

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590141

研究課題名（和文） NADPH オキシダーゼ阻害剤による NASH の抗酸化療法の開発研究

研究課題名（英文） Development of anti-oxidizing therapy of NASH using inhibitors of NADPH oxidase

研究代表者

宮本 謙一 (MIYAMOTO KEN-ICHI)

金沢大学・附属病院・教授

研究者番号：30100514

研究成果の概要（和文）：酪酸は、AMPK の活性化と HDAC 阻害作用を併せもち脂肪酸 β 酸化経路を活性化させることにより肝臓の脂質代謝を改善する可能性が示唆された。Salacia reticulata は血清中 adiponectin を上昇させ脂肪分解を亢進することで抗肥満効果を示すことが示唆された。葛花抽出物は肝臓および褐色脂肪に作用して抗肥満効果を示すことが示唆された。これらの結果は、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態解明と治療法の確立に寄与する重要な知見と考えられた。

研究成果の概要（英文）：It is suggested that butyric acid activates AMP-activated protein kinase (AMPK) and inhibits histone deacetylase (HDAC) thereby improves lipid metabolism in the liver by activating lipid β -oxidation. *S. reticulata* extract exhibited anti-obesity effect by increasing serum adiponectin and enhancing lipid metabolism. *P. flos* extract exhibited anti-obesity effect through an action on the liver and brown fat cell. These findings may facilitate clarification and treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：NASH、NADPH オキシダーゼ、酸化ストレス、炎症、肝線維化

1. 研究開始当初の背景

肥満者と非肥満者では腸内に生息する細菌叢 (flora) が異なることが報告され、flora と肥満形成の関連性が注目されている。Flora は、小腸における食物の消化・吸収を担うのみならず、大腸においては糖質や食物繊維の発酵により短鎖脂肪酸 (short chain fatty acid: SCFA) を産生する。SCFA は、

炭素数 6 以下の飽和モノカルボン酸であり、嫌気性条件下の腸上皮細胞において重要なエネルギー源である。以前より、SCFA は、腸内 pH 低下による病原性細菌の増殖抑制作用、および電解質吸収促進作用などの生理作用を有することが分かっている。また最近では、エネルギー代謝に関する報告も増えつつあり、酢酸の大量摂取が、KK-A (y) マウス

の肥満・糖代謝異常を改善させること、酪酸の大量摂取が、高脂肪食誘導性肥満マウスの褐色脂肪組織、および骨格筋における脂肪燃焼を促進させ、肥満・インスリン抵抗性を改善することが報告されている。Flora を有さない無菌マウスに『肥満 ob/ob マウス由来の flora』を移植した場合と『やせ型 wild type マウス由来の flora』を移植した場合を比較すると、『肥満 ob/ob マウス由来の flora』を移植したマウスの方が有意な体重増加を示すことから、flora の差が単に肥満の結果として生じているのではなく、肥満形成の原因となる可能性を示唆している。

近年、生活習慣病としてのメタボリックシンドロームの一病態として非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が注目され、脂肪肝炎の病態解明と治療法を確立が急務となっている。これに対して、研究代表者らは脂肪肝炎の病態では注目されていなかった NADPH オキシダーゼ (NOX) 複合体由来の活性酸素種 (ROS) が脂肪肝炎を進展させる可能性を示唆してきた。

2. 研究の目的

研究代表者らは、flora により産生される SCFA が糖・脂質代謝に何らかの影響を与えており、flora と肥満形成をつなぐ因子となっているのではないかと考えた。それまで、酢酸および酪酸がそれぞれ肥満マウスの肝臓や骨格筋において AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化させることで、肥満の改善に関与することが報告されていた。しかしながら、AMPK を活性化させるメカニズムや、脂質代謝の中心臓器である肝臓における各 SCFA の直接作用を比較検討した報告はなく未だ不明な点が多い。そこで本研究は、培養肝細胞を用いて肝臓の脂肪酸β酸化に与える SCFA の影響を明らかにすることを目的とした。

