

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07975

研究課題名（和文）植物性ナノ粒子による非アルコール性脂肪性肝疾患に対する新規薬効成分の探索

研究課題名（英文）Exploration of Novel Medicinal Ingredients for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Using Vegetable Nanoparticles

研究代表者

宮明 寿光 (Miyaaki, Hisamitsu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：20437891

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：各種植物の抽出エキスから、ショ糖密度勾配超遠心法を用いて、複数の分画を分離、回収した。それぞれの分画をナノ粒子トラッキング解析法を用いて粒子サイズ、量を解析し、これらの植物のnanoparticle分画を同定し、その量を明らかにした。生姜由来のナノ粒子が肝細胞株に取り込まれることを確認し、ナノ粒子が取り込まれた肝細胞株に飽和脂肪酸を添加し、脂肪滴が減少することを見いだした。生姜由来ナノ粒子分画にはShogaolが含まれていることを見出した。続いてNAFLD（非アルコール性脂肪性肝疾患）モデルマウスにこの生姜由来のnanoparticleを投与したところ、体重減少効果、脂肪肝改善効果が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDはメタボリック症候群の増加とともに我が国においても増加傾向となり、肝硬変、肝癌の主要な原因の1つである。一方、NAFLDの治療は生活習慣の指導となり、現在有効な薬剤はない。今回の研究では通常の生活で我々がよく食している生姜由来nanoparticleがShogaolを豊富に含有しており、NAFLDマウスモデルに対して脂肪肝改善効果や抗酸化作用を示すことを見出した。また生姜由来nanoparticleが経口投与により、効率的に肝細胞内に取り込まれることも分かった。

研究成果の概要（英文）：Multiple fractions were separated and recovered from plant extracts using sucrose density gradient ultracentrifugation. Each fraction was analyzed for particle size and quantity using the nanoparticle tracking analysis method to identify the nanoparticle fractions of these plants and their amounts. We confirmed that ginger-derived nanoparticles were incorporated into hepatocyte cell lines, and found that saturated fatty acids were added to hepatocyte cell lines in which the nanoparticles were incorporated, and fatty points were reduced. The ginger-derived nanoparticle fraction was found to contain Shogaol by thin-layer chromatography. The ginger-derived nanoparticles were subsequently administered to NAFLD model mice, and showed effects of weight loss and improvement of fatty liver.

研究分野：消化器内科学

キーワード：植物性ナノ粒子 NAFLD 生姜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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 (NAFLD) は肝におけるメタボリックシンドロームの表現型であり、わが国でも肥満者の増加につれ、急増している (Kojima, S, et al. Journal of gastroenterology 38, 954-961)。NAFLD の 10 ~ 20% 程度に炎症を伴い肝硬変、肝癌へと進展する予後不良な NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) が存在する。ウイルス性肝炎がコントロールできるようになり、NAFLD の対策は急務である。

NAFLD に対する治療の課題として

- (1) 生活習慣 (食事、運動療法) の改善が唯一の治療であるが長期の生活習慣の維持は困難である。
- (2) NAFLD, NASH 発症には多因子 (インスリン抵抗性、ホルモン異常、酸化ストレス、ER ストレス) が関与するとされ、多因子に作用する治療薬が必要である。
- (3) 現在開発中の薬剤は化学創薬が中心で副作用の問題、高価な薬価の問題がある。

近年、生体内の種々の細胞が分泌する exosome をはじめとした nanoparticle は内部に蛋白・脂質・RNA を含有しており、これらの nanoparticle は周囲の細胞に endocytosis により取り込まれ、内包物を効率よく伝達することが分かった。Nanoparticle は従来の遺伝子導入の方法にくらべ内包物を高い効率で他の細胞に伝達することが明らかとなり、細胞間の新たなシグナル伝達手段として知られるようになった。自然界に存在する nanoparticle の代表的なものに、植物由来の nanoparticle が挙げられる。我々が日常生活において食している植物の成分にも NAFLD の改善に必要な糖・脂質代謝改善作用・抗酸化・炎症・線維化作用を有するものが報告されている。経口より摂取された植物由来の nanoparticle は腸管より吸収されて、門脈を介して肝臓に到達し、様々な生理作用、病態に影響を及ぼしていると考えられる。今回、我々は NAFLD 改善効果を有するとされる植物由来の nanoparticle が、NAFLD の治療選択となり得るかを明らかにする。

2. 研究の目的

既報にて NAFLD 改善効果を有するとされる植物由来の nanoparticle を抽出し、内包する成分の解析を行う。これらの nanoparticle の NAFLD への治療効果を明らかにし、新たな治療方法となるような、植物由来の nanoparticle を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Nanoparticle の回収、解析

