

令和元年5月30日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00877

研究課題名(和文) 非肥満型非アルコール性脂肪性肝炎における胆汁酸の影響

研究課題名(英文) Effects of bile acid in the non-alcoholic steatohepatitis without obesity.

研究代表者

北森 一哉 (kitamori, kazuya)

金城学院大学・生活環境学部・教授

研究者番号：80387597

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)：SHRSP5/Dmcrの肝障害における食事性胆汁酸の影響を検討した。10週齢のSHRSP5/Dmcrは以下の4群に分けた。コール酸(CA)0% HFC、CA 0.5% HFC、CA 2% HFC、CA 4% HFC。摂餌期間は8週間とした。胆汁酸濃度依存的にSHRSP5/Dmcrの肝臓障害が進行し、体重と精巣上体脂肪を減少させた。褐色脂肪細胞と小腸のTransmembrane G protein-coupled Receptor5 (TGR5)の発現は、胆汁酸濃度が異なる各群において、差が認められなかった。非肥満は、TRR5を介したメカニズムではないかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人に多いとされる非肥満型非アルコール性脂肪性肝炎は、食事の組成でその病状が異なる。食事で摂取する胆汁酸の濃度が高くなるにつれ、顕著に肝障害が進行することが明らかになった。食事に含まれる成分の何が肝臓障害の原因となるのかを明らかにすることは、食習慣の改善に役立つものと考えられる。これまでの成果と合わせて考察することにより、特定の栄養素だけでなく、栄養素の組合せが問題になることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether dietary bile acid affected SHRSP5/Dmcr liver damage. At 10 weeks of age, the male SHRSP5/Dmcr rats were divided equally into 4 groups and fed with HFC diet as follows: Cholic acid (CA) 0% HFC group, CA 0.5% HFC group, CA 2% HFC group, CA 4% HFC group for 8 weeks. Hepatic lesions of SHRSP5/Dmcr progressed by dietary bile acid concentrations. However, the increase of dietary bile acid concentrations decreased body weight and epididymal adipose tissue. The expression of Transmembrane G protein-coupled Receptor5 (TGR5) in brown adipocytes and small intestine was not different in each group with different bile acid levels. Non-obese and steatohepatitis progression may not be a mechanism via TGR5.

研究分野：栄養学

キーワード：NASH 胆汁酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、肝臓に脂肪が沈着する非アルコール性脂肪肝 (NAFL) から、肝臓の慢性炎症、線維化、肝硬変など慢性進行性の非アルコール性脂肪肝炎(NASH)までの各病期を含む幅広い病態である。ヒト NASH 患者は 2 型糖尿病や肥満などのメタボリックシンドロームを合併していることが多く、NASH はメタボリックシンドロームの表現型の一つと考えられてきた。しかし、非肥満の患者も約 2 割存在する事が報告されている。

我々はこれまで、脳卒中高血圧自然発症ラット (SHRSP) の中から、SHRSP5/Dmcr を開発・系統維持してきた。SHRSP5/Dmcr は、高脂肪・高コレステロール (HFC) 飼料の比較的短い期間の摂取で、NASH のほぼ全てのタイプ (脂質沈着・炎症から線維化による偽小葉まで) を発症する、優れた非肥満型 NASH のモデルとなることを確認し、肝臓の脂肪化から線維化までのメカニズムを明らかにしてきた。エイコサペンタエンサン (EPA) は肝臓への脂質沈着・炎症の初期段階を改善すること、肝障害における細胞死は、ネクローシスがメインであること、肝障害において、コレステロールが重要な役割を果たすこと、また、コレステロール摂取が肝臓内に蓄積する脂肪酸の質に影響を与えることなど明らかにしてきた。そして、肝障害は、胆汁酸の蓄積が一因であることを明らかにしてきたが、食事性の胆汁酸の影響については、明らかにしていなかった。

2. 研究の目的

SHRSP5/Dmcr の肝障害において、HFC 飼料に添加されている成分である「胆汁酸」の影響は明らかにしていない。そこで、本研究では、非肥満型 NASH 病態における「胆汁酸」の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 実験動物と飼料

動物は、SHRSP5/Dmcr 雄性 10 週齢を用いた。全ての実験動物は specific pathogen-free 条件、室温 (23±2) 湿度 (55±5%)、8 時 - 20 時の 12 時間周期の明暗の基に飼育した。餌は、高脂肪・高コレステロール (HFC) の胆汁酸 (コール酸) 濃度が異なる飼料 4 種、コール酸 (CA)0% HFC、CA 0.5% HFC、CA 2% HFC (従来 HFC 飼料)、CA 4% HFC とした。摂餌期間は、10 週齢から 8 週間とし、自由摂取で与えた。

