

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09443

研究課題名(和文)大豆サポニンによるNASH予防および治療の可能性

研究課題名(英文)Possibility of prevention and treatment of NASH by soybean saponin

研究代表者

林 道廣 (Hayashi, Michihiro)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90314179

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)：臨床の非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)患者に近い動物モデルを作製するため、ハムスターに高脂肪と高コレステロールを含む餌で飼育した。高脂肪と高コレステロール含有餌で飼育したハムスターでは、肥満に加えて高血圧、高コレステロール血漿、糖尿病を発症し、肝臓では、NASH様の組織像を認めた。これらの結果は臨床のNASH患者に近いモデルが作製されたことを示唆した。このモデルを用いて大豆サポニンのNASHに対する予防効果を検討した。大豆サポニンは肝臓のキマーゼ活性および血漿中のレニン活性も有意な抑制を認めなかった。また、NASHで見られる脂肪肝および線維化を抑制する傾向を示したが、有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の1つは臨床のNASH患者と類似したNASHモデルの開発であった。臨床ではメタボリック症候群を背景にしたNASH患者が増加しているが、動物モデルで類似したモデルが少なく、新規の臨床に類似したモデルが必要であった。本研究でハムスターに高脂肪と高コレステロール餌を負荷することで目的の臨床に類似したNASHモデルの作製に成功した。もう一つの目的であった大豆サポニンによるNASH予防効果は軽微で限定的であった。

研究成果の概要(英文)：Hamsters were fed a high-fat and high-cholesterol diet to create an animal model similar to the patient background of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) patients. Hamsters fed high-fat and high-cholesterol diets developed hypertension, hyperlipidemia and diabetes in addition to obesity. In this model, lipid deposition, fibrosis, ballooning of hepatocytes and infiltration of the inflammatory cells were observed in liver. These results suggested that a model close to NASH patients was created. Using this model, the preventive effect of soybean saponin against NASH was examined. Soybean saponin did not significantly inhibit liver chymase activity and plasma renin activity. Moreover, there was a tendency to suppress fatty liver and fibrosis seen in NASH, but no significant difference was observed.

研究分野：一般・消化器外科学

キーワード：キマーゼ NASH 大豆サポニン 阻害薬 線維化 炎症細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は飲酒歴がないにも関わらず肝細胞に著明な中性脂肪を主とする脂肪の蓄積が起こり、アルコール性肝障害に特徴とされる病理所見が認められる疾患概念である。従来、過剰飲酒を伴わない脂肪肝は可逆性変化として軽視されていたが、NASHの一部は肝硬変に進行し、さらには肝臓癌まで進行する。これらの疾患は肥満や糖尿病、脂質異常症、高血圧などを背景に持つことが多く、日本国内でも増加の一途を辿っている。

(2) NASH の病態を解析するモデルとして、メチオニン コリン欠乏 (MCD) 餌を与えて作製するモデルが従来使用されてきた。我々もハムスターの MCD 餌を負荷する NASH モデルを用いて、肝機能障害、脂肪肝、肝臓線維化および炎症細胞の浸潤と肝臓内のキマーゼ発現と関連性を示した。しかし、本 NASH モデルは極度の体重減少と血中脂質低下を伴う NASH であり、臨床で見られるメタボリックシンドロームを背景とした NASH の病態機序とは大きく異なる。そのため、高血圧と高脂血症を伴うラットの NASH モデルを作製して解析を行った (雑誌論文 参照)。一方、キマーゼには動物種差が大きいことより、ヒトキマーゼの NASH における役割を解析するためには、ヒトキマーゼに近い性質を有するキマーゼを持つハムスターでモデル作製する必要があった。

## 2. 研究の目的

臨床により近い NASH モデルとして肥満と高脂血症、高血圧、糖尿病を伴う新規のハムスター NASH モデルを確立し、キマーゼとレニンの両酵素を阻害する大豆サボニンの NASH に対する予防効果および治療効果を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 高脂肪+高コレステロール餌負荷によるハムスター-NASH モデルの作製 (雑誌論文 参照)

### **動物モデル**

8 週齢、雄性のハムスターに HFC 餌を 12 週間負荷した HFC 餌負荷群とし、対照として正常食で飼育したハムスターを正常群とした。本試験は、大阪医科大学動物実験委員会にて実験計画が承認されたのち (No.29098)、実験計画および倫理基準に従って実験を実施した。