植物より抽出した nanoparticle の分離、量、サイズ解析

既報にて糖・脂質改善作用、抗酸化・炎症・線維化作用があるとされる植物を粉碎し、その抽出エキスに対し、シヨ糖密度勾配超遠心法を行い、nanoparticle 分画を回収する。Nanoparticle の量、サイズをナノ粒子トラッキング解析法にて評価する。

Nanoparticle の内包物の成分解析

nanoparticle 分画内の成分を薄層クロマトグラフィーにて分離し、既報の糖・脂質代謝改善、抗酸化・炎症・線維化作用を有する成分が含まれているかを明らかにする。さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、内包物の質的、量的解析を行う。

(2) 植物由来 nanoparticle の細胞株に及ぼす in vitro の検討

in vitro にて植物由来 nanoparticle の各細胞株へのとりこみを検証する。

nanoparticle の膜成分を PKH67 染色で標識後に、各種細胞株(肝細胞株、マクロファージ株、星細胞株)に添加し経時間的に共焦点顕微鏡を用いて検討し、細胞株による取り込みの違いを検証する。

in vitro で nanoparticle が各種肝細胞株に与える影響を明らかにする。

nanoparticle が取り込まれた各種肝細胞株に飽和脂肪酸(パルミチン酸 400 μ M)、不飽和脂肪酸(オレイン酸 400 μ M)を 16 時間添加し in vitro にて NASH を再現する。この時の肝細胞の脂肪化、細胞死・酸化ストレスの発生、糖の取り込み(インスリンシグナル)に及ぼす nanoparticle による影響を明らかにする。脂肪化は oil red 染色にて、細胞死は DAPI 染色およびカスパーゼアッセイにて評価する。また糖・脂質代謝、細胞死、酸化ストレスに関わる m-RNA は real time PCR にて、蛋白はウエスタンブロット、免疫染色にて評価する。

(3) 脂肪肝マウスモデルにおける植物由来 nanoparticle の検証

ウエスタンダイット(脂肪肝マウス)における植物由来 nanoparticle の効果の検証

C57BL/6 マウスにウエスタンダイット(高脂肪、高フルクトース)を 24 週間投与し脂肪肝マウスモデルを作製する。このマウスに研究(1)、(2)にて NAFLD に対して改善効果を見出した植物より抽出した nanoparticle を PKH67 の蛍光色素で標識し、経口的に投与を行う。sacrifice 後、各臓器への取り込みを確認する。このマウスでは脂肪肝と炎症はおこるが、線維化は軽度のため、脂肪化、炎症・細胞死、酸化ストレスへの影響を明らかにする。体重減少、肝重量、肝組織変化、精巣上体を検討し、治療効果を明らかにする。摘出した肝臓、精巣上体の遺伝子発現レベルを検討し、分子メカニズムも明らかにする。

4. 研究成果

(1) それぞれの植物(生姜、グレープフルーツ、カボス、オレンジ)の抽出エキスから、ショ糖密度勾配超遠心法を用いて、複数の分画を分離、回収した。それぞれの分画をナノ粒子トラッキング解析法を用いて粒子サイズ、量を解析し、これらの植物の nanoparticle が豊富に含まれている分画を同定し、その内包量を明らかにした。生姜において nanoparticle が特に豊富に含まれる分画を抽出することができた。このため生姜由来の nanoparticle を中心に解析を行った。

(2) 生姜由来 nanoparticle 分画には薄層クロマトグラフィーにて抗酸化作用や脂肪肝改善作用を有する Shogaol が豊富に含まれていることを見出した。HPLC でも同様にこの分画に Shogaol が豊富に含まれていることを確認した。

(3) 生姜由来の nanoparticle が肝細胞株、星細胞株に取り込まれることを蛍光染色を用いて確認した。nanoparticle が取り込まれた肝細胞株に飽和脂肪酸(パルミチン酸 400 μ M)、不飽和脂肪酸(オレイン酸 400 μ M)を添加し、脂肪滴が生姜 nanoparticle 投与群で減少することを見いだした。一方で脂肪肝増悪の因子である肝細胞株のアポトーシスの抑制や星細胞の活性化に対する抑制の効果は見いだせなかった。さらに mRNA の検討では生姜 nanoparticle 粒子投与によりコントロール群に比較して酸化の亢進による脂肪酸代謝の改善、抗酸化作用を認めた。

