

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12691

研究課題名(和文) ストレス解析による非アルコール性肝障害発症機構の解明と防御

研究課題名(英文) The mechanism of the onset of NASH and its prevention

研究代表者

吉田 康一 (Yoshida, Yasukazu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究部門付

研究者番号：90358333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性肝障害(NASH)の発症メカニズムの解明と発症予防、発症遅延に向けた運動の効果を明らかにすることを目的に研究を行った。主として、NASHのモデル動物であるSTAMマウスを用いて、NASH発症に伴う酸化ストレスマーカーの変動を追跡した。同時にマウスに運動負荷を与えることによってNASH発症の予防効果を生化学的検査等によって評価した。本NASHモデル系において、肝障害とともに顕著な酸化ストレスの亢進がみられた。肝臓の所見およびトリグリセリド蓄積の改善から、運動によるNASH発症抑制が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the mechanism of the onset of NASH and the preventive effects of voluntary exercise against NASH by using the animal model of STAM. We have proposed oxidative stress markers of lipids, hydroxylinoleic acids (HODE) which can provide the oxidative stress mechanism in vivo. It was found that plasma levels of HODE increased by the procession of the diseases compared to the control mice. It was interesting that the triglyceride levels in plasma and liver decreased significantly by exercise while the HODE levels were not changed significantly by the exercise. In conclusion, oxidative stress was indeed involved in the onset mechanism of NASH and exercise is prominent for the alleviation of the disease.

研究分野：酸化ストレス

キーワード：ストレス NASH バイオマーカー 疾病予防

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性肝障害 (NASH) はメタボリックシンドロームとも関連し、最近では欧米だけでなく日本においても注目されている疾患である。本疾患の罹患率は欧米で 2~3%、日本でも最近では罹患率が上昇し、欧米に近い数値であることも報告されている。疾患が進むと肝硬変、肝癌と重篤な症状につながることも知られている。NASH の発症メカニズムはほとんどわかっていない。脂肪肝に加え、アルコールではない何らかのストレスが負荷された場合に発症するとされ、活性酸素種による酸化ストレス、インスリン抵抗性、サイトカインの放出がストレス起因とされている。しかしながらこれらのストレスの正確な種類、量に関してはほとんど知見がない。

2. 研究の目的

提案代表者は、酸化ストレスの研究を産業技術総合研究所において 14 年来行い、酸化ストレスはただ悪い刺激になるだけでなく、うまく質と量を制御すると良いストレスとしても働き生体機能亢進に結びつく適応応答を示すこと (Ogawa (Akazawa) Y, et al. *Free Rad Res* 42, 674, 2008, Ogawa (Akazawa) Y, et al. *Free Rad Biol Med* under revision 2014) 脂質が酸化された化合物はメタボリックシンドロームを含む生活習慣病の早期で応答し、良いバイオマーカーになりえること (特許第 4348452 号 (登録日 H21/07/31) 「酸化ストレスマーカー及びその測定方法」吉田康一、Yoshida Y, et al. *Anal Biochem.* 379, 105, 2008. Umeno A, et al. *PLoS ONE* 8, e63542, 2013. Yoshida Y, et al. *J Clin Biochem Nutr.*, 52, 9, 2013) を見出してきた。中でも図 1 に示すように、NASH 疾患において、新規バイオマーカーであるヒドロキシリノール酸 (HODE) の値がヒトで高値を示すことを実証した。このような背景を踏まえて、本提案では、NASH を惹起するためのストレスの質と量を科学的に特定することを目指す。具体的に、研究開始後二年間で、まずはモデル動物を用いて、NASH 発症に至るストレス種の特定を各種 HODE 異性体の測定によって明らかにする。HODE には異性体が 6 種類存在し、ラジカル、酵素、一重項酸素酸化を区別することが可能である。さらに、動物実験によって得られた結果をもとに、ヒト被験者試験を実施し、特に NASH の発症抑制に関与する運動ストレスの種類および量の特定を行う。本研究は、NASH の発症に関与すると考えられている酸化ストレスの種類と量を特定することに特徴がある。従来、悪いストレスと考えられている酸化ストレスが場合によって良い効果へ繋がることも示唆され出した。過酸化水素、過酸化脂質、フリーラジカル、スーパーオキシドアニオンラジカルといった化学的に有害

とみなされる活性酸素種であっても、その量が少ない場合には、巧妙なシグナルトランスダクションによって、第二相抗酸化酵素の発現をもたらす、生体にとって良い働きをすることも科学的に証明されている。しかしながら、このような適応応答の作用は細胞レベルで証明されているだけで、ホールボディでの証明には至っていない。

