

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19725

研究課題名(和文) NASHの病態悪化に対する食事性亜硝酸塩の抑制効果とメカニズムの解明

研究課題名(英文) Protective effect and mechanism of dietary nitrite supplementation on progression of non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

園田 邦博 (Sonoda, Kunihiro)

金城学院大学・生活環境学部・准教授

研究者番号：80454338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、現在も治療法が確立できていない疾患である。本研究では、NASHモデル動物への食事性亜硝酸塩によるNASH病態進展に対する影響を明らかにすることを目的に実施した。食事性亜硝酸塩の摂取は、NASHモデルラット(SHRSP5/Dmcrラット)で起こる肝臓の炎症や酸化ストレスを軽減することで、線維化進展を抑制する可能性を示した。また、線維化抑制メカニズムとしてレニン-アンジオテンシン系が関与している可能性があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、現在も治療法が確立できていない疾患である。一方で、野菜や果物に含まれる硝酸塩/亜硝酸塩は、生体内で一酸化窒素(NO)に変換され血管拡張、抗炎症、抗酸化作用を示すことから、NASHに対しても有効であると仮説を立てた。そこで、NASHモデル動物に対する亜硝酸塩の病態進展に対する有効性について検証した。その結果、亜硝酸塩の摂取はNASHで起こる肝臓での炎症や酸化ストレスの増大を抑制し、線維化進展を抑制する可能性を示した。本研究は、動物実験であることからヒトに対する有効性を検証していく必要があるものの新たな食事療法の開発に貢献できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a disease for which no cure has yet been established. The purpose of this study was to clarify the inhibitory effects of dietary nitrite on the progression of NASH pathology in NASH model animals. This study showed that nitrite intake in drinking water suppressed the progression of liver fibrosis by reducing liver inflammation and subsequent oxidative stress that occur in NASH model rats (SHRSP5/Dmcr rats), and also showed a possibility that the renin-angiotensin system may be closely involved in the suppression mechanism of the liver fibrosis.

研究分野：食品機能学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 食事療法 亜硝酸塩/一酸化窒素 炎症 酸化ストレス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: NAFLD) は、世界で最も患者数が多い肝疾患である。その中でも非アルコール性の脂肪性肝炎 (Non-Alcoholic SteatoHepatitis ; NASH) は、肝硬変から肝がんへと進行するため临床上重要な肝疾患とされている。しかし、NASH に対する食事療法は確立されていないのが現状である。NAFLD の患者数は、本邦だけでも推定 2000 万人に上る。NAFLD は、単純脂肪肝 (NAFL) と脂肪性肝炎 (NASH) に分けられる。前者は予後良好であるが、NASH は進行すると肝硬変 (線維化) から肝がんへと移行しやすいことから、NASH の病態の解明と治療法の確立が喫緊の課題となっている。

NO (nitric oxide; NO) は、血圧降下作用、抗酸化作用、抗酸化作用を有するガス状物質である。正常な状態では血管内皮細胞や神経細胞で恒常的に NO 合成酵素により産生されているが、糖尿病、高血圧、肥満などの生活習慣病では血管内皮障害により産生が著しく低下する。NASH モデル動物において血管内皮機能が低下することが報告されている<sup>1)</sup>。一方で、これまで食品成分では直接 NO を産生する物質は見つかっていなかった。近年、野菜や果物に含まれる硝酸塩が還元されることで生成する亜硝酸塩が還元されて NO を産生し、NO と同様の生理作用を示すことが報告されてきている。このことから、亜硝酸塩は生体内で NO が不足した際の NO 供給源としての役割が期待されている。我々の先行研究においても、亜硝酸塩を疾患モデル動物に経口補給させると炎症、酸化ストレスを抑制することを明らかにしている。

以上のことから、病態の進行に炎症や酸化ストレスの増大が関わる NASH に対しても亜硝酸塩の摂取が有効であると仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

食餌誘発性の NASH モデル動物である SHRSP5/Dmcr ラットを用いて、亜硝酸塩摂取による NASH の病態悪化抑制効果とメカニズムを明らかにし、新たな食事療法の開発に貢献する。

## 3. 研究の方法

雄性 10 週齢の Wister kyoto (WKY) または SHRSP5 /Dmcr ラットを以下の (1) ~ (5) の 5 グループ (n=6) に分けて 4 週または 8 週間飼育した。なお、亜硝酸塩 (100 mg/L) とカプトプリル (100 mg/L) は、飲み水中に加え摂取させた。また、4 週飼育実験では (2) (3)(4) の 3 群とし、亜硝酸塩の投与量を 500 mg/L で実施した。

