

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11053

研究課題名（和文）ポリアミンによる非アルコール性脂肪性肝炎の抑制効果と治療戦略

研究課題名（英文）Inhibition and treatment strategy of nonalcoholic steatohepatitis by polyamines

研究代表者

高橋 芳久（Takahashi, Yoshihisa）

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：70334381

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）：本プロジェクトでは、まず代表的な非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスの性差を調べる研究を行い、それに引き続いて非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスに対する3種のポリアミンの効果調べる研究を行った。その結果、TSODマウスやdb/dbマウスの肝病変の性差は、ヒトに類似する経時的変化を示すと考えられ、FGF21の発現レベルが雌雄差に関連している可能性が示唆された。また、3種類のポリアミンの中でもプトレシンがマウスのNASHを抑制する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの非アルコール性脂肪性肝疾患には性差が見られるが、それを反映する動物モデルはこれまで確立されていなかった。本研究で、TSODマウスやdb/dbマウスの自然発生肝病変はヒトに類似する性差を示すことが示され、これらは性差に関する研究に使用可能なことが示唆された。また、ポリアミンの非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に対する効果を調べた研究はこれまでにほとんどなかったが、本研究で、ポリアミンの中でもプトレシンがマウスのNASHを抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present project, we first examined sex difference of representative model mice of nonalcoholic fatty liver disease, and thereafter, we examined effects of three kinds of polyamines on model mice of nonalcoholic steatohepatitis. As a result, sex difference in the hepatic lesion of TSOD and db/db mice showed age-dependent change as in humans, and expression level of FGF21 might be associated with the sex difference. Furthermore, it was suggested that putrescine inhibited NASH in mice.

研究分野：肝臓の病理学

キーワード：ポリアミン 非アルコール性脂肪性肝疾患 非アルコール性脂肪性肝炎 性差

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。**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。単純性脂肪肝から **NASH** への進展には、酸化ストレスや炎症性サイトカインが関与している。肥満の増加に伴い、**NAFLD/NASH** は全世界的に急速に増加しており、先進国では一般人口の **20-30%** が **NAFLD** を、**2-12%** が **NASH** を有していると推測されている。将来的には、**NASH** が肝癌の原因の第一位になるであろうと予測されている。このように、**NASH** の医学的、社会的重要性は非常に高まっている。

これまでの疫学調査で、**NAFLD** の頻度は **50** 歳以前では女性が男性よりも低く、**60** 歳以上では女性は男性と同等あるいはそれ以上であることが報告されている。**NAFLD** の年齢分布は男女で全く異なっている。男性では **30-40** 歳代にピークがあり、**50** 歳以降は減少するのに対し、女性では **50** 歳以降に増加し、**60** 歳代にピークを迎える。年齢に伴うエストロゲンの変化がこのことに関与している可能性が推測されているが、詳細なメカニズムは現在のところ不明である。

これまでに食餌や遺伝子異常による **NAFLD** モデル動物の性差を検討した研究はいくつか行われているが、それらの結果は、雄が優位というもの、雌が優位というもの、性差は認められないというもの、など様々である。これらの研究の大きな問題は経時変化が調べられていないことであり、従ってそこで用いられた動物モデルが **NAFLD** の性差を検討する上で適切なものであったかは定かでない。すなわち、ヒト **NAFLD** にみられる特徴的な年齢分布の性差を反映した動物モデルは現在のところ確立されておらず、それが **NAFLD** の性差のメカニズムを解明する上での障害になっている。

ポリアミンは生物界に存在するアミンで、アミノ基を **3** つ以上持つものを指す。人体が有する代表的なポリアミンとして、スペルミン、スペルミジン、プトレシンが挙げられる。ポリアミンが種々の動物でアンチエイジング効果を発揮し、寿命を延長することが発見されて以降、その注目度は一気に高まり、抗酸化作用、抗炎症作用を有することも明らかにされている。スペルミジンが肝臓の線維化や発癌を抑制することが最近発表された (**Cancer Res 2017; 77: 2938-51**) が、ポリアミンの肝疾患に対する効果を調べた研究は非常に少なく、**NASH** に対する効果を調べた研究はほとんどない。

2. 研究の目的

上記背景に基づき、本プロジェクトでは、まず代表的な **NAFLD** モデルマウスの性差を調べる研究を行い、それに引き続いて **NASH** モデルマウスに対する上記 **3** 種のポリアミンの効果を調べる研究を行った。