なお、動物の飼育と実験は金城学院大学実験動物委員会に承認され、動物実験の倫理ガイドラインに従って実施した。

2) 体重、血圧および血中生化学的検査

体重と血圧は飼料開始前と飼料開始後隔週で解剖前までそれぞれ測定した。血清サンプルは空腹時条件下で採取した。血液は、ペントバルビタール麻酔下 (70mg/kg) で腹部大動脈より採取した。血清サンプルは - 80 で保存した。血清総タンパク質 (TP)、アルブミン (Alb)、グルコース (Glu)、遊離脂肪酸 (FFA)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-cho)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GTP) を測定した。

3) 組織学的検査

採血後、肝臓、褐色脂肪細胞、小腸および精巣上体周囲脂肪細胞を採取し、肝臓、精巣上体周囲脂肪細胞の重量を測定した。

肝臓、褐色脂肪細胞、小腸は直ちに PBS で洗浄後、0.1M リン酸バッファー (pH7.4) -4% パラフォルムアルデヒドによって固定し、エタノール系で脱水後、パラフィンに包埋した。肝臓切片は 4 μ に薄切し、ヘマトキシリンエオジン (H.E.) とアザン (Azan) でそれぞれ染色後、光学顕微鏡 (KEYENCE BZ-X710) で観察した。パラフィン包埋した肝臓は組織学的検討に使用した。肝臓への脂肪沈着と炎症の確認は H.E. 染色で評価した。線維化と偽小葉の確認は Azan 染色で評価した。

褐色脂肪細胞と小腸のパラフィン切片は、胆汁酸の受容体である Transmembrane G protein-coupled Receptor5 (TGR5) の発現確認に使用した。免疫染色を用いて発現部位および量を確認した。陽性コントロールは、脾臓胎盤組織で確認した。陰性コントロールは、脂肪周囲の結合組織で確認した。

4) 解析

全てのデータは平均 \pm 標準偏差で示した。各群間および加齢による変化の比較は二元配置分散分析後、Tukey test で解析した。有意水準は 5% とした。全ての計算は JMP software (SAS Institute, Cary, NC) によって解析した。

4. 研究成果

1) 体重変化

同じ週齢では濃度依存的に体重低下し、胆汁酸が体重に及ぼす影響が認められた。

2) 肝臓重量・精巢上体脂肪組織重量

肝臓重量は、CA 0%群から CA 2%群までは CA 濃度依存的に増加し、CA 4%群で低下した。CA 4%群は体重も大きく低下するため、1000g 当たりで換算すると CA 添加濃度が高くなるにつれて高値を示した。胆汁酸が肝臓重量に及ぼす影響が認められた。

精巢上体脂肪組織重量は CA 濃度依存的に低値を示し、胆汁酸が内臓脂肪蓄積に及ぼす影響が認められた。

3) 血圧変化

HFC 飼料投与 CA 4%群が他の 3 群に比較し有意な低値を示したが、CA 0%、0.5%、2%群の間にそれぞれ有意な差は認められなかった。

4) 血清生化学

血清 Glu、TP 値は CA 4%群において最も高い値を示したが有意な差は認められなかった。血清 Alb、FFA 値は CA 0%から CA 2%と添加濃度が高くなるにつれ低い数値を示した後、CA 4%群において少し増加した。FFA は CA 2%と CA 4%群間で有意な差が見られた。血清 Glu 値は CA 添加濃度が高くなるにつれ低い値となったが、有意な差は認められなかった。血清 TG 値は CA 0.5%、2%群で下がり、CA 4%は CA 0%群と同程度の高値を示した。血清 T-Cho 値は CA 4%群で高値を示し、他群と比較して有意な差が認められた。血清 AST 値は CA 0%群と比較して他 3 群は有意に高値を示した。血清 ALT 値は CA 0.5%群で最も高くなり、CA 0%群に対して他群間において有意な差が認められた。γ-GTP 値は CA 4%群と比較し他群は有意に低値を示した。