- (1) WKY + 通常食・・・WKY 群
- (2) SHRSP5/Dmcr + 通常食・・・・通常食群
- (3) SHRSP5/Dmcr + 高脂肪食・・・・HFC 群
- (4) SHRSP5/Dmcr + 高脂肪食 + 亜硝酸塩・・・・亜硝酸塩群
- (5) SHRSP5/Dmcr + 高脂肪食 + カプトプリル・・・・カプトプリル群

解剖直前にカテーテル法で動脈血圧を測定した。その後、解剖を実施して血液、肝臓、心臓を採取した。採取した肝臓を用いて脂肪肝 (HE 染色)、肝線維化 (シリウスレッド染色)

炎症（免疫染色：CD68）の病理標本を作成し、定量解析を行った。血液サンプルを用いて硝酸塩と亜硝酸塩濃度の測定（HPLC：ENO-20、エイコム社）により測定した。また、肝臓と心臓サンプルから mRNA を抽出し、酸化ストレスの増大に関わる NADPH 酸化酵素のサブユニットである p22phox と p47phox、および心臓障害に関わる ANP と BNP を PCR 法により評価した。採取したデータは、すべての値を平均±標準誤差で示し、統計解析は 3 群以上の検定を one-way ANOVA の Tukey test により行い、 $p < 0.05$  を有意差有とした。これらの解析は Stat Mate V（株式会社アトムス、東京）を用いた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 亜硝酸塩摂取による肝臓の脂肪蓄積（脂肪肝） 線維化、炎症への影響

WKY 群や通常食群に比べ、HFC 群は肝臓への脂肪の蓄積、線維化、炎症範囲が有意に増加していた（図 1）。一方で、亜硝酸塩とカプトプリルの摂取は、肝臓への脂肪蓄積を抑制しなかったが、炎症と線維化を有意に抑制した（図 1）。Day ら<sup>2)</sup>が提唱した 2 hit theory では、過食などにより肝臓への脂肪蓄積が起こり脂肪肝へと進行し（1st hit）、その後の炎症や酸化ストレスの増大から線維化が誘導される（2st hit）としている。従って、亜硝酸塩とカプトプリルの NASH 進行抑制作用は 2st hit の炎症や酸化ストレスの増大抑制が関与していると考えられた。