(1) **NAFLD** モデルマウスの性差を調べる研究

本研究では、ヒトの **NAFLD** にみられる性差を正確に反映する動物モデルの確立とそのメカニズムの解明を目指した。

上記のように、これまでの疫学調査はヒト **NAFLD** に性差が存在することを示唆しており、**50** 歳以前では女性の頻度が男性よりも低いが、**60** 歳以上では女性の頻度が男性と同等かそれ以上であることが報告されている。しかし、そのメカニズムは解明されていない。メカニズムの解明のためには適切な動物モデルの確立が必要不可欠であるが、これまでにヒト **NAFLD** にみられる性差を正確に反映する動物モデルは確立されていない。

本研究により **NAFLD** の性差のメカニズムが解明されれば、性ホルモン関連物質などによる新しい治療法の開発につながりうる。また、性差を示す他の慢性肝疾患の発生メカニズムの解明や治療法の開発にも結び付く可能性がある。

(2) **NASH** モデルマウスに対するポリアミンの効果を調べる研究

本研究は、ポリアミンが **NASH** の新しい予防・治療ターゲットになりうるか、またその場合、どのポリアミンが最も有効であることを明らかにすることを目的とした。現在のところ **NASH** の予防・治療は食事制限や運動が中心である。しかし、肥満者がそのような生活習慣を維持するのはしばしば困難であるため、薬物治療の開発や予防・治療に効果のある食品の解明が急務になっている。

上記のように、ポリアミンが肝臓の線維化や発癌を抑制することが最近報告され、また抗酸化作用や抗炎症作用を有することから、**NASH** の発症・進展に対するポリアミンの抑制効果が大きいと期待される。しかし、**NASH** に対するポリアミンの効果を調べた研究は現在のところほとんどなく (ポリアミン系アルカロイドの一種であるクコアミン **A** がマウスの肝脂肪化を抑制したとの報告が一報あるのみ)、**NASH** の抑制にはどのポリアミンが最も有効かは現在のところ不明である。

本研究によりポリアミンの **NASH** に対する抑制効果が証明されれば、これまでにない **NASH** に対する食事指導が可能になる。さらには、新しい治療薬や栄養サプリの開発にもつながりうる。またポリアミンは腸内細菌によっても産生されるため、新しいプロバイオティクスの開発にもつながりうる。

3. 研究の方法

(1) NAFLD モデルマウスの性差を調べる研究

動物実験

雄、雌の **Tsumura Suzuki obese diabetes (TSOD)** マウス、**db/db** マウスをそれぞれ **12** 匹用意し、普通食 (**MF**) (オリエンタル酵母工業、東京) と水道水を自由摂取させた。**3** か月、**9** か月齢時にそれぞれ雄 **6** 匹、雌 **6** 匹ずつ屠殺した。屠殺前には **16** 時間絶食させ、尾静脈より採血し、スタットストリップ **900 (Nova Biomedical, Boston, MA, USA)** を使用して血糖値を測定した。また、屠殺前にマウスの体重を測定した。屠殺時に下大静脈から採血し、遠心により血清を分離した。肝臓の重量を測定後、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、トリグリセリド値を日立 **7180** 型自動分析装置 (日立ハイテクノロジーズ、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。インスリン抵抗性の指標である **HOMA-R** は空腹時血糖値 (**mg/dl**) \times 空腹時インスリン値 ($\mu\text{U/ml}$) \div **405** として計算した。

組織学的解析

肝臓の **2** つの大きな葉の中央部を **10%** 中性緩衝ホルマリンで固定し、組織病理学的検討に供した。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 **Image J** を用いて解析した。

リアルタイム RT-PCR

NAFLD モデルマウスの雌雄差のメカニズムを調べるため、肝臓における各種サイトカイン、レセプター、シグナル伝達分子 (**tumor necrosis factor (TNF)- α** 、**interleukin (IL)-6**、**peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α** 、**PPAR γ** 、**MyD88**、**fibroblast growth factor (FGF)21**) の発現解析 (リアルタイム **RT-PCR** 法による) を東京医科大学分子病理学分野 (高梨正勝先生、黒田雅彦先生) に依頼して行った。

統計解析

連続性のデータに関しては、**t** 検定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、**Mann-Whitney** の **U** 検定を行った。

(2) NASH モデルマウスに対するポリアミンの効果を調べる研究

7 週齢、雄の **db/db** マウスを **30** 匹購入した。**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、**1** ケージ **3** 匹);