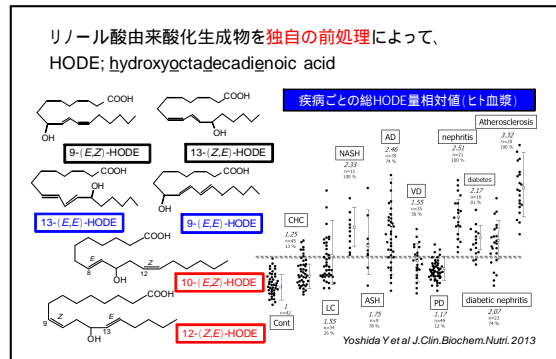


図 1. 本研究での主たるバイオマーカー

3. 研究の方法

まず、ヒドロキシリノール酸 (HODE) の測定を、新たに開発した NASH モデル動物 (STAM マウス) における血液および臓器を用いて行う。血液と臓器の相関を確認した後、STAM マウスの NASH 発症に伴う酸化ストレスの特定を行う。HODE を用いると、異性体によってラジカル酸化 (9,13-(EE)-HODE)、酵素酸化 (9,13-(ZE)-HODE)、一重項酸素酸化 (10,12-(ZE)-HODE) の特定および発症に至る閾値の定量が可能である。動物実験で得られた結果を踏まえて、ヒト被験者試験の詳細計画を立てる。特に運動によって NASH 発症をどのように抑制できるか動物実験を継続するとともに、NASH に至る前の肝障害、脂肪肝に対する運動の効果について HODE を含む生化学的マーカーを追跡することによって解明する。最終的に NASH を予防、抑制するための運動メニューを提供する。動物実験に用いる STAM マウスは、分担研究者らがこれまで実施してきた方法にて福岡女子大学にて作製する。本マウスの NASH 発症確認は、血清生化学検査値なかでも肝機能検査値の異常、さらには 肝臓組織学的検査による脂肪肝炎症スコア (NAFLD activity score) にて評価する。STAM マウス、正常マウスの運動群および非運動群において、経時的に肝臓局所および血液を採取し HODE を測定する。活性酸素種ならびにスーパーオキシドを過酸化水素と酸素に変換するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) や抗酸化物質であるグルタチオンを合成する γ -グルタミルシステインシターゼ (γ -GCS)、ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) などの抗酸化酵素の発現量に及ぼす影響も測定する。NASH 発症における酸化ストレスの質と

量の解析、運動の効果を検証する。

より具体的に、以下の方法で実験を行った。6週齢のC57BL/6J健常雄性マウスを運動あり群及び運動なし群に群分けし、運動あり群は回し車にて2週間自発的運動を継続させた。両群とも8週齢にて解剖し、脂質由来酸化生成物及び尿中8-OHdGを測定した。次に脂肪肝発症ステージである6週齢のSTAMマウスを運動あり群、運動なし群に群分けし、運動あり群には実験1に準じて2週間運動を継続させた。次いでNASH発症ステージである8週齢にて解剖し、脂質由来酸化生成物の他、血漿生化学検査、肝臓組織学的検査を実施した。