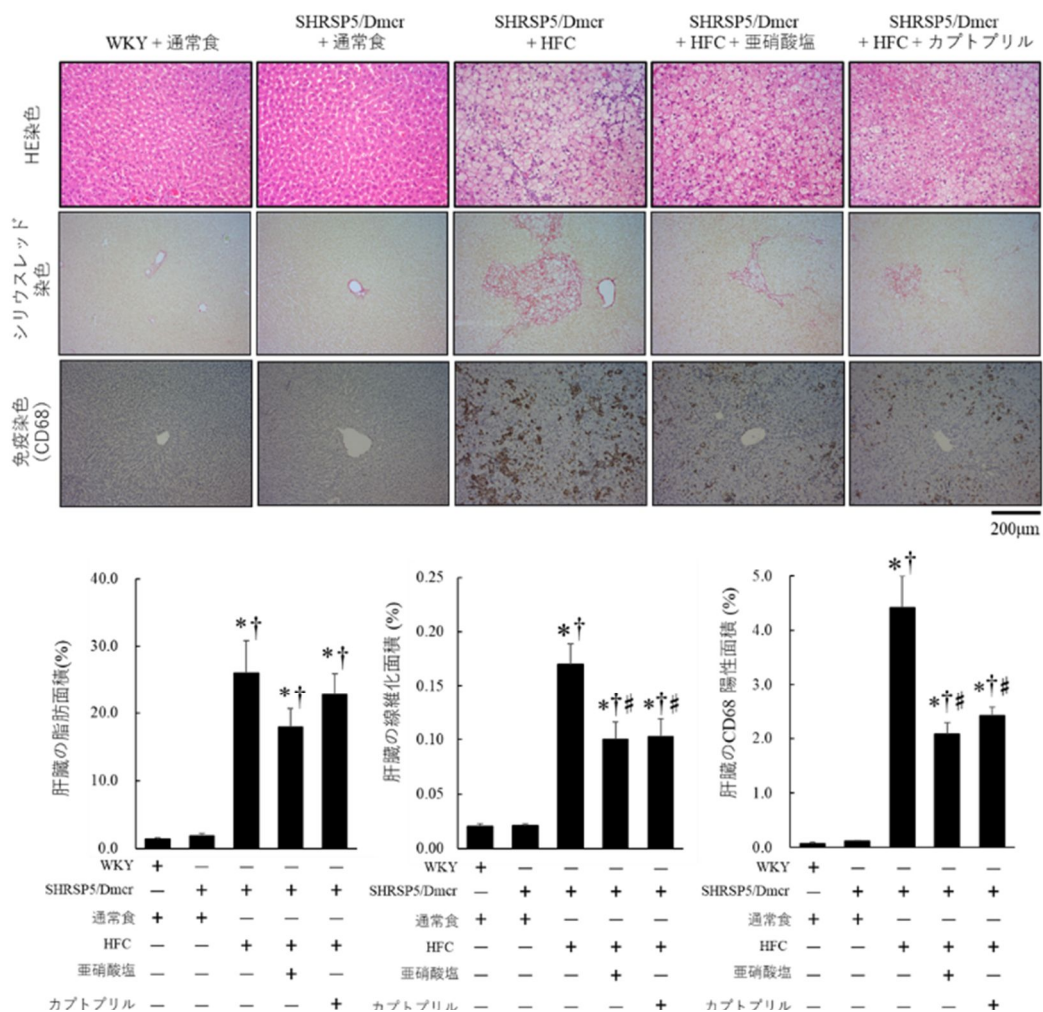


図 1) 肝臓の病理学的評価

すべての値は平均 ± SE (n = 6) で示した。\*  $p < 0.05$  vs. WKY + 通常食, †  $p < 0.05$  vs. SHRSP5/Dmcr + 通常食, ‡  $p < 0.05$  vs. SHRSP5/Dmcr + HFC.

## 2) 亜硝酸塩摂取による血圧および血中の亜硝酸塩と硝酸塩濃度への影響

図2に亜硝酸塩投与摂取によるNASHモデルラットの血圧と亜硝酸塩/硝酸塩濃度への影響を示した。通常食群とHFC群は、WKY群よりも有意に血圧が高かった。亜硝酸塩は、WKYに比べ血圧が有意に高かったが、通常食群に比べると有意に血圧が低かった。カプトプリル群は、WKY群と同程度の血圧を示した。血中亜硝酸塩レベルは、すべての群で有意な差は無かったが、血中硝酸塩レベルは亜硝酸塩とカプトプリル群で有意に増加していた。亜硝酸塩群における硝酸塩レベルの増加は経口摂取した亜硝酸塩を反映していると考えられた。一方、カプトプリルは内皮保護効果によるブラジキニンを経たNO生成を誘導することが報告されている<sup>3)</sup>。このことから、今回のカプトプリル群の硝酸塩レベルの増加は内皮由来NOを反映していると考えられた。

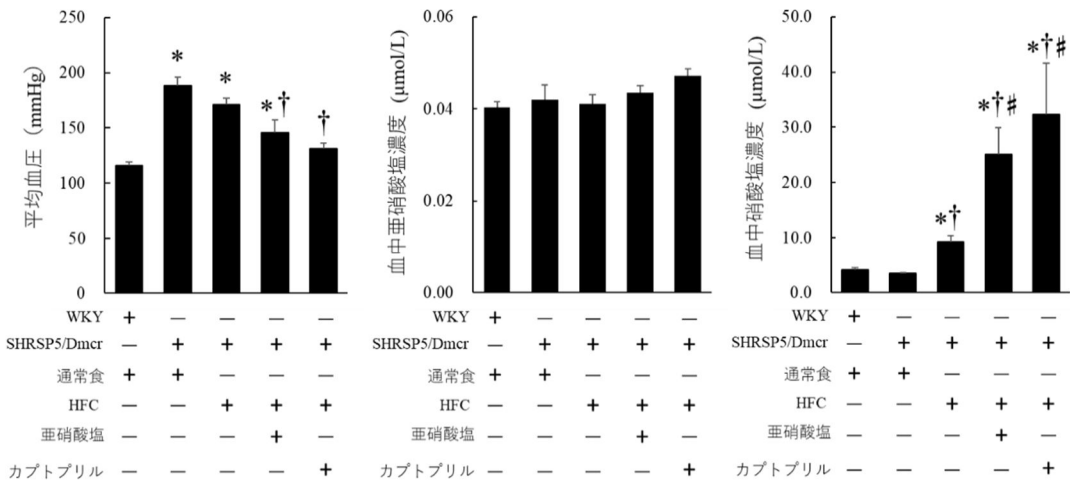


図2) 亜硝酸塩摂取による血圧および血中亜硝酸塩と硝酸塩濃度への影響

すべての値は平均 ± SE (n = 6) で示した。\*  $p < 0.05$  vs. WKY + 通常食, †  $p < 0.05$  vs. SHRSP5/Dmcr + 通常食, #  $p < 0.05$  vs. SHRSP5/Dmcr + HFC.

