

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350909

研究課題名(和文)少量飲酒やコーヒー摂取による非アルコール性脂肪性肝疾患抑制効果の検討

研究課題名(英文) Inhibitory effects of small amount of alcohol drinking and coffee ingestion on nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

高橋 芳久 (Takahashi, Yoshihisa)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：70334381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：最初の研究では、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)モデルマウスに対する、少量・中等量・多量アルコール投与の影響を調べた。その結果、少量のエタノール投与は高脂肪食負荷db/dbマウスにおいて、肝/体重比、血清AST・ALT値を有意に低下させ、肝組織における小葉内や門脈域炎症を有意に改善することが示された。次の研究では、NAFLDモデルマウスに対する、コーヒーの代表的成分投与の影響を調べた。その結果、カフェインやクロロゲン酸はCDAHFD(コリン欠乏0.1%メチオニン含有高脂肪食)負荷C57BL/6Jマウスにおいて、血清ALT値を有意に増悪させることが示された。

研究成果の概要(英文)：In the first experiment, we examined the effects of small, middle, and large amount of alcohol administration on model mice of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). As a result, small amount of ethanol administration significantly lowered liver/body weight ratio and serum AST and ALT levels, and significantly improved intalobular and portal inflammation in db/db mice that were fed a high-fat diet. In the next experiment, we examined the effects of representative ingredients of coffee on model mice of NAFLD. As a result, caffeine and chlorogenic acid significantly worsened serum ALT level in C57BL/6J mice that were fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDAHFD).

研究分野：病理学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 少量飲酒 コーヒー

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) はアルコール多飲歴 (エタノール換算で一日 20g 以上) のない人の肝臓に過剰な脂肪が蓄積する疾患であり、メタボリック症候群に関連する肝疾患とみなされている。NAFLD は、肝細胞の脂肪化のみが見られる単純性脂肪肝と、脂肪化のみならず壊死炎症反応を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) に分けられるが、NASH は肝硬変や肝細胞癌に進展しうる病変である。

近年の過剰栄養に伴う肥満の増加を反映して、NAFLD は全世界的に急速に増加しており、成人の約 20% が NAFLD を、2-3% が NASH を有していると推定されている。この様に NAFLD の社会的重要性は今日非常に増大してきており、その改善因子の発見はきわめて重要である。

過量の飲酒が肝臓に悪影響を及ぼすことは、アルコール性肝疾患としてよく知られている。従って、現状では一般的に NAFLD 患者への生活指導として禁酒が推奨されている。しかし 2008 年に少量のワイン摂取者には非飲酒者に比して NAFLD 疑い例が少ないことが報告され (Hepatology 2008; 47: 1947-54)、それ以降軽度～中等度の飲酒が NAFLD を抑制するとの報告が散見される。しかし一方で、軽度～中等度の飲酒であっても NAFLD を増悪させるとの報告もあり、少量飲酒が本当に NAFLD を抑制するかについては未だ結論が出ていない。

また、コーヒーは体に悪いと思われていた時代が長くあり、現状では一般的に NAFLD 患者に対してコーヒー摂取は特に推奨されていない。しかし、最近コーヒーの NAFLD に対する効果を調べた研究が行われ (Hepatology 2012; 55: 429-36 など) それらの研究ではコーヒーの NAFLD に対する抑制効果が報告されている。しかし、有効成分やメカニズムは未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、具体的に以下のサブテーマを設定し、少量飲酒やコーヒー摂取の NAFLD に対する抑制効果を検討した。

(1) 申請者らが開発した NAFLD モデルマウス (高脂肪食負荷 db/db マウス) に低・中・高用量のアルコールを投与し、各群における壊死炎症反応の活動性、線維化の程度を対象群と比較検討して、種々の量の飲酒の NAFLD への影響を確定した。

(2) NAFLD モデルマウス (コリン欠乏 0.1% メチオニン含有高脂肪食 choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet: CDAHFD 負荷 C57BL/6J マウス) にコーヒーに含まれる 3 種の成分 (カフェイン、クロ

