

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11567

研究課題名（和文）食事因子のみで非アルコール性脂肪肝炎から肝癌へ進行するモデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of a model for progression from non-alcoholic steatohepatitis (NASH) to hepatocellular carcinoma induced by dietary factors alone

研究代表者

北森 一哉 (ktiamori, kazuya)

金城学院大学・生活環境学部・教授

研究者番号：80387597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：食事因子のみでNASHから肝癌へ進行するモデルは広く望まれている。そこで、本研究は、「食事因子のみで非アルコール性脂肪肝炎（NASH）から肝癌へ進行するモデルの確立」を目的とした。高脂肪・高コレステロール飼料（HFC）飼料でNASHを惹起するSHRSP5/Dmcrに鉄を24週間摂取させた。その結果、鉄の摂取は肝臓の炎症の進行を確認した。しかし、肝臓障害は軽度であり、肝癌への進行は認められなかった。長期間の摂餌に耐えるため、8週間摂取で炎症が認められる1/2HFCをベース飼料としていた。肝障害が重症化しなかった原因は、HFC濃度が低い場合、肝障害は経時的に進行しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食事因子のみで非アルコール性脂肪性肝炎から肝癌へ進行するモデルは存在しない。疾病の予防や治療の研究にはモデルが必要である。今回の研究で、鉄の摂取は肝臓の炎症を重症化することが示唆された。また、HFC飼料濃度が低い場合、短期間では肝障害が発症しても、長期的では肝障害が重症化しないことが示唆された。モデル作成の一助となる知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Models of progression from NASH to hepatocellular carcinoma by dietary factors alone are widely desired. Therefore, the aim of this study was to “Establishment of a model for progression from non-alcoholic steatohepatitis (NASH) to hepatocellular carcinoma induced by dietary factors alone”. SHRSP5/Dmcr, which induces NASH in high-fat, high-cholesterol (HFC) diets, were fed iron for 24 weeks. The results showed that iron intake confirmed the progression of liver inflammation. However, liver damage was mild and did not progress to liver cancer. To tolerate long-term feeding, the base diet was 1/2 HFC, which showed inflammation after 8 weeks of consumption. It was suggested that liver damage did not progress over time at low HFC concentrations, which could be the cause of the less severe liver damage.

研究分野：栄養学

キーワード：食事因子 NASH 肝癌 SHRSP5/Dmcr

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- 1) 臨床医療現場で、肝癌の原因として非肥満型非アルコール性脂肪肝炎(NASH)が増えており、今後ますます増加することが推測されている。我々は、高脂肪・高コレステロール(HFC)飼料の摂取期間を変えるだけで肝臓の脂肪沈着・炎症・肝細胞肥大に加え、重度線維化へ進行する、非肥満型 NASH モデルラット (SHRSP5/Dmcr) を作製してきた。その後、経時変化、性差、NASH 肝病変進展メカニズム、食事療法など、明らかにしてきた。優れたモデルとして、多くの方々に興味を示していただく中で、食事因子のみで NASH から癌に進行するモデルが広く望まれていることを知った。しかし、そのようなモデルは存在しない。疾病をなくすための病態進行予防や治療の研究には、病態の再現(疾患モデル)が必要である。
- 2) 1/2HFC 飼料 8 週間摂餌群では、軽度な肝機能障害が認められている。本研究は、摂餌期間が 24 週間の長期間であるため、8 週間摂取時の肝機能障害がさらに進行することを推測して飼料の濃度を設定した。しかし、1/2HFC 飼料摂餌群の肝機能障害は軽度であった。その原因として、1/2HFC 飼料摂餌による経時的な肝機能障害進行が軽度であったことが考えられた。

2. 研究の目的

- 1) 食事因子のみで、NASH から肝癌まで進行するモデルを確立すること。
- 2) SHRSP5/Dmcr における、1/2HFC 飼料摂餌による経時的な肝機能障害を検討すること。

3. 研究の方法

動物の飼育と実験は金城学院大学実験動物委員会の承認を受け実施した。

研究 1)