## 3) 亜硝酸塩摂取によるNADPH酸化酵素およびANPとBNPのmRNA発現レベルへの影響

図3に飼育4週目のNADPH酸化酵素のサブユニット(p22phoxとp47phox)と心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)と脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)のmRNA発現レベルを示した。亜硝酸塩群は、HFC群に比べ酸化ストレス増大の要因となるNADPH酸化酵素の増加を有意に抑制し、心臓障害の指標となるBNPのmRNAレベルを低下させた。

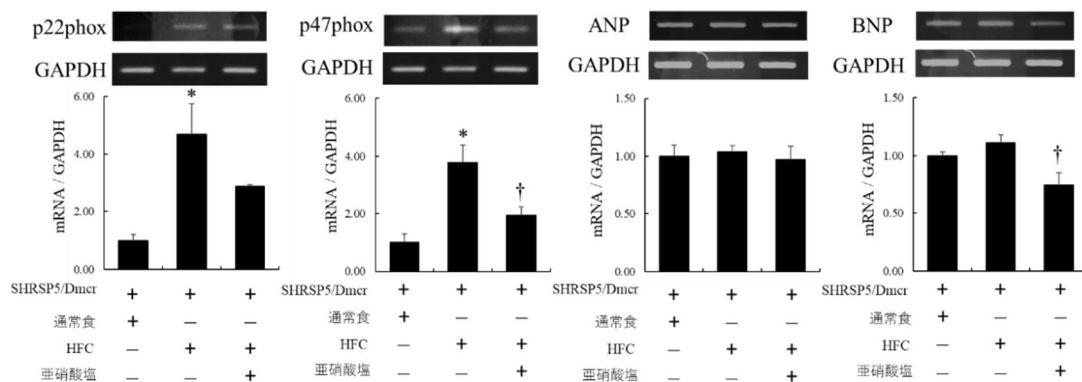


図3) 亜硝酸塩摂取によるNADPH酸化酵素およびANPとBNPのmRNA発現レベルへの影響

すべての値は平均 ± SE (n = 6) で示した。\*  $p < 0.05$  vs. SHRSP5/Dmcr + 通常食, †  $p < 0.05$  vs. SHRSP5/Dmcr + HFC + 亜硝酸塩.

#### 4) 亜硝酸塩摂取による NASH モデル動物の心臓に与える影響

図 4 に亜硝酸塩摂取による NASH モデル動物の心臓に与える影響を示した。SHRSP5/Dmcr ラットは高血圧を伴うラットであり、通常食群と HFC 群の両群で WKY 群に比べ有意な心臓重量の増加が起こったが、亜硝酸塩とカプトプリル群は通常食群と HFC 群に比べ心臓重量が有意に低かった。また、心臓組織の左心室管腔と心筋層の比においても通常食群と HFC 群は WKY 群に比べ有意に増加したが、亜硝酸塩群とカプトプリル群は通常食群と HFC 群に比べ有意に低かった。したがって、亜硝酸塩やカプトプリルの摂取は肝臓だけでなく心臓保護的に働く可能性を示した。