ロゲン酸、カフェストール) をそれぞれ混餌投与し、各群における壊死炎症反応の活動性、線維化の程度を対象群と比較検討して、コーヒー中のどの成分が NAFLD の病態に影響するかを確定した。

すなわち、本研究の期間中に、動物モデルを用いて、少量飲酒、コーヒー成分の NAFLD に対する抑制効果の解明し、またその分子のメカニズムに迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 飲酒と NAFLD の関連についての動物モデルを用いた研究

動物実験

8 週齢、雄の db/db マウス (日本チャールズリバー、横浜) を 30 匹購入した。帝京大学中央実験動物施設で 1 週間環境に馴化させた後、以下の 5 群に分けた (各群 6 匹): コントロール食群、高脂肪食群、低エタノール群、中エタノール群、高エタノール群。コントロール食群のマウスには、コントロール液体食 (L10066) (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)、高脂肪食群には高脂肪液体食 (L10049) (Research Diets)、低エタノール群には 0.1% エタノール添加高脂肪液体食、中エタノール群には 0.5% エタノール添加高脂肪液体食、高エタノール群には 2.5% エタノール添加高脂肪液体食を自由摂食させた。各液体食は毎日交換し、摂食量を記録した。6 週間後 (15 週齢時) に断頭によりマウスを屠殺した。屠殺前にはマウスの体重を測定した。断頭時に採血し、遠心により血清を分離した。肝臓と精巣周囲脂肪織の重量を測定後、病理組織学的検討用、RNA 精製用、凍結用の肝組織を採取した。

血清生化学的検査

血清 aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、総コレステロール、トリグリセリド、グルコース値を、日立 7180 型自動分析装置 (日立ハイテクノロジー、東京) を用いて測定した。また、血清インスリン、アディポネクチン値をそれぞれ超高感度マウスインスリン測定キット (森永生科学研究所、横浜) マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬、東京) を用いて測定した。

組織学的解析

肝臓の 2 つの大きな葉の中央部を 10% ホルマリンで固定し、病理組織学的検討に供した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色の他に、肝臓の線維化を評価するためシリウス・レッド染色を施行した。

脂肪性肝炎の組織学的所見は、Kleiner らのスコアリングシステム (Hepatology 2005; 41: 1313-21) に従って半定量的に評価した。

すなわち、肝臓の脂肪化は脂肪滴を有する肝細胞のパーセンテージで評価し、以下の様に分類した：グレード 0 (<5%)、グレード 1 (5-33%)、グレード 2 (>33-66%)、グレード 3 (>66%)。小葉内炎症は以下の様に分類した：0 (炎症巣なし)、1 (200 倍視野中<2 病変)、2 (200 倍視野中 2-4 病変)、3 (200 倍視野中 >4 病変)。肝細胞の風船状腫大は以下の様に分類した：0 (なし)、1 (少数)、2 (多数あるいは顕著)。NAFLD 活動性スコア (NAFLD activity score: NAS) は、脂肪化(0-3)、小葉内炎症(0-3)、肝細胞の風船状腫大(0-2)各スコアの総計として算出した。線維化のステージは以下の様に分類した：0 (なし)、1 (類洞周囲性または門脈周囲性)、2 (類洞周囲性、門脈周囲性の両方あり)、3 (架橋状線維化)、4 (肝硬変)。類洞周囲性線維化、門脈域炎症は以下の様に分類した：0 (なし)、1 (軽度)、2 (中等度)、3 (高度)。

さらに、線維化の程度を客観的に評価するために画像解析を行った。各シリウス・レッド染色標本について、ランダムに選択された小葉内の 400 倍視野 3 か所の顕微鏡写真を撮影した。それら写真におけるシリウス・レッド陽性の領域を画像解析ソフト WinROOF (三谷商事、福井)を用いて解析した。

肝臓における 4-hydroxynonenal (4-HNE) レベル

肝臓における脂質の酸化障害を評価するために、肝臓の 4-HNE のレベルを OxiSelect HNE adduct competitive ELISA kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)を用いて測定した。