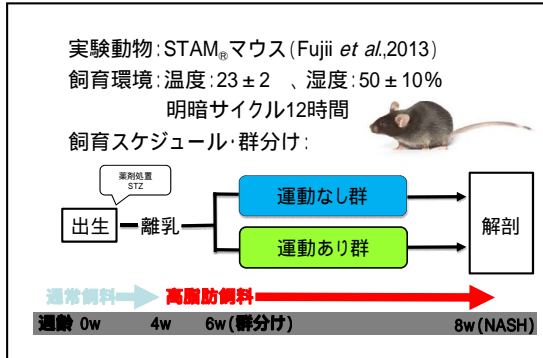


図2. 実験方法概念図

4. 研究成果

健常マウスは自発的運動により、体重増加が抑制され、脂肪組織重量は低下、腓腹筋重量は増加した。下図3に回し車の回転数を示す。

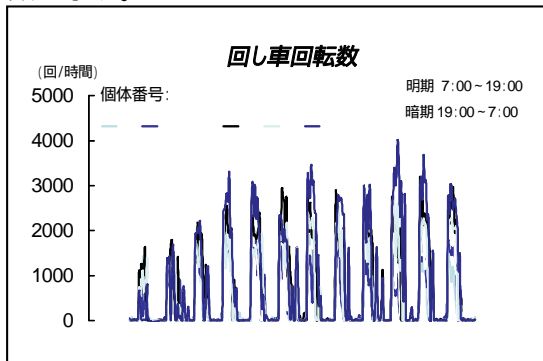


図3. 動物実験における回し車回転数

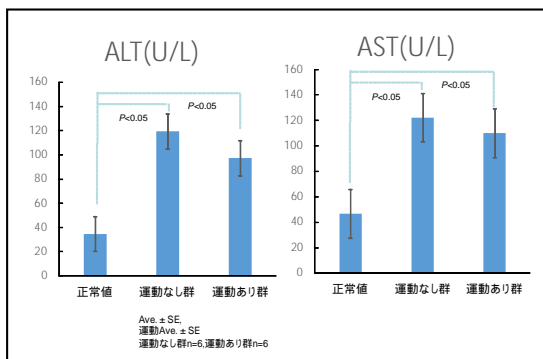


図4. 肝機能評価

健常マウスに比べてSTAMマウス群では肝機能の低下が認められ、運動によって機能低下が抑制された(図4)。また、トリグリセリドの値も運動によって低下し、脂肪肝化の顕著な抑制が認められた(図5)。

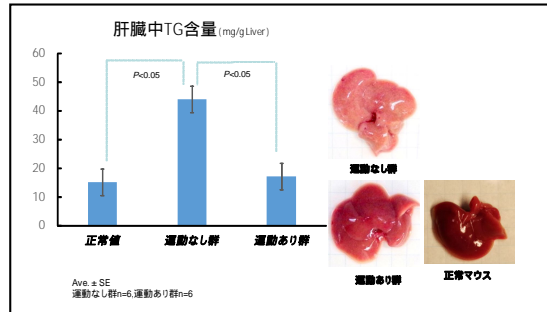


図5. TG および肝臓の状態

脂質由来酸化生成物の血中濃度は低値を示す傾向を、尿中8-OHdG/CREは有意な低値を示した。しかしながら、酸化ストレス状態を示す脂質由来酸化生成物の濃度にて判断すると、運動による酸化ストレスの改善効果は完全とは言えない。今後は運動に加えてラジカル捕捉能をもつビタミンEとの併用についての研究を展開する必要がある。

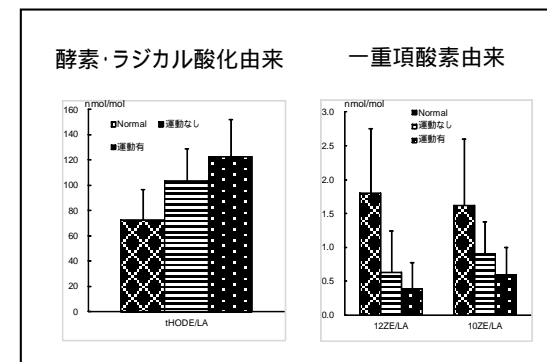


図6. 酸化ストレスマーカー

結論と今後の方針は以下の通り。

本NASHモデル系において、肝障害とともに顕著な酸化ストレスの亢進がみられた。

肝臓の所見およびTG蓄積の改善から、運動によるNASH改善が期待される。しかし、生化学的指標および酸化ストレス状態から、本モデル系では、運動による改善効果は完全とは言えない。

今後、人試験へ向けて詳細な動物および細胞実験を継続する。動物に関してはSTAMだけでなくTSODを主として用いる。

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3件)

Umemo A, Horie M, Murotomi K, Nakajima Y, Yoshida Y.

Antioxidative and Antidiabetic Effects of

Natural Polyphenols and Isoflavones.
Molecules. 30, 21, pii: E708, 2016.
DOI 10.3390/molecules21060708

Umeno A, Biju V, Yoshida Y.

In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. *Free Radic Res*, 1-15, 2017.

DOI 10.1080/10715762.2017.1315114

Yamamoto R, Iida A, Tanikawa K, Shiratsuchi H, Tokuda M, Matsui T, Nakamura T.

Dietary d-Allose Ameliorates Hepatic Inflammation in Mice with Non-alcoholic Steatohepatitis., *Food Science and Technology Research*, 23, 319-327, 2017.

DOI 10.3136/fstr.23.319

〔学会発表〕(計1件)

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

非アルコール性肝障害(NASH)と酸化ストレスとの関連

第69回日本酸化ストレス学会、2016年8月30日~2016年8月31日、仙台国際センター、仙台

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0件)

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

吉田 康一 (YOSHIDA, Yasukazu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究部門付

研究者番号：90358333

(2) 研究分担者

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

太田 雅規 (OHTA, Masanori)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：70341526

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

梅野 彩 (UMENO, Aya)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・特別研究員

研究者番号：20749098