一方、本研究の過程で、スリランカの伝統医学であるアーユルヴェーダにおいて糖尿病の初期治療や自覚症状の緩和に用いられた生薬である *Salacia reticulata* (SR) が、糖尿病や脂質異常症、高血圧などを複数合併する自然発症肥満 2 型糖尿病モデルマウスである Tsumur, Suzuki, Obese Diabete (TSOD) マウスおよび対照群として代謝性疾患病態を示さない Tsumura, Suzuki, Non Obesity (TSNO) マウスを用いて、体重増加抑制、内臓脂肪および皮下脂肪蓄積抑制、インスリン抵抗性改善、血圧上昇抑制、糖・脂質代謝異常改善作用などが示唆する予備的データが得られ、SR が内臓脂肪の蓄積による肥満をはじめ、高血圧や糖・脂質異常症を複数合併するメタボリックシンドロームの予防に対

し有用であることが示唆された。また、中国原産の葛の花部を抽出した生薬で、古くから酒毒を消す目的で二日酔いの予防や治療に民間薬として用いられてきた葛花 (*Puerariae Flos*) が脂質異常症改善効果や肝保護作用など新しい効果を示すこと、またその活性成分としてイソフラボンのダイゼインやサポニンのカッカサポニンなどが関与することが報告された。さらに、高脂肪食を負荷した ICR マウスに *Puerariae Thomsonii* の葛花を自由摂取させたところ、内臓脂肪蓄積減少や肝中脂質減少など代謝性疾患の基盤となる病態に効果があることが報告された。そこで、TSOD マウスおよび対照群として TSNO マウスを用い、*Salacia reticulata* 抽出物 (SRE) および葛花抽出物 (PTE) の代謝性疾患に対する多面的効果の検討を行い肥満症や種々のメタボリックシンドローム病態に対する治療効果に注目し、既に肥満病態を発症している TSOD マウスを用い検討するとともに、肥満治療効果のメカニズムの解明を目的として TSOD マウスの腸管膜周囲脂肪組織および 3T3-L1 成熟脂肪細胞に対する SRE の効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 5 種類の SCFA (酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 吉草酸, カプロン酸) をラット培養肝細胞株 H4-ii-E-C3 にオレイン酸とともに処置しオレイン酸により誘導される細胞内トリグリセリド (Triglyceride : TG) の蓄積と、脂質代謝系遺伝子群の発現レベルに対する SCFA の影響を比較検討した。

(2) 酪酸による AMPK の活性化を AMPK α および AMPK の下流に位置する acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化体のウエスタンブロット法で評価した。

(3) 酪酸による AMPK 活性化が脂肪酸β酸化系遺伝子の mRNA 発現に与える影響を AMPK 阻害剤 (Compound C) を用いて検討した。

(4) 酪酸の有するヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase : HDAC) 阻害作用が脂肪酸β酸化系遺伝子の mRNA 発現に与える影響をヒストンアセチル基転移酵素 (histone acetyltransferase : HAT) 阻害剤 (Garcinol) を用いて検討した。

(5) 高脂肪食誘導性肥満ラットに酪酸菌製剤を 14 週間摂取させた。経時的に体重、摂食量を測定し、飼育開始 10 週後に糖負荷試験、14 週後に、血中脂質パラメーター、ならびに肝臓中脂質量の測定、肝臓の遺伝子発現解析を行い酪酸菌の効果を検討した。

(6) TSOD マウスおよび対照マウス (TSNO マウス) を通常食および高脂肪食で飼育し、*Salacia reticulata* 抽出物 (SRE) および葛

の花抽出物 (PTE) をそれぞれ 1~2 ヶ月間投与後の体重および各組織重量、リアルタイム PCR やウエスタンブロットによる各組織の遺伝子発現の評価と血液検査を行った。

(7) 脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞に Insulin、Dexamethazone および

3-isobutyl-1-methylxanthine の分化誘導剤を処置し 8 日間培養することにより成熟脂肪細胞作成し、SRE 処置後の細胞内脂肪滴含量、各種脂質代謝関連遺伝子、タンパク質発現および TG の加水分解物である培養上清中グリセロール量を測定した。