コントロール群: 普通食 (**MF**)、水道水

CDAHFD 群: **CDAHFD** 食、水道水

スペルミン群: **CDAHFD** 食、**0.4g/L** スペルミン添加水道水

スペルミジン群: **CDAHFD** 食、**0.4g/L** スペルミジン添加水道水

プトレシン群: **CDAHFD** 食、**0.4g/L** プトレシン添加水道水

CDAHFD 食：コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (**A06071302**) (**Research Diets**)。餌、水とも自由摂取させた。餌、水は週 **3** 回交換し、摂食量、飲水量を記録した。体重は毎週測定した。**6** 週間後に全マウスを屠殺した。屠殺時の処置およびその後の実験は基本的に**(1)**と同様に行った。ただし、統計解析は **t** 検定ではなく分散分析を用いた。

4. 研究成果

(1) NAFLD モデルマウスの性差を調べる研究

体重、肝重量

体重は、**TSOD** マウスは **3** か月齢では雄が雌よりも有意に重かったが、**9** か月齢では雌雄間に有意差は見られなかった。**db/db** マウスは **3** か月齢では雌雄間に有意差はなかったが、**9** か月齢では雄が雌よりも有意に重かった。肝重量は、**TSOD** マウスはいずれの屠殺時期でも雄が雌よりも有意に重かった。**db/db** マウスは **3** か月齢では雌雄間に有意差はなかったが、**9** か月齢では雄が雌よりも有意に重かった。肝体重比は、**9** か月齢の **TSOD** マウスでは雄が雌よりも有意に大きかったが、それ以外では雌雄間に有意差は見られなかった。

血清データ

AST 値は、**3** か月齢ではいずれの系統も雄が雌よりも有意に高かった。しかし、**9** か月齢ではいずれの系統も雌雄間に有意差は見られなかった。**ALT** 値は、**3** か月齢では **TSOD** マウスにおいて雄が雌よりも有意に高かった。しかし、**9** か月齢ではいずれの系統も雌雄間に有意差は見られなかった。総コレステロール値は、**3** か月齢では **TSOD** マウスにおいて雄が雌よりも有意に高かった。**9** か月齢ではいずれの系統も雄が雌よりも有意に高かった。トリグリセリド値は、いずれの屠殺時期でも、**TSOD** マウスにおいて雄が雌よりも有意に高かった。血糖値は、**3** か月齢では **db/db** マウスにおいて雄が雌よりも有意に高かった。しかし、**9** か月齢ではいずれの系統も雌が雄よりも有意に高かった。インスリン値は、**3** か月齢では **TSOD** マウスにおいて雄が雌よりも有意に高かった。**9** か月齢ではいずれの系統も雄が雌よりも有意に高かった。アディポネクチン値は、**TSOD** ではいずれの屠殺時期でも雌が雄よりも有意に高かった。しかし、**db/db** マウスでは **3** か月齢で雄が雌よりも有意に高かった。**HOMA-R** 値は、**TSOD** マウスにおいて、いずれの屠殺時期でも雄が雌よりも有意に高かった。

肝組織像

脂肪化の程度は、**db/db** マウスにおいて、**3** か月齢では雄が雌よりも有意に高かったが、**9** か月齢では雌雄間に有意差は見られなかった。雌雄の **TSOD** マウスでは、小葉内や門脈域の炎症は見られたが、脂肪化は目立たなかった。画像解析による小葉内線維化は、**3** か月齢ではいずれの系統も雄が雌よりも有意に高度であった。しかし、**9** か月齢ではいずれの系統も雌雄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

肝組織における **FGF21** の発現レベルは、**3** か月齢では **TSOD** マウスにおいて雌が雄よりも有意に高かった。**9** か月齢では、いずれの系統も雌が雄よりも有意に高かった。**Myd88**、**PPAR α** 、**PPAR γ** の発現レベルは、いずれの系統および屠殺時期においても雌雄間に有意差は見られなかった。**TNF- α** 、**IL-6** の発現は検出感度以下であった。

以上の結果から、**TSOD** マウスや **db/db** マウスの肝病変の性差は、ヒトに類似する経時的変化を示すと考えられ、**FGF21** の発現レベルが雌雄差に関与している可能性が示唆された。

(2) NASH モデルマウスに対するポリアミンの効果調べる研究

摂食・飲水量

摂食量および摂取カロリーは、**CDAHFD** 群はコントロール群よりも有意に少なく、プトレシン群は **CDAHFD** 群よりも有意に多かった。飲水量は、**CDAHFD** 群はコントロール群よりも有意に少なく、スペルミジン群は **CDAHFD** 群よりも有意に多かった。