### **解析時期および解析方法**

体重は経時的に解析し、血圧、血中トリグリセリド、血中 LDL-コレステロール、空腹時血糖値、肝臓重量は試験終了時 (HFC 餌負荷後 12 週) に測定した。その後、肝臓組織を摘出して組織学的および生化学的解析を行った。

#### 肝臓組織の解析

##### ・組織学的解析

カルノア固定した組織ブロックより 4  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した切片で脂肪滴を観察し、シリウスレッド染色した切片で線維面積を定量した。

キマーゼの産生細胞である肥満細胞数はトルイジンブルー染色を行って定量した。キマーゼは抗キマーゼ抗体を用いて免疫染色し、キマーゼ陽性細胞数を定量した。

#### ・生化学的解析

肝臓組織よりトリゾールを用いて RNA を抽出し、cDNA を作製したのち、TaqMan プローブ法にて Tumor nuclear factor (TNF)- $\alpha$ 、Matrix metalloproteinase (MMP)-9、Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 、コラーゲン I、18S ribosomal RNA (rRNA) のリアルタイム PCR を行った。各パラメータの mRNA レベルは 18S rRNA にて補正して定量した。

組織抽出液よりキマーゼ活性は、キマーゼ阻害薬で阻害されたアンジオテンシン 産生量として測定し、総アンジオテンシン 産生活性は、アンジオテンシン I 基質として測定した。

#### (2) ハムスターを用いた NASH モデルに対する大豆サポニンの影響

##### **動物モデルおよび投薬方法**

8 週齢、雄性のハムスターに HFC 餌と水道水 (プラセボ群) または大豆サポニン (サポニン群) を自由飲水させて 12 週後に解析を行った。正常食で飼育した群を正常食群とした。本試験は、大阪医科大学動物実験委員会にて実験計画が承認されたのち (No.30004、No.2019-014) 実験計画および倫理基準に従って実験を実施した。

##### **解析時期および解析方法**

体重は経時的に解析し、血圧、血中トリグリセリド、血中 LDL-コレステロール、空腹時血糖値、血中レニン活性、肝臓重量は試験終了時 (HFC 餌負荷後 12 週) に測定した。その後、肝臓組織を摘出して組織学的および生化学的解析を行った。

##### 肝臓組織の解析

#### ・組織学的解析

カルノア固定した組織ブロックより 4  $\mu$ m の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した切片で脂肪滴を観察し、シリウスレッド染色した切片で線維面積を定量した。

キマーゼの産生細胞である肥満細胞数はトルイジンブルー染色を行って定量した。キマーゼは抗キマーゼ抗体を用いて免疫染色し、キマーゼ陽性細胞数を定量した。

#### ・生化学的解析

肝臓組織よりトリゾールを用いて RNA を抽出し、cDNA を作製したのち、TaqMan プローブ法にて TNF- $\alpha$ 、MMP-9、TGF- $\beta$ 、コラーゲン I、18S rRNA のリアルタイム PCR を行った。各パラメータの mRNA レベルは 18S rRNA にて補正して定量した。

組織抽出液よりキマーゼ活性は、キマーゼ阻害薬で阻害されたアンジオテンシン 産生量として測定し、総アンジオテンシン 産生活性は、アンジオテンシン I 基質として測定した。

## 4 . 研究成果

### (1) 高脂肪+高コレステロール (HFC) 餌負荷によるハムスター NASH モデルの作製

正常群または HFC 餌負荷群の体重、肝重量、血圧および血中パラメータを以下に記す。

体重：試験開始 4 週後より HFC 餌負荷群でコントロール群に比して有意な増加が見られた。

肝重量：正常群に比して HFC 餌負荷群で有意に増加した。

肝重量/体重比：正常群に比して HFC 餌負荷群で有意に増加した。

血中トリグリセリド (TG): 正常群に比して HFC 餌負荷で有意に増加した。

血中 LDL コレステロール (Chol.): 正常群に比して HFC 餌負荷群で有意に増加した。

空腹時血糖値: 正常群に比して HFC 餌負荷群で有意に増加した。

血圧: 正常群に比して HFC 餌負荷群で高い傾向であったが、2 群間に差を認めなかった。

#### 肝臓組織の解析

##### ・組織学的解析

HE 染色: 正常群で確認できなかった脂肪滴が HFC 餌負荷群で認められた。

シリウスレッド染色: 正常群でほとんど確認できなかった線維化部位 (赤色染色部位) が HFC 餌負荷群で顕著に増加した。

トリイジンブルー染色: 正常群に比して HFC 餌負荷群で多い傾向であった (正常群:  $0.19 \pm 0.02$ 、HFC 餌負荷群:  $0.25 \pm 0.04$ )。