(4) コントロールマウス、ウエスタンダイエットで作成した NAFLD モデルマウスに生理食塩水、生姜由来の nanoparticle を経口的に投与する 4 群を作成し検討を行った。生姜由来 nanoparticle 投与により有害事象は認めなかった。またコントロールマウスにおいてはコントロール群と生姜由来 nanoparticle 投与群では明らかな体重の変化の差は認めなかった。一方、NAFLD モデルマウスにおいては生姜由来 nanoparticle 投与群で有意な体重減少効果、肝臓重量、精巣上体脂肪量の減少を認めた。血液検査では NAFLD モデルマウスにおいて生姜由来 nanoparticle 投与により ALT の有意な低下、総コレステロール値も有意な低下を示した。さら

に肝組織において炎症や線維化の改善は認めなかったが、脂肪肝の改善効果、酸化ストレスの減少を認めた。遺伝子レベルの検討においても生姜由来 nanoparticle 投与による 肝臓内の脂肪酸代謝の改善や酸化ストレスの減少、精巣上体の脂肪酸代謝の改善を認めた。

今回の検討では生姜由来 nanoparticle による体重減少効果、肝臓脂肪化改善効果、肝臓内抗酸化ストレス効果が明らかとなった。今後は生姜以外の植物由来の nanoparticle も検討し、肝臓内の脂肪だけでなく炎症改善、線維化改善効果を持つ他の植物由来の nanoparticle も見出したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Haraguchi Masafumi, Ichinose Kunihiro, Miyaaki Hisamitsu, Hanada Masatoshi, Fukushima Masanori, Sasaki Ryu, Miuma Satoshi, Hara Takanobu, Kugiyama Tota, Soyama Akihiko, Hidaka Masaaki, Tsuji Ayumi, Yano Rintaro, Sekino Motohiro, Takahata Hideaki, Eguchi Susumu, Nakao Kazuhiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative study of the effect of neuromuscular electrical stimulation and oral administration of branched-chain amino acid on preventing sarcopenia in patients after living-donor liver transplantation: study protocol for an open-label randomized controlled trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13063-021-05086-y	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Hino Naoyuki, Sasaki Ryu, Takahashi Youichi, Koike Makiko, Fukushima Masanori, Haraguchi Masafumi, Honda Takuya, Miuma Satoshi, Ozawa Eisuke, Miyaaki Hisamitsu, Ichikawa Tatsuki, Nakao Kazuhiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Treatment of Hepatitis C Virus Infection with Direct-acting Antiviral Agents Elevates the Serum Small-dense Low-density Lipoprotein Cholesterol Level	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 191 ~ 199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5563-20	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Sasaki Ryu, Miyaaki Hisamitsu, Narita Shohei, Fukushima Masanori, Haraguchi Masafumi, Miuma Satoshi, Hidaka Masaaki, Eguchi Susumu, Okudaira Sadayuki, Abe Kuniko, Nakao Kazuhiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Serum Mac 2 binding protein glycosylation isomer as a biomarker of fibrosis in living donor liver transplant graft	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Transplantation	6. 最初と最後の頁 e14175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ctr.14175	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ichikawa Tatsuki, Miyaaki Hisamitsu, Miura Satoshi, Motoyoshi Yasuhide, Yamashima Mio, Yamamichi Shinobu, Koike Makiko, Nakano Yusuke, Honda Tetsuro, Yajima Hiroyuki, Uehara Ryouhei, Miyazaki Osamu, Kuribayashi Yasutaka, Kira Keiji, Taura Naota, Nakao Kazuhiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Direct-acting Antivirals Improved the Quality of Life, Ameliorated Disease-related Symptoms, and Augmented Muscle Volume Three Years Later in Patients with Hepatitis C Virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2653 ~ 2660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5102-20	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Miyazoe Yuri, Miura Satoshi, Miyaaki Hisamitsu, Kanda Yasuko, Nakashiki Suguru, Sasaki Ryu, Haraguchi Masafumi, Shibata Hidetaka, Honda Takuya, Taura Naota, Nakao Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular vesicles from senescent hepatic stellate cells promote cell viability of hepatoma cells through increasing EGF secretion from differentiated THP-1 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 163-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2020.1279	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Miyazoe Yuri, Miura Satoshi, Miyaaki Hisamitsu, Kanda Yasuko, Nakashiki Suguru, Sasaki Ryu, Haraguchi Masafumi, Shibata Hidetaka, Honda Takuya, Taura Naota, Nakao Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular vesicles from senescent hepatic stellate cells promote cell viability of hepatoma cells through increasing EGF secretion from