実験動物と飼料

雄性 SHRSP5/Dmcr10 週齢 24 匹をランダムに各 6 匹の 4 群に分けた。全ての実験動物は特定病原体未感染 (specific-pathogen-free : SPF) 条件下、室温 (23±2)、湿度 (55±5%)、8 時-20 時の 12 時間周期の明暗の基に飼育した。飼料は、1) 普通飼料 (SP) 2) 1/2HFC 飼料、3) 1/2HFC 飼料+鉄 (低濃度)、4) 1/2HFC 飼料+鉄 (高濃度) とした。摂餌期間は、24 週間とした。低濃度の鉄添加量は、日本人の食事摂取基準の耐用上限量 (体重換算) に設定した。高濃度の鉄添加量は、低濃度の 100 倍に設定した。飼料は 24 週間自由摂取で与えた。

体重・血中生化学的検査

体重は飼料開始前、飼料開始後 24 週目まで隔週測定した。血液は麻酔下で腹部大動脈より採取した。血液サンプルは血清に分離し、-80 で保存した。フェリチン、 α -フェトプロテイン、Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II)、トランスフェリン (Tf)、グルコース (Glu)、トリグリセリド (TG)、遊離脂肪酸 (FFA)、総コレステロール (T-cho)、無機リン (IP)、 γ -グルタミントランスアミナーゼ (γ -GTP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT) は株式会社 SRL に測定依頼した。

組織学的検査採血後、肝臓を採取し、重量を測定した。

肝臓を生理食塩水で洗浄後、0.1M リン酸バッファー (pH7.4) -4%パラフォルムアルデヒドによって固定し、エタノール系で脱水後、パラフィンに包埋した。肝臓切片は 4 μ に薄切し、ヘマトキシリンエオジン (H.E.) で染色後、光学顕微鏡 (KEYENCE BZ-X710) で観察し脂肪沈着と炎症を確認した。パラフィン包埋した肝臓は組織学的検討に使用した。

解析

全てのデータは平均 \pm 標準偏差で示した。各群間および加齢による変化の比較は二元配置分散後、Turkey test で解析した。有意水準は 5% とした。全ての計算は IBM SPSS Statistics 27 (日本アイ・ビー・エム株式会社) によって解析した。

研究 2)

実験動物と飼料

雄性 SHRSP5/Dmcr10 週齢 24 匹を 4 群に分けた。摂餌期間 8 週間の 1) SP、2) 1/2HFC 飼料群、摂餌期間 24 週間の 3) SP、4) 1/2HFC 飼料群の 4 群に分類した。

体重・血中生化学的検査

体重および臓器重量は、各群の摂餌期間に基づき 8 週間後、および 24 週間後に測定した。血液は麻酔下で腹部大動脈より採取した。血液サンプルは血清に分離し、-80 で保

存した。グルコース (Glu)、トリグリセライド (TG)、遊離脂肪酸 (FFA)、総コレステロール (T-cho)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT) は株式会社 SRL に測定依頼した。

組織学的検査採血後、肝臓を採取し、重量を測定した。

肝臓を生理食塩水で洗浄後、0.1M リン酸バッファー (pH7.4)-4%パラホルムアルデヒドによって固定し、エタノール系で脱水後、パラフィンに包埋した。肝臓切片は4μに薄切し、ヘマトキシリンエオジン (H.E.)で染色後、光学顕微鏡 (KEYENCE BZ-X710) で観察し脂肪沈着と炎症を確認した。パラフィン包埋した肝臓は組織学的検討に使用した。

解析

全てのデータは平均±標準偏差で示した。各群間および加齢による変化の比較は二元配置分散後、Turkey test で解析した。有意水準は5%とした。全ての計算はIBM SPSS Statistics 27 (日本アイ・ビー・エム株式会社)によって解析した。