体重、肝重量

体重および肝重量は、**CDAHFD** 群はコントロール群よりも有意に重かったが、ポリアミン投与による有意な効果は見られなかった。肝体重比に関しては、各群間で有意差は見られなかった。

血清データ

AST 値は、**CDAHFD** 群はコントロール群よりも有意に高く、プトレシン群は **CDAHFD** 群よ

りも低い傾向が見られた。**ALT** 値は、**CDAHFD** 群はコントロール群よりも有意に高かった。プトレシン群は **CDAHFD** 群よりも低く、コントロール群と合わせた **3** 群の実験とした場合、その差は統計学的に有意であった。総コレステロール値は、**CDAHFD** 群はコントロール群よりも有意に高かったが、ポリアミン投与による有意な効果は見られなかった。トリグリセリド値は、各群間に有意差はないが、**CDAHFD** 群はコントロール群よりも低く、プトレシン群は **CDAHFD** 群よりもさらに低い傾向が見られた。血糖値は、**CDAHFD** 群はコントロール群よりも有意に低かったが、ポリアミン投与による有意な効果は見られなかった。

以上の結果から、**3** 種類のポリアミンの中でもプトレシンがマウスの **NASH** を抑制する可能性が考えられた。現在、組織病理学的解析および分子的解析を進めているところである。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Y, Watabe S, Togashi-Kumagai A, Watanabe M, Dungubat E, Kusano H, Kobayashi Y, Harada N, Yamaji R, Sugimoto K, Fukusato T	4. 巻 87
2. 論文標題 Effects of low ethanol consumption on nonalcoholic steatohepatitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Alcohol	6. 最初と最後の頁 51-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alcohol.2020.04.004	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 該当する

1. 著者名 Dungubat E, Watabe S, Togashi-Kumagai A, Watanabe M, Kobayashi Y, Harada N, Yamaji R, Fukusato T, Lodon G, Sevjid B, Takahashi Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of caffeine and chlorogenic acid on nonalcoholic steatohepatitis in mice induced by choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12123886	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 エルデネットオグト ドゥングバト、俵 博祐、須藤光子、大藏直樹、高梨正勝、黒田雅彦、福里利夫、高橋芳久
2. 発表標題 遺伝・栄養の組合せによる非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスの性差の検討
3. 学会等名 第9回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋芳久、福里利夫
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスにおける少量エタノール投与の炎症抑制効果
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋芳久、渡部朱織、熊谷有紗、渡邊雅人、福里利夫
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスにおける少量エタノール投与の効果
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 エルデネツォグト・ドゥングバト、田沢秀憲、須藤光子、大藏直樹、福里利夫、高橋芳久
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスの性差に関する研究
3. 学会等名 第8回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋芳久、エルデネツォグト・ドゥングバト、福里利夫
2. 発表標題 動物モデルを用いた非アルコール性脂肪性肝疾患の新しい予防・治療法開発研究
3. 学会等名 第42回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 エルデネツォグト・ドゥングバト、渡部朱織、富樫有紗、渡邊雅人、福里利夫、高橋芳久
2. 発表標題 カフェインやクロロゲン酸の非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスに対する効果
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 エルデネツォグト・ドゥングバト、福里利夫、高橋芳久
2. 発表標題 代表的コーヒー成分の非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスに対する効果
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 エルデネツォグト・ドゥングバト、俵 博祐、須藤光子、大藏直樹、高梨正勝、黒田雅彦、有働恵美子、早田正和、福里利夫、高橋芳久
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスの性差
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takahashi Y, Sugimoto K, Soejima Y, Kumagai A, Koeda T, Shojo A, Nakagawa K, Harada N, Yamaji R, Inui H, Yamanouchi T, Fukusato T	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Vide Leaf	5. 総ページ数 22
3. 書名 Prime Archives in Biomedical Sciences	

1. 著者名 Dungubat E, Watabe S, Togashi-Kumagai A, Watanabe M, Kobayashi Y, Harada N, Yamaji R, Fukusato T, Lodon G, Sevjid B, Takahashi Y	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Vide Leaf	5. 総ページ数 32
3. 書名 Prime Archives in Nutrition	

〔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
連携研究者	福里 利夫 (Fukusato Toshio) (50134531)	帝京大学・医療共通教育研究センター・教授 (32643)	
連携研究者	富田 裕彦 (Tomita Yasuhiko) (60263266)	国際医療福祉大学・医学部・教授 (32206)	
連携研究者	潮見 隆之 (Shiomi Takayuki) (80348797)	国際医療福祉大学・医学部・教授 (32206)	

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