リアルタイム RT-PCR

AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Quiagen, Valencia, CA, USA)を用いて肝臓から total RNA を精製し、QuantiTect Reverse Transcription kit (Quiagen)を用いて逆転写反応を行った。Tumor necrosis factor- (TNF-), interleukin (IL)-6、peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) 、PPAR 、transforming growth factor (TGF)- 1、TATA-box binding protein (TBP)の cDNA の定量的リアルタイム PCR を、ABI 7300 real-time PCR system と Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて行った。TBP は内部コントロールとして使用した。各サンプル 3 回反応を行わせた。コントロール食群マウスの肝臓の PCR 産物を TA クローニングして得られたコントロールプラスミドを段階的に希釈してスタンダード・カーブを作成し、コピー数の絶対定量を行った。各遺伝子の mRNA 発現レベルは、TBP の mRNA 発現レベルで標準化した。

統計解析

連続性のデータに関しては、分散分析を用

いて有意差検定を行った。組織学的評価における半定量的データに関しては、Kruskal-Wallis 検定を行った。

(2) コーヒーの成分の NAFLD 動物モデルに対する抑制効果を調べる研究

6 週齢、雄の C57BL/6J マウス(日本クレア、東京)を 30 匹購入した。帝京大学中央実験動物施設で 1 週間環境に馴化させた後、以下の 5 群に分けた (各群 6 匹): コントロール食群、CDAHFD 群、カフェイン群、クロロゲン酸群、カフェストール群。コントロール食群のマウスには、コントロール食 (CRF-1) (オリエンタル酵母工業、東京)、CDAHFD 群には CDAHFD (A06071302) (Research Diets)、カフェイン群には 0.05%カフェイン添加 CDAHFD、クロロゲン酸群には 0.1%クロロゲン酸添加 CDAHFD、カフェストール群には 0.01%カフェストール添加 CDAHFD を自由摂食させた。飼料は週 3 回交換し、摂食量を記録した。7 週間後 (14 週齢時)にマウスを屠殺した。その後の実験は基本的に(1)と同様に行った。ただし、リアルタイム RT-PCR による発現解析は TNF- 、IL-1 、IL-6、IL-10、PPAR 、TGF- 1 の 6 遺伝子に対して行った。

4 . 研究成果

(1) 飲酒と NAFLD の関連についての動物モデルを用いた研究

摂食量、摂取カロリー

摂食量は、高脂肪食群がコントロール食群よりも有意に少なく、中アルコール群、高アルコール群が高脂肪食群よりも有意に少なかった。

摂取カロリーは、高脂肪食群がコントロール食群よりも有意に高く、中アルコール群、高アルコール群が高脂肪食群よりも有意に低かった。

体重、臓器重量

体重、精巣周囲脂肪重量、精巣周囲脂肪重量/体重比は、各群間に有意差は見られなかった。肝重量は、高脂肪食群がコントロール食群よりも有意に重い、アルコール摂取による有意な影響は見られなかった。肝/体重比は、高脂肪食群がコントロール食群よりも大きく、低アルコール群は高脂肪食群よりも小さかった。これら 3 群の実験とした場合、これらの差は統計学的に有意であった。

血清データ

AST、ALT 値は、低アルコール群が高脂肪食群よりも低く、コントロール食群と合わせた 3 群の実験とした場合、この差は統計学的に有意であった。アディポネクチン値は、高アルコール群が高脂肪食群よりも有意に高かった。総コレステロール、トリグリセリド、

グルコース、インスリン値は、各群間に有意差は見られなかった。

肝組織像

小葉内炎症は、低アルコール群が高脂肪食群よりも有意に軽度であった。NAS も、低アルコール群が高脂肪食群よりも有意に低値であった。門脈域炎症も低アルコール群が高脂肪食群よりも軽度であり、コントロール食群と合わせた3群の実験とした場合、この差は統計学的に有意であった。