4. 研究成果

食事因子の影響のみで非アルコール性脂肪肝炎から肝癌へ進行するモデルの確立を目的として研究を行った。しかし、すべての群において肝癌の発症は認められなかった。高濃度の鉄添加群は、AST 値、トランスフェリン値が低値であり、その他の群と比較すると肝機能障害が認められ、鉄添加による肝機能障害の悪化が示された。しかし、形態学的に顕著な状態の悪化は認められなかった。組織学的には、脂肪沈着は、SP 群と比較して他の3群において増加が観察された。また、炎症性細胞の浸潤は、SP 群と比較して他の3群において増加が認められた。さらに、高濃度の鉄添加群では、1/2HFC 群と比較し、増加が認められた。しかしながら、1/2HFC 飼料 24 週間の摂餌による肝機能障害の進行が軽度であった (図 1、2)。

そこで、SP 飼料群、1/2HFC 飼料群の摂餌期間 8 週間と 24 週間の比較を実施することにより、SHRSP5/Dmcr の 1/2HFC 飼料摂取による肝障害の経時的变化を検討した。肝臓重量に関しては、長期間の 1/2HFC 摂餌により、増加が認められ、肝臓の肥大が考えられた。遊離脂肪酸値は 1/2HFC 飼料 24 週間摂餌により、上昇が認められた。しかし、肝機能障害の指標である AST 値、ALT 値は低値し、1/2HFC の長期間の摂餌により肝機能が改善したことが示唆された (図 3)。1/2HFC 飼料の長期間摂取は、肝障害が重症化しなかったことにより、鉄を加えても肝障害が軽微になったと考えられた。

1/2HFC 飼料では、鉄による肝障害は炎症性細胞の浸潤が認められるものの、重度の障害には至らず、その原因として、ベースの HFC 飼料濃度が低いと経時的に肝障害が進行しないことが示唆された。

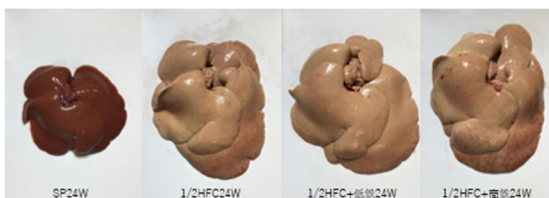


図 1. 形態学的変化

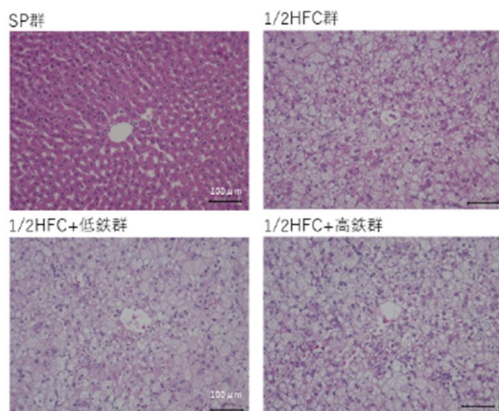


図 2. 組織学的変化 H.E. 染色像

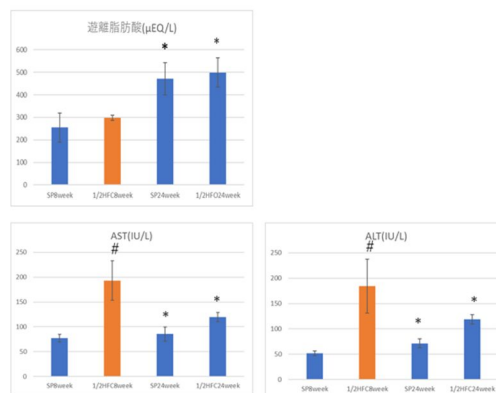


図 3. 1/2HFC 飼料摂取の経時变化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋菜月
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患に及ぼす鉄の影響
3. 学会等名 第69回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2022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	那須 民江 (Nasu Tamie) (10020794)	中部大学・生命健康科学部・客員教授 (33910)	
研究分担者	飛田 博史 (Tobita Hiroshi) (60457190)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師 (15201)	
研究分担者	安井 菜穂美 (Yasui Naomi) (70399145)	武庫川女子大学・薬学部・講師 (34517)	

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
---------	---------