4. 研究成果

(1) 5 種類の SCFA のうち、酪酸がオレイン酸による細胞内 TG の蓄積を最も減少させ、peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) をはじめとする脂肪酸 β 酸化系遺伝子群の mRNA 発現を包括的に上昇させた。そこで、以降は、酪酸と脂肪酸 β 酸化に着目し、実験を進めた。

(2) 酪酸による脂肪酸 β 酸化系遺伝子群の発現増加メカニズムを明らかにするため、脂肪酸 β 酸化の重要な調節因子として知られている AMPK の活性化に与える酪酸の影響を検討した結果、酪酸の処置後 6 時間において、AMPK α と ACC のリン酸化体が無処置群に比して約 1.3 倍増加し、酪酸が AMPK を活性化させることが明らかとなった。また、AMPK 阻害剤は、酪酸による AMPK α のリン酸化と PPAR α の mRNA 発現の増加を濃度依存的に抑制し、酪酸が AMPK 活性化を介して PPAR α の発現を増加させることを新たに見出した。

(3) 酪酸は HDAC 阻害剤として汎用されていることから、酪酸による HDAC 阻害作用が脂肪酸 β 酸化系遺伝子群の mRNA 発現の増加に与える影響を検討した。Garcinol は、酪酸によるヒストンのアセチル化レベルと PPAR α の mRNA 発現の増加を濃度依存的に抑制し、酪酸が HDAC 阻害作用を介して PPAR α の発現を増加させることを見出した。以上の結果より、培養肝細胞において、酪酸が AMPK の活性化と HDAC 阻害作用を介して脂肪酸 β 酸化系遺伝子群の発現を増加し、脂肪酸 β 酸化を亢進させることを明らかとした。

(4) 高脂肪食誘導性肥満ラットに酪酸菌製剤を 14 週間摂取させたところ、体重、摂食量の増加には影響はなかったが、血中 TG、肝臓中 TG、および non-esterified fatty acid (NEFA) の増加が有意に抑制された。一方、酪酸菌製剤は肝臓における脂質代謝系遺伝子群の mRNA 発現に変化を与えなかった。以上より、酪酸菌製剤は高脂肪食誘導性肥満ラットの脂肪肝形成を抑制することを明らかにした。

(5) TSOD マウスの腸管膜脂肪において、SRE は TG の加水分解を担うホルモン感性リパーゼ HSL と adiponectin の遺伝子発現を有意に増加させ血清中 adiponectin 濃度も有意に増加させた。

(6) PTE は、高脂肪食接種群と比較し体重増加抑制作用、内臓脂肪蓄積抑制作用、肝肥大抑制作用、耐糖能異常改善作用を示し、脂肪肝を顕著に抑制した。また、褐色脂肪組織の活性化も認められた。

(7) 3T3-L1 細胞では、細胞内 TG 蓄積量が SRE の濃度依存的に減少し、100 μ g/mL で無処置群に比して約 30% 低下を示した。この時、脂肪細胞分化を制御する転写因子 PPAR γ の mRNA、およびタンパク発現量は共に約 60% 低下した。更に PPAR γ の標的遺伝子の mRNA 発現量も有意に低下していた。一方上清中グリセロール量は約 40% 増加しており、HSL mRNA およびタンパク発現量も有意に増加しており加水分解の亢進が示唆された。

以上、酪酸は、脂肪酸 β 酸化経路を活性化させることにより肝臓の脂質代謝を改善する可能性が示唆された。AMPK の活性化と HDAC 阻害作用を併せもつ酪酸のメタボリックシンドロームの治療・予防への応用が期待される。SRE は血清中 adiponectin を上昇させ加水分解を亢進することで肥満治療効果を示すことが示唆された。PTE は肝臓および褐色脂肪に作用して抗肥満効果を示すことが示唆された。これらの結果は、脂肪肝の治療法確立に寄与する重要な知見と考えられる。

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 8 件)

- ① Salacia reticulata inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Tsutomu Shimada, Eiichi Nagai, Yukiko Hirasawa, Michiru Watanabe, Kenichi Negishi, Tomoko Akase, Yoshimichi Sai, Ken-ichi Miyamoto, Masaki Aburada. J. Ethnopharmacol., (2011), in press 査読有
- ② Preventive effects of Salacia reticulata on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in monosodium glutamate treated mice. Michiru Watanabe, Tsutomu Shimada, Seiichi Iiduka, Nanae Iida, Kazuko Kojima, Junko Ishizaki, Ken-ichi Miyamoto, Masaaki Aburada. J. Trad. Med., 28(2), 73-82 (2011) 査読有