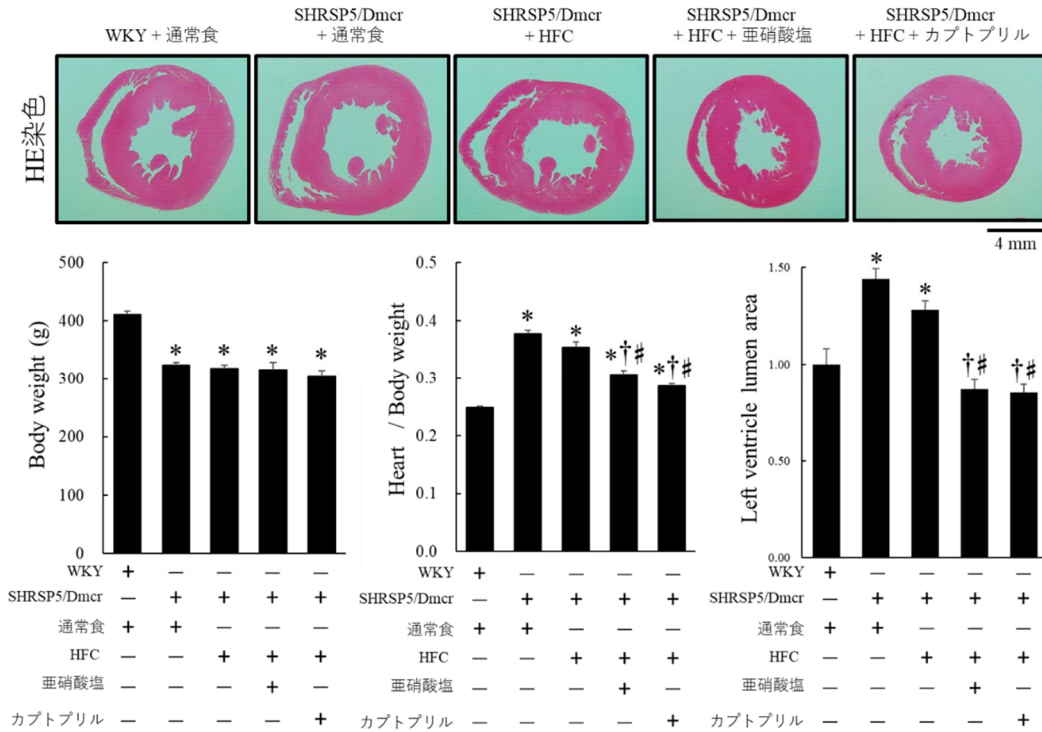


図 4) 亜硝酸塩摂取による NASH モデル動物の心臓に与える影響

すべての値は平均 ± SE (n = 6) で示した。\*  $p < 0.05$  vs. WKY + 通常食, †  $p < 0.05$  vs. SHRSP5/Dmcr + 通常食, ‡  $p < 0.05$  vs. SHRSP5/Dmcr + HFC.

#### 5) まとめ

食餌性亜硝酸塩は、心血管病変をともなう NASH モデル動物の病態進行を軽減する可能性を示した。そのメカニズムにはレニン-アンジオテンシン系の活性化抑制からの炎症と酸化ストレスの軽減が関与する可能性があることがわかった。したがって、硝酸塩/亜硝酸塩を豊富に含む野菜や果物の積極的な摂取は、NASH に対する新たな食事療法の戦略として使用できる可能性があることを示すことができた。

#### 5. 参考論文

- 1) Watanabe S et al. *J. Atheroscler. Thromb.* 2018 ; 25:439–453.
- 2) Day CP et al. *Gastroenterology.* 1998 ; 114(4):842-845.
- 3) Bachetti T et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 ; 33:395–403.

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kunihiro Sonoda, Yuka Kono, Kazuya Kitamori, Kazuo Ohtake, Sachiko Shiba, Keizo Kasono, Jun Kobayashi	4. 巻 23(6)
2. 論文標題 Beneficial Effects of Dietary Nitrite on a Model of Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by High-Fat/High-Cholesterol Diets in SHRSP5/Dmcr Rats: A Preliminary Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23062931	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 河野 有華、 園田 邦博、大竹 一男、 柴 祥子、北森 一哉、小林 順	4. 巻 27(1)
2. 論文標題 非アルコール性脂肪肝炎モデル動物の肝炎と肝線維化に対するSodium nitriteとCaptoprilの併用投与による影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 金城学院大学消費生活科学研究所紀要	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野有華、園田邦博、北森一哉、大竹一男、小林順
2. 発表標題 亜硝酸塩とカプトプリルの併用によるNASHモデル動物の肝線維化抑制効果
3. 学会等名 第141年会 日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野有華、園田邦博、北森一哉、大竹一男、小林順
2. 発表標題 NAFLDモデルラットの肝炎に対する亜硝酸塩の予防効果
3. 学会等名 心血管代謝週間2021
4. 発表年 2021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
研究協力者	河野 有華  (Kono Yuka)		
研究協力者	大竹 一男  (Ohtake Kazuo)		
研究協力者	小林 順  (Kobayashi Jun)		
研究協力者	北森 一哉  (Kitamori Kazuya)		

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