脂肪化、肝細胞の風船状腫大、類洞周囲性線維化、線維化ステージは、各群間に有意差は見られなかった。

線維化画像解析

画像解析による小葉内線維化は、高脂肪食群がコントロール食群よりも有意に高度であったが、アルコール摂取による有意な影響は見られなかった。

肝組織の 4-HNE レベル

中アルコール群や高アルコール群が高脂肪食群よりも有意に高値であった。

リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析

TNF- α 、IL-6、PPAR α 、PPAR γ 、TGF- β 1 遺伝子の肝臓における発現レベルは、各群間に有意差は見られなかった。

以上の結果から、低用量のアルコール投与がマウスの NAFLD 病変を抑制することが示唆された。ただし、今回の研究でその分子メカニズムは解明されておらず、今後はその解明が課題になる。また、アルコールに対する反応には種差があり得ることから、少量飲酒が本当にヒトの NAFLD を抑制するのか、またもしそうであるならば、どの程度の飲酒量が最も効果的であるかを今後検討する必要がある。

(2) コーヒーの成分の NAFLD 動物モデルに対する抑制効果を調べる研究

摂食量

摂食量は、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に少なく、カフェイン群が CDAHFD 群よりも有意に多かった。

体重、臓器重量

体重、精巣周囲脂肪重量、精巣周囲脂肪重量/体重比は、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に軽い。また、コーヒー成分摂取による有意な影響は見られなかった。肝重量、肝/体重比は、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に重い。また、コーヒー成分摂取による有意な影響は見られなかった。

血清データ

AST 値は、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に高かった。カフェイン群やクロロゲン酸群は CDAHFD 群よりも高い傾向が見られたが、その差は統計学的に有意ではなかった。ALT 値は、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に高かった。カフェイン群やクロロゲン酸群は CDAHFD 群よりもさらに高く、コントロール食群と合わせた4群の実験とした場合、これらの差は統計学的に有意であった。総コレステロール、トリグリセリド、インスリン、アディポネクチン値は、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に低い。また、コーヒー成分投与による有意な影響は見られなかった。グルコース値は、各群間に有意差は見られなかった。

肝組織像

脂肪化、小葉内炎症、肝細胞の風船状腫大、類洞周囲性線維化、線維化ステージ、NAS は、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に高度であったが、コーヒー成分投与による有意な影響は見られなかった。ただし、CDAHFD 群、カフェイン群、クロロゲン酸群、カフェストール群の脂肪化や小葉内炎症は非常に強く、半定量的評価による比較は困難と考えられた。門脈域炎症は、各群間に有意差は見られなかった。

リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析

IL-1 の発現レベルは、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に低く、クロロゲン酸群やカフェストール群が CDAHFD 群よりも有意に低かった。IL-6 の発現レベルは、カフェイン群、クロロゲン酸群が CDAHFD 群よりも高く、コントロール食群と合わせた4群の実験とした場合、CDAHFD 群とカフェイン群の間に有意差が見られた。TNF- α 、PPAR α 、TGF- β 1 の発現レベルは、CDAHFD 群がコントロール食群よりも有意に高かったが、コーヒー成分投与による有意な影響は見られなかった。IL-10 の発現レベルは、各群間に有意差は見られなかった。

カフェイン群やクロロゲン酸群の血清 ALT 値が CDAHFD 群よりも有意に高いことから、今回の実験で用いた投与量では、これらのコーヒー成分が NASH モデルマウスの肝障害をむしろ増悪させることが示唆された。そのメカニズムとして、肝臓における IL-6 の発現レベルの亢進が関与している可能性がある。今後は、用量反応関係の検討やヒトにおいて同様の作用が見られるかの検討を行う必要がある。また、これまでに報告されているコーヒーの NAFLD に対する抑制効果の原因物質を特定する必要がある。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等:特記することなし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 芳久 (TAKAHASHI, Yoshihisa)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号: 70334381

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

福里 利夫 (FUKUSATO, Toshio)

帝京大学・医療共通教育研究センター・教授

研究者番号: 50134531

宇於崎 宏 (UOZAKI, Hiroshi)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号: 10296246

熊谷 有紗 (KUMAGAI, Arisa)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号: 50596963

(4)研究協力者

渡邊 雅人 (WATANABE, Masato)