- ③ Preventive effect of pine bark extract (flavangenol) on metabolic disease in Western diet-loaded TSOD mice. Tsutomu Shimada, Mitsutaka Kosugi, Daisuke Tokuhara, Masahito Tsubata, Tomoyasu Kamiya, Mayu Sameshima, Roka Nagamine, Kinya Takagaki, Ken-ichi Miyamoto, Masaki Aburada. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, doi:10.1093/ecam/nep231 (2011) 査読有
- ④ A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. Hirofumi Misu, Toshinari Takamura, Hiroaki Takayama, Hiroto Hayashi, Naoto Matsuzawa-Nagata, Seiichiro Kurita, Kazuhide Ishikura, Hitoshi Ando, Yumie Takeshita, Tsuguhito Ota, Masaru Sakurai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Taro Yamashita, Masao Honda, Ken-ichi Miyamoto, Tetsuya Kubota, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Han-Jong Kim, In-kyu Lee, Yasuhiko Minokoshi, Yoshiro Saito, Kazuhiko Takahashi, Yoshihiro Yamada, Nobuyuki Takakura, and Shuichi Kaneko. Cell Metabolism, 12, 483-495 (2010). 査読有
- ⑤ Metabolic disease prevention and suppression of fat accumulation by salacia reticulata. Tsutomu Shimada, Eiichi Nagai, Yukiko Harasawa, Takashi Aburada, Seiichi Iizuka, Ken-ichi Miyamoto, Masaki Aburada. J. Nat. Med., 64(3), 266-274 (2010). 査読有
- ⑥ Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. Yoshiyuki Sasaki, Wataru Suzuki, Tsutomu Shimada, Seiichi Iizuka, Satoko Nakamura, Mitsunobu Nagata, Makoto Fujimoto, Koichi Tsuneyama, Ryoji Hokao, Ken-ichi Miyamoto, Masaki Aburada. Life Sci., 85 (13-14), 490-498 (2009) 査読有
- ⑦ Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. Seiji Nakamura, Toshinari Takamura, Naoto Matsuzawa-Nagata, Hirofumi Misu, Hiroyo Noda, Satoko Nabemoto, Seiichiro Kurita, Hitoshi Ando, Ken-ichi Miyamoto, Shuichi Kaneko. J. Biol. Chem., 284(22), 14809-14818 (2009) 査読有
- ⑧ Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. Naoto Matsuzawa-Nagata, Toshinari Takamura, Hitoshi Ando, Seiji Nakamura, Seiichiro Kurita, Hirofumi Misu, Tsuguhito Ota, Masayoshi Yokoyama, Masao Honda, Ken-ichi Miyamoto, Shuichi Kaneko. Metabolism, 57, 1071-1077 (2008) 査読有
- [学会発表] (計 18 件)
- ① Salacia reticulata の肥満治療効果ならびに作用機序の解明. 中山裕一郎、嶋田 努、渡邊美智留、永井榮一、崔 吉道、油田正樹、宮本謙一. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、静岡県コンベンションアーツセンター (静岡県)
- ② 高脂肪食負荷 TSOD マウスに対する葛の花エキスの代謝性疾患改善効果. 久保光志、嶋田 努、神谷智康、高垣欣也、斉藤昌之、油田正樹、宮本謙一. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡県コンベンションアーツセンター (静岡県)
- ③ CCR5 ablation prevents insulin resistance by high-fat feeding or leptin deficiency. Kazuki Sawamoto, Tsuguhito Ota, Hironori Kitade, Hiroshi Inoue, Toshinari Takamura, Ken-ichi Miyamoto, Naofumi Mukaida, Shuichi Kaneko. Biochemistry and Molecular Biology 2010、2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ④ インスリン抵抗性の形成におけるケモカインレセプター CCR 5 の役割. 太田嗣人、北出紘規、澤本一樹、井上 啓、篁 俊成、宮本謙一、向田直史、金子周一. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010 年 5 月 27 日、岡山コンベンションセンター (岡山県)
- ⑤ 小胞体ストレスは STAT3 依存性の肝糖新生酵素発現抑制を阻害する. 井上 啓、山田智子、松本道宏、太田嗣人、宮本謙一、金子周一、春日雅人. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010 年 5 月 27 日、岡山コンベンションセンター (岡山県)