キマーゼ陽性細胞: 正常群に比して HFC 餌負荷群で多い傾向であった (正常群:  $0.18 \pm 0.01$ 、HFC 餌負荷群:  $0.23 \pm 0.04$ )。

##### ・生化学的解析

TNF- $\alpha$ 、MMP-9、TGF- $\beta$ 、コラーゲン I の mRNA 発現量: 正常群に比して HFC 餌負荷群で有意に高値であった。

キマーゼ活性と総アンジオテンシン 産生活性: コントロール群に比して HFC 餌食群で共に有意に増加した。

#### (2) ハムスターを用いた NASH モデルに対する大豆サポニンの影響

正常食群、プラセボ群、サポニン群の体重、肝重量、血圧および血中パラメータを以下に記す。

体重: 試験開始 4 週間後より HFC 餌負荷したプラセボ群およびサポニン群で有意な増加が見られたが、この 2 群間に有意差はなかった。

肝重量: HFC 餌負荷したプラセボ群およびサポニン群で有意な増加が見られた。サポニン群でプラセボ群より低い傾向であったが、有意差はなかった。

肝重量/体重比: HFC 餌負荷したプラセボ群およびサポニン群で有意な増加が見られた。サポニン群でプラセボ群より低い傾向であったが、有意差はなかった。

血中 TG: コントロール群に比して HFC 餌負荷で有意に増加した。

血中 LDL-Chol.: コントロール群に比して HFC 餌負荷群で有意に増加した。

血中レニン活性: 正常群に比べてややプラセボ群およびサポニン群で高い傾向であったが有意差がなく、3 群間で有意な差を認めなかった。

空腹時血糖値: 正常食群に比べて HFC 餌負荷したプラセボ群およびサポニン群で増加が見られた。サポニン群でプラセボ群より低い傾向であったが、有意差はなかった。

血圧: 正常食群に比べて HFC 餌負荷したプラセボ群およびサポニン群で増加が見られた、この 2 群間に有意差はなかった。

#### 肝臓組織の解析

##### ・組織学的解析

HE 染色：脂肪滴面積/全面積比は正常食群に比してプラセボ群およびサポニン群で明らかに増えていたが、サポニン群でやや少ない傾向があった。

シリウスレッド染色：線維化面積/全面積比は正常食群に比してプラセボ群およびサポニン群で明らかに増えていたが、サポニン群でやや少ない傾向があった。

トリイジンブルー染色：肥満細胞数/全面積比は正常食群に比してプラセボ群およびサポニン群で明らかに増えていたが、サポニン群でやや少ない傾向があった。

キマーゼ陽性細胞：キマーゼ陽性細胞数/全面積比は正常食群に比してプラセボ群およびサポニン群で明らかに増えていたが、サポニン群でやや少ない傾向があった。

・生化学的解析

TNF- $\alpha$ 、MMP-9、TGF- $\beta$ 、コラーゲン I の mRNA 発現量：正常食群に比してプラセボ群で有意に増加していたが、サポニン群で抑制傾向を示すものの有意差はなかった。

キマーゼ活性と総アンジオテンシン 産生活：正常食群に比してプラセボ群で有意に増加していたが、サポニン群で抑制傾向を示すものの有意差はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Miyaoaka Y, Jin D, Tashiro K, Masubuchi S, Ozeki M, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K.      | 4. 巻<br>67            |
| 2. 論文標題<br>A novel hamster nonalcoholic steatohepatitis model induced by a high-fat and high-cholesterol diet. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Experimental Animals   | 6. 最初と最後の頁<br>239-247 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1538/expanim.17-0126   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Miyaoaka Y, Jin D, Tashiro K, Masubuchi S, Ozeki M, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K       | 4. 巻<br>67            |
| 2. 論文標題<br>A novel hamster nonalcoholic steatohepatitis model induced by a high-fat and high-cholesterol diet. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Exp Anim   | 6. 最初と最後の頁<br>239-247 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1538/expanim.17-0126   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Miyaoaka Y, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Masubuchi S, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K.     |
| 2. 発表標題<br>Chymase inhibitor prevents the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats. |
| 3. 学会等名<br>Digestive Disease Week 2017（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

|                   | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号）                     | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号）                  | 備考 |
|-------------------|---|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 高井 真司<br><br>(Takai shinji)<br><br>(80288703) | 大阪医科大学・医学研究科・教授<br><br><br><br>(34401) |    |