differentiated THP-1 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 163 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2020.1279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Satoshi, Miyamoto Junya, Taura Naota, Fukushima Masanori, Sasaki Ryu, Haraguchi Masafumi, Shibata Hidetaka, Sato Shuntaro, Miyaaki Hisamitsu, Nakao Kazuhiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Influence of Interferon-free Direct-acting Antiviral Therapy on Primary Hepatocellular Carcinoma Recurrence: A Landmark Time Analysis and Time-dependent Extended Cox Proportional Hazards Model Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 901 ~ 907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3382-19	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Miyaaki Hisamitsu, Kobayashi Hironori, Miura Satoshi, Fukushima Masanori, Sasaki Ryu, Haraguchi Masafumi, Nakao Kazuhiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Blood carnitine profiling on tandem mass spectrometry in liver cirrhotic patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-020-01190-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Haraguchi Masafumi, Hirai Satoshi, Nakamura Yutaka, Otsuka Tetsuhiro, Ishimaru Hideki, Sasaki Ryu, Fukushima Masanori, Miura Satoshi, Miyaaki Hisamitsu, Nakao Kazuhiko	4. 巻 59
2. 論文標題 A Case of Intractable Hepatic Encephalopathy with a Large Portosystemic Shunt Successfully Treated Using Shunt-preserving Disconnection of the Portal and Systemic Circulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1047 ~ 1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3955-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki, Fukushima, Haraguchi, Miura, Miyaaki, Hidaka, Eguchi, Matsuo, Tajima, Matsuzaki, Hashimoto, Ooba, Kugiyama, Yatsushashi, Motoyoshi, Shigeno, Kinoshita, Nakao	4. 巻 11
2. 論文標題 Response to Lenvatinib Is Associated with Optimal RelativeDose Intensity in Hepatocellular Carcinoma: Experience in Clinical Settings	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1769 ~ 1769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11111769	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Yamashita Mio, Miyaaki Hisamitsu, Miura Satoshi, Shibata Hidetaka, Sasaki Ryu, Haraguchi Masafumi, Fukushima Masanori, Nakao Kazuhiko	4. 巻 58
2. 論文標題 The Long-term Efficacy of Sodium Glucose Co-transporter 2 Inhibitor in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1987 ~ 1992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2566-18	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮明寿光、三馬 聡、原口雅史、佐々木 龍、福島真典、日高匡章、江口 晋、中尾一彦
2. 発表標題 第56回生体肝移植ドナーの肝移植後の脂肪肝発生とそのリスク因子
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 裕、宮明寿光、中尾一彦
2. 発表標題 肝硬変、末期肝不全における骨微細構造の解析～肝臓と骨病変の臓器相関～
3. 学会等名 第24回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮明寿光、三馬 聡、原口雅史、佐々木 龍、福島真典、中尾一彦
2. 発表標題 肝硬変患者における臨床症状と睡眠障害やQuality of Life (QOL)について～カルニチン投与による睡眠障害やQOLへの影響～
3. 学会等名 第24回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 裕、宮明寿光、福島真典、原口雅史、佐々木 龍、三馬 聡、中尾一彦
2. 発表標題 肝硬変、末期肝障害における骨代謝異常の病態の検討
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮明寿光、三馬 聡、原口雅史、佐々木 龍、福島真典、市川辰樹、原 貴信、日高匡章、江口 晋、中尾一彦
2. 発表標題 75g ブドウ糖負荷試験による肝移植前後の糖代謝異常の変化 .
3. 学会等名 第38回日本肝移植学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮明寿光、三馬 聡、原口雅史、佐々木 龍、福島真典、中尾一彦
2. 発表標題 SGLT2 阻害薬によるNAFLD の肝機能改善効果の検討～中長期効果の検討～ .
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮明寿光、原口雅史、福島真典、佐々木 龍、三馬 聡、中尾一彦
2. 発表標題 脂肪肝ドナー候補に対するダイエットプログラムの有用性と問題点
3. 学会等名 肝臓と糖尿病・代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤澤祐子、宮明寿光、中尾一彦
2. 発表標題 53BP1 蛍光免疫染色によるNAFLD 肝細胞遺伝子損傷応答の可視化
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島真典、宮明寿光、中尾一彦
2. 発表標題 NASH の病態進展に寄与する，肝細胞由来のceramide-enriched exosome 産生メカニズムの解明
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮明寿光、三馬 聡、原口雅史、佐々木 龍、福島真典、中尾一彦
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患患者のCAP、非侵襲的線維化測定の変化に与える因子の解析について～病理学的因子を中心に～
3. 学会等名 日本肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	玉田 陽子 (Tamada Yoko) (70393460)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------