- ⑥ 酪酸は AMP キナーゼ活性化を介して脂肪酸・酸化系遺伝子の発現レベルを上昇させる (講演ハイライトに選抜「腸内細菌が作り出す酪酸は、メタボで苦しむ人々の味方か!？」) 中川ゆうみ、長田直人、澤本一樹、崔 吉道、宮本謙一。日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、就実大学 (岡山県)
- ⑦ インスリン抵抗性形成におけるケモカインレセプター CCR5 の役割。北出紘規、太田嗣人、澤本一樹、井上 啓、崔 吉道、篁 俊成、向田直史、金子周一、宮本謙一。日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、就実大学 (岡山県)
- ⑧ 3T3-L1 成熟脂肪細胞の脂質代謝に及ぼす *Salacia reticulata* エキスの効果。中山裕一郎、嶋田 努、永井榮一、長田直人、崔 吉道、油田正樹、宮本謙一。日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、就実大学 (岡山県)
- ⑨ 葛花抽出物の肝臓に対する作用メカニズムの解明。酒井涼一、嶋田 努、油田正樹、宮本謙一。日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、就実大学 (岡山県)
- ⑩ STAT3 依存性糖新生調節における小胞体ストレスの役割の解明。山田智子、井上啓、崔 吉道、松本道宏、太田嗣人、金子周一、春日雅人、宮本謙一。日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、就実大学 (岡山県)
- ⑪ 肥満によるインスリン抵抗性の形成におけるケモカインレセプター CCR5 の役割。北出紘規、太田嗣人、澤本一樹、井上 啓、篁 俊成、向田直史、宮本謙一、金子周一。第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑫ セレノプロテイン P は肝 AMPK 抑制を介してインスリン抵抗性を改善する。毛利研祐、御簾博文、高山浩昭、長田直人、前田雅之、北出紘規、太田嗣人、宮本謙一、箕越靖彦、金子周一、篁 俊成。第 52 回日本糖尿病学会年次学術大会、2009 年 5 月 25 日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑬ 肝臓由来インスリン抵抗性誘導ホルモンセレノプロテイン P の同定。御簾博文、篁 俊成、長田直人、栗田征一郎、清水暁子、太田嗣人、山田賢裕、高倉伸幸、宮本謙一、金子周一。第 52 回日本糖尿病学会年次学術大会、2009 年 5 月 25 日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑭ ヘパトカイン標的療法によるインスリン抵抗性治療の可能性。乙田敏城、御簾博文、石倉和秀、長田直人、野田浩代、松本優香子、宮本謙一、金子周一、篁 俊成。第 52 回日本糖尿病学会年次学術大会、2009 年 5 月 25 日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑮ 腸・肝臓ネットワークのリンク：腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸による AMP キナーゼ活性化。中川ゆうみ、長田直人、澤本一樹、太田嗣人、横山将嘉、熊崎雅史、北出紘規、高倉伸幸、松本優香子、野田浩代、御簾博文、篁 俊成、金子周一、宮本謙一。第 52 回日本糖尿病学会年次学術大会、2009 年 5 月 25 日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑯ メタボリックシンドローム諸症状を発症する病態動物 (TSOD マウス) に対する *Salacia reticulata* の効果。原沢友紀子、嶋田 努、福本 慈、永井榮一、赤瀬智子、宮本謙一、油田正樹。第 25 回和漢医薬学会学術大会、2008 年 8 月 30 日 (大阪府)

[その他]

ホームページ等

<http://web.hosp.kanazawa-u.ac.jp/bu/yaku/>

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/lab/byouin.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 謙一 (MIYAMOTO KEN-ICHI)

金沢大学・附属病院・教授

研究者番号：30100514