5) 食事性胆汁酸の肝障害への影響

形態学的観察

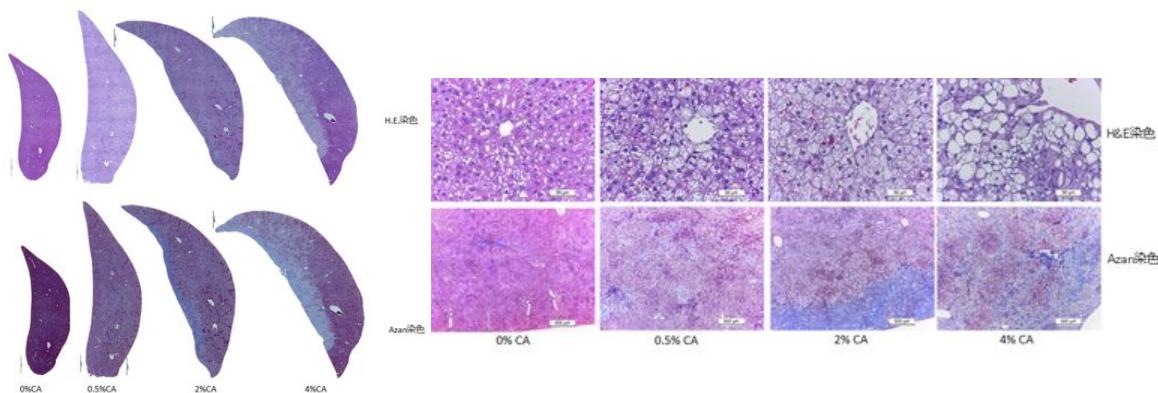
肉眼的には、CA 0%群と比較して CA 0.5%群において、すでに白色化が起こっていた。CA 添加濃度が高くなるにつれて白色化が進行し、CA 4%群では全体が白色化し、また、肝臓の硬化を確認した。胆汁酸濃度依存的に肝臓の障害が進行した。



組織学的観察

CA 0%群に比較し、CA 0.5%、2%、4%群は線維化の進行を認めた。CA 0%群は一部で細胞周囲の線維化が生じていた。CA 0.5%群では病巣を形成し、線維化部分が散見された。CA 2%群では背側部に強い線維化を示認め、CA 4%群は他群に比較して背側部を中心に、大小不同の結節、偽小葉の分布が標本全体に認めた。

胆汁酸濃度依存的に肝臓障害の進行が認められた。

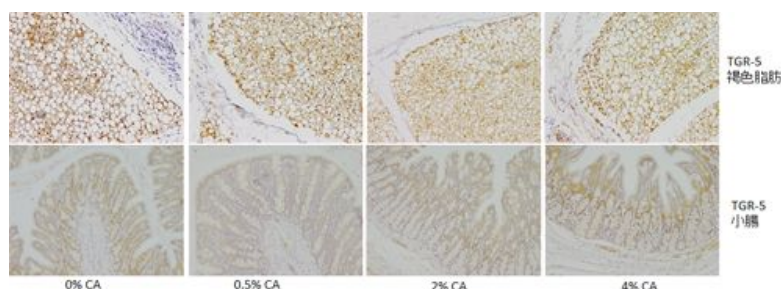


6) 食事性胆汁酸の受容体を介した病態への影響

胆汁酸は褐色脂肪細胞の TGR5 を介して、ミトコンドリアを活性化し、エネルギー消費量を増加することで抗肥満作用を示す報告がある。本モデルは、痩せ型 NASH を発症することから、その痩せの原因を明らかにするため、褐色脂肪細胞の TGR-5 発現の評価を試みた。褐色脂肪細胞においては、いずれの群においても原則びまん性に陽性を示しており、染色濃度に差は認められなかった。

胆汁酸は腸管内 L 細胞表面に存在する TGR5 を介してインクレチン的一种である Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) を分泌し、インスリン感受性上昇及び血中グルコース濃度低下により抗インスリン抵抗性作用を示す報告がある (Sato R. Vitam Horm. 2013)。そこで、小腸 TGR-5 の発現を評価したが、各群間で染色強度や陽性分布に差は認められなかった。

胆汁酸濃度と TGR-5 の発現に係り性は認められなかったため、食事性胆汁酸による非肥満および肝障害進行の原因は、TGR-5 を介する系路以外が原因であると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 発症・進展に食事性胆汁酸が与える影響. 北森一哉、木村藍、飛田博史、佐藤秀一、林由美、石川哲也、土倉覚、池田克巳、家森幸男、内藤久雄、那須民江. 第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2017 年

NASH/NAFLD モデルとしての SHRSP5/Dmcr. 北森一哉. 第 54 回高血圧関連疾患モデル学会(招待講演). 2018 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：那須 民江

ローマ字氏名：NAKAJIMA, Tamie

所属研究機関名：中部大学

部局名：生命健康科学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：10020794

研究分担者氏名：佐藤秀一

ローマ字氏名：SATO Syuichi

所属研究機関名：島根大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10332785

研究分担者氏名：飛田博史

ローマ字氏名：TOBITA Hiroshi

所属研究機関名：島根大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60457190

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。