例に割付け、投与期間 6 ヶ月のランダム化プラセボ対照臨床試験を行う。投与後の肝機能 ALT 値を主要評価項目とし、血清脂質、アディポカイン、炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカー、インスリン抵抗性指標、同意取得症例では 6 月間の投与前後で肝生検を行い、Brunt の分類に従い NASH の肝病理組織像をスコア化し定量的に評価した。

## 4 . 研究成果

### (1) $\beta$ -クリプトキサンチンによる NASH の抑制

独自に開発した高コレステロール・高脂肪食による食餌性 NASH モデルに精製した  $\beta$ -クリプトキサンチンを添加したところ、NASH の脂肪化、炎症、線維化を抑制した。さらに  $\beta$ -クリプトキサンチンは NASH の炎症を改善し、肝臓のクッパー細胞 (マクロファージ) の蓄積を有意に抑制していた。また、 $\beta$ -クリプトキサンチンは Sirius Red 染色により評価した肝臓の線維化を顕著に改善した。さらに、 $\beta$ -クリプトキサンチンは糖負荷試験において、NASH 群の耐糖能異常や高インスリン血症を改善しており、NASH の背景因子である糖脂質代謝異常やインスリン抵抗を軽減し、肝臓の脂肪蓄積や脂質過酸化を抑制することを見出した (Endocrinology 156(3):987-999, 2015)。

### (2) $\beta$ -クリプトキサンチンによる炎症・免疫応答遺伝子群の発現抑制

正常肝 (普通食)、NASH 群 (高コレステロール・高脂肪食) および  $\beta$ -クリプトキサンチン摂取 NASH 群の肝臓の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ (Mouse Genome 430 2.0 array, Affymetrix 社) を用いて網羅解析し、一元分散分析を行った。 $\beta$ -クリプトキサンチン摂取により、主に細胞死や生存、細胞機能や免疫反応及びフリーラジカル消去に関わる遺伝子発現が改善していた。このうち、主に免疫細胞に関わる機能の改善が顕著であった。 $\beta$ -クリプトキサンチンは細胞死に関わる遺伝子発現を抑制して肝障害を軽減すると共に、T 細胞やマクロファージ等の免疫細胞の増加や活性化を抑制して炎症を軽減することがわかった (PLoS One 9(5):e98294, 2014)。

### (3) アスタキサンチンによる NASH の抑制 アスタキサンチンは組織学的に肝臓の脂

脂肪化のみならず炎症と線維化を抑制した。TBARSにより評価した過酸化脂質はNASHモデルの肝臓で有意に増加し、アスタキサンチンにより過酸化脂質の蓄積は減少した。さらに、肝臓のマクロファージ/Kupffer細胞を炎症抑制性のM2優位にシフトする自然免疫への作用を介してインスリン抵抗性を軽減し、NASHを予防・抑制することを明らかにした (Sci Rep 5:17192, 2015)。

臨床試験の成績は解析中であるが、アスタキサンチン投与群では、対照群に比し、肝臓の脂肪化の有意な改善がみられた。

#### 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4件)

Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, Nakanuma Y, Kaneko S, Ota T: Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. Sci Rep 5:17192, 2015  
doi: 10.1038/srep17192. [査読有]

Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T: Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. Biomolecules 5(3):1563-1579, 2015  
doi: 10.3390/biom5031563 [査読有]

Ni Y, Nagashimada M, Zhan L, Nagata N, Kobori M, Sugiura M, Ogawa K, Kaneko S, Ota T: Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid,

-cryptoxanthin. Endocrinology 156(3):987-999, 2015  
doi: 10.1210/en.2014-1776 [査読有]

Kobori M, Ni Y, Takahashi Y, Watanabe N, Sugiura M, Ogawa K, Nagashimada M, Kaneko S, Naito S, Ota T: -Cryptoxanthin alleviates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by suppressing inflammatory gene expression in mice. PLoS One 9(5):e98294, 2014  
doi: 10.1371/journal.pone.0043056 [査読有]

[学会発表](計5件)

Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Nagata N, Kaneko S, Ota T: Astaxanthin Reduces Hepatic Insulin Resistance and Inhibits The Progression of Lipotoxic Model of Nonalcoholic Steatohepatitis ACN2015 12th Asian Congress of Nutrition 2015年5月16日 神奈川

Ota T: NASH: Emerging Roles of Lipotoxicity and Astaxanthin 第104回 中华民国(台湾)消化器系総合学術年会 総会 シンポジウム7 2015年3月29日 台北 台湾

Ni Y, Nagata N, Nagashimada M, Kaneko S, Ota T: Astaxanthin reduces hepatic insulin resistance and inhibits the progression of lipotoxic model of nonalcoholic steatohepatitis 2015 Keystone Symposia Conference X8: Liver Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) 2015年3月23日 Whistler British Columbia Canada

Ota T, Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Nagata N, Kaneko S: -Cryptoxanthin Improves Hepatic Insulin Resistance

And Inflammation Through M2 Dominant Shift Of Macrophages In Diet-induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease 第74回アメリカ糖尿病学会 2014年6月16日 サンフランシスコ 米国

Ota T: The Chemokine System in Obesity-induced Insulin Resistance: a Possible Therapeutic Target? The 47th Spring Conference of the Korean Society of Lipidology & Atherosclerosis, Symposium 1-3 2014年4月18日 光州 韓国(招待講演)

〔産業財産権〕

取得状況(計2件)

名称：非アルコール性脂肪性肝炎の予防改善剤

発明者：太田嗣人、金子周一、高橋二郎

権利者：同上

種類：特許

番号：W0 2012/157290

出願年月日：平成24年5月18日

取得年月日：平成24年11月22日

国内外の別： 国外

名称：非アルコール性脂肪肝治療用組成物、非アルコール性脂肪肝の治療剤の候補物質のスクリーニング方法及びDNAチップ

発明者：小堀真珠子、杉浦実、小川一紀、太田嗣人

権利者：同上

種類：特許

番号：特開 2014-118390

出願年月日：平成24年12月17日

取得年月日：平成26年6月30日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://ota.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 嗣人 (OTA Tsuguhito)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・准教授

研究者番号：60397213

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし