

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790131
 研究課題名（和文） 脂肪肝炎の新規治療法の開発-酪酸菌のプロバイオティクス効果の検討
 研究課題名（英文） Development of new therapy of steatohepatitis by Clostridium Butyricum
 研究代表者
 長田 直人（NAGATA NAOTO）
 金沢大学・薬学系・助教
 研究者番号：70456408

研究成果の概要(和文):高コレステロール食によって作成した脂肪肝炎モデルマウスに対して、酪酸菌製剤の投与した。投与後、4、8、16、および32週のいずれの時点においても肝臓では脂肪蓄積、炎症、および線維化のいずれもが抑制されていた。今回の研究において、酪酸がAMP activated protein kinase (AMPK) を活性化させること、および酪酸がヒストンのアセチル化を促進させることにより脂肪酸β酸化系遺伝子の発現を上昇させることを培養細胞を用いて新たに見出した。酪酸菌製剤は、高コレステロール食によって誘導される脂肪肝炎を改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文):We tested to treat atherogenic-diet (high cholesterol diet) induced steatohepatitis in mice by Clostridium Butyricum. After 4, 8, 16, and 32 weeks treatment, the atherogenic diet-induced steatosis, inflammation, and fibrosis were improved in the mice liver. We demonstrated that butyrate up-regulates fatty acid beta oxidation via activation AMP activated protein kinase and histone acetylation *in vitro*. Clostridium Butyricum may improve non-alcoholic steatohepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：脂肪肝炎、薬物療法、脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝は長らく良性の疾患として認識されてきたが、脂肪肝のなかには、アルコール多飲歴が無いにも関わらず、炎症と線維化

が惹起され、肝硬変・肝がんにまで進展するNASHの症例が存在することが明らかにされた (Mayo Clin Proc 1980, 55:434). 現在、日本人成人の20～30% (約2～3000万

人)は脂肪肝であり、そのうち約10%(約200~300万人)がNASHであると推定されている。さらに、過食や運動不足等の生活習慣を背景として、脂肪肝は年々増加しており、今後NASHからの肝硬変・肝がんの増加が懸念されるため、NASHの治療法開発は急務である。しかし、これまでにNASH患者に対して、糖尿病治療薬(Lancet 2001, 358:893)、高脂血症治療薬(Lancet 1999, 353:1802)などによる薬物療法が試みられたが、十分な有効性と安全性は得られておらず、治療法は未だに確立されていない。

そこで、申請者は、モデル動物を用いた更なる基礎研究が必要であると考え、C57BL/6Jマウスを高脂肪・高コレステロール食で飼育することにより、NASHモデルマウスを独自に作出した。このマウスは、食餌のみで高率に重篤な脂肪肝が誘導され、発がんまで至ることから、病態の解析や治療薬の探索に非常に有用であると考えている。

今回の研究では、このマウスにおいて酪酸菌製剤の効果を検討した。酪酸菌製剤の病原性腸内細菌を減少させる作用と肝臓における酪酸の作用により、肝臓の炎症だけでなく、NASHの前段階である脂肪蓄積をも改善させる可能性がある。以上より、酪酸菌製剤の治療応用の可能性を検討する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

腸内細菌を標的とした新たな脂肪肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)の治療法の開発を目指して、脂肪肝炎マウスモデルで酪酸菌製剤の効果を検討すること。また、脂質代謝に与える酪酸の影響を培養肝細胞で検討し、その分子メカニズムを解明すること。

3. 研究の方法

(動物実験)

8週齢雌性C57BL/6Jマウスを高コレステロール食、または高コレステロール+酪酸菌食下で最長32週間飼育し、経時的に肝病理像を比較検討した。

(培養細胞実験)

酪酸の直接作用を検討するために、肝細胞株H4-II-EC3を酪酸存在下で培養し、脂質代謝関連遺伝子群のmRNA発現レベル、AMPキナーゼの活性化、ヒストンアセチル化レベル、および脂肪酸β酸化活性を検討した。

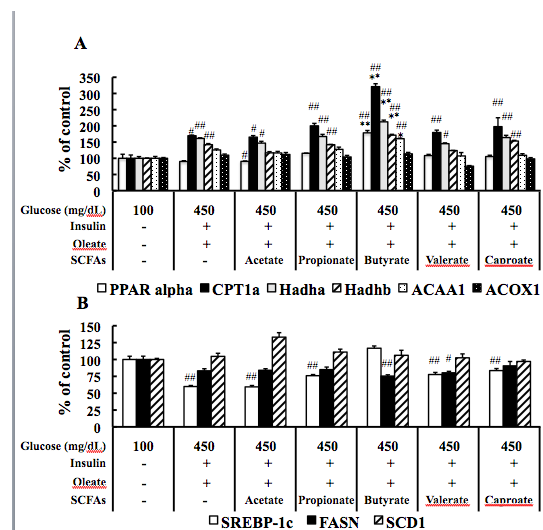
4. 研究成果

酪酸菌製剤投与後、4、8、16、および32週の時点で血液、肝臓、白色脂肪組織、および褐色脂肪組織を採取した。HE染色により肝組織像を評価したところ、肝臓では酪酸菌製剤によって、脂肪蓄積、炎症、および線

維化のいずれもが抑制されていた。また、血中のコレステロールレベルも有意に低下していた。今後、酪酸菌製剤の作用メカニズムを明らかにするために、DNAマイクロアレイを用いた包括的な発現遺伝子解析を行う予定である。

また、培養肝細胞を用いて、肝臓の脂質代謝系遺伝子群のmRNA発現に及ぼす酪酸の直接作用を検討した。その結果、5種類(酢酸・プロピオン酸・酪酸・カプロン酸・吉草酸)の短鎖脂肪酸のうち、酪酸が最も強く脂肪酸β酸化系遺伝子群のmRNA発現を上昇させた。

(図1参照)



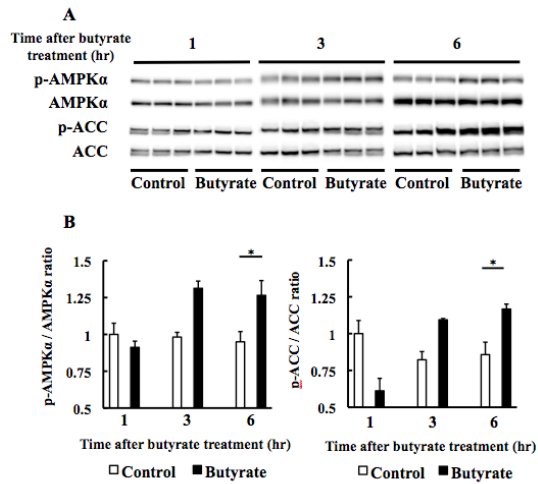
(図1) 短鎖脂肪酸と脂質代謝関連遺伝子群のmRNA発現- (A) 脂肪酸β酸化関連遺伝子。

(B) 脂肪酸合成系遺伝子。酪酸は、脂肪酸合成系遺伝子の発現にはほとんど影響を与えず、脂肪酸β酸化系遺伝子のmRNA発現を上昇させた。

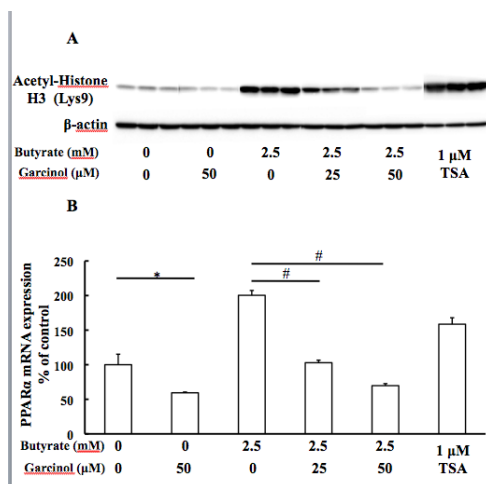
次に、脂肪酸β酸化を調節する細胞内エネルギーセンサーであるAMP activated protein kinase (AMPK)の活性化に与える酪酸の影響を培養肝細胞において、検討した。

酪酸は、処置後6時間において、AMPKを活性化させることを見いだした。また、この活性化は、ヒストンのアセチル化を阻害するGarcinolによって解除された。また、ヒストンアセチル化レベルの変化に伴い、脂肪酸β酸化遺伝子であるPPARαの発現レベルも変化することが示された。

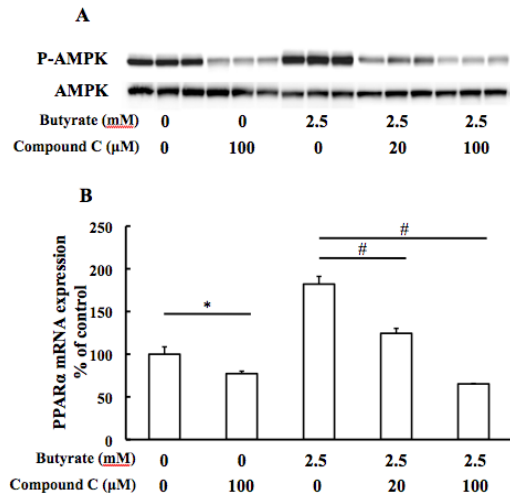
以上のことから酪酸が有するヒストンアセチル化促進作用がAMPKの活性化に深く関与していることが示された。(図2、図3、図4参照)



(図2) 酪酸とAMPKの活性化の関係
 (A) AMPK活性化の指標として、AMPKα、およびAcetyl-CoA carboxylaseのリン酸化体をWestern blottingにより検出した。(B)イメージ解析ソフトウェアImage Jによりバンド強度を定量した。



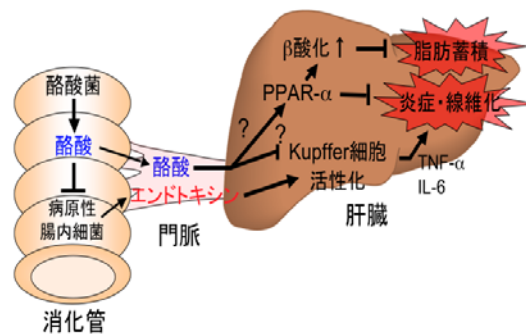
(図3) ヒストンのアセチル化レベルと PPARαのmRNA発現
 (A) Acetyl-histone H3をWestern blottingにより、検出した。Trichostatin A (TSA) は、酪酸と同様にヒストンアセチル化を促進することが知られている化合物であり、陽性コントロールとして用いた。Garcinolは濃度依存的に酪酸によるヒストンアセチル化を解除した。ヒストンアセチル化レベルの変化に伴って、脂肪酸β酸化系遺伝子の一つである PPARαの発現レベルも変化した。



(図4) AMPK 活性化レベルと PPARαの mRNA 発現

(A) AMPK 阻害剤である Compound C は、酪酸による AMPK の活性化を濃度依存的に解除した。AMPK 活性化レベルの変化に伴って、脂肪酸β酸化系遺伝子の一つである PPARα の発現レベルも変化した。

本研究により、酪酸、および酪酸菌製剤が、脂肪酸燃焼を促進する可能性が示された。酪酸菌製剤は、古くから臨床で整腸剤として使用されている薬剤であることから、十分な安全性が確認されており、NASH 治療への臨床応用が期待される。今後は、更なる作用メカニズムの解明を目指して、肝臓の炎症を引き起こすマクロファージへの酪酸の効果を検討していきたいと考えている。(図5参照)



(図5) 想定される酪酸菌製剤の作用メカニズム- 酪酸は、腸内において、病原性腸内細菌を減少させることが知られている。また、今回、酪酸菌製剤が、脂肪肝モデルマウスの肝病理像を改善したことから、酪酸が門脈血中に移行し、肝臓において、有益な効果を示している可能性が考えられる。

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)

[学会発表] (計1件)

1. 腸内細菌由来の生理活性物質である短鎖脂肪酸は AMP キナーゼを活性化させる、 中川ゆうみ、長田直人、澤本一樹、太田嗣人、横山将嘉、高山浩昭、熊崎雅史、野田浩代、北出紘規、松本優香子、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集会
2009年5月22日、ホテルNCB、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 直人 (NAGATA NAOTO)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：70456408

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし