

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：12102  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22300260  
 研究課題名（和文） 機能性食品の転写因子賦活化と自然免疫亢進抑止による肥満関連肝疾患の発生と進展予防  
 研究課題名（英文） Activation of transcription factor by functional food constituents inhibits the onset and progression of obesity-related liver diseases through attenuating the enhanced innate immunity levels.  
 研究代表者  
 高橋 宏（TAKAHASHI HIROSHI）  
 筑波大学・医学医療系・准教授  
 研究者番号：70236313

研究成果の概要（和文）：抗酸化ストレス応答が脆弱化した Nrf2 ノックアウトマウスでは早期に脂肪性肝炎を発症し、一方、Nrf2 を過剰に発現するマウスでは脂肪性肝炎を発症しなかった。肝における非ヘム鉄濃度は Nrf2 ノックアウトマウスで顕著に増加していた。初代培養肝細胞を用いた実験においても、メチオニンコリン欠乏培地では、Nrf2 ノックアウトマウス由来肝細胞の肝細胞から培地への鉄排泄は他のマウス由来肝細胞に比較して低下していた。Nrf2 の賦活化は抗酸化ストレス応答のみならず、肝細胞における鉄代謝を調節し、脂肪性肝炎の発症と進展を防御すると推測された。

研究成果の概要（英文）：In *Keap1*-kd mice (with Nrf2 overexpression) fed an MCD diet, steatohepatitis did not develop over the observation periods. However, in *Nrf2*-null mice fed the diet, the pathological state of the steatohepatitis was aggravated. Iron accumulation was greater in the livers of the *Nrf2*-null mice compared to those of the WT mice, and it was not observed in *Keap1*-kd mice. Further, the iron release from the isolated hepatocyte of *Nrf2*-null mice was significantly decreased. Sulforaphane, an activator of Nrf2, suppressed the pathological states and oxidative stress in the livers. Nrf2 has protective roles against nutritional steatohepatitis through inhibition of hepatic iron accumulation and counteraction against oxidative stress-induced liver injury.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,700,000	2,310,000	1,0010,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：周術期管理学・肝臓病学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：肥満、脂肪性肝疾患、自然免疫、転写因子、酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は過剰なエネルギー源が脂肪として蓄えられた状態である。脂肪の体内における主要な貯蔵場所は脂肪組織であるが、筋肉および肝臓等にも異所性に脂肪蓄積が生じる。過剰な脂肪蓄積が生じると組織の構造や機能に異常をきたし、炎症状態を誘発すること

で器官障害を引き起こす。わが国では、肥満者の約3割は非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）と称される脂肪肝を伴う慢性肝障害に罹患している。NAFLDの一部はNASHに移行する。NASHの発症は、NAFLD（first hitに相当）にNASHを発症させる因子あるいは障害（second hitとして酸化スト

レス、脂肪過酸化、エンドトキシン等)が生体に加わることにより引き起こされる。

肥満は自然免疫系の活性亢進を特徴とする炎症性の障害であり、一方、活性化した自然免疫系は肥満関連肝疾患の発生とその進展の病態に深く関与している。自然免疫系は、自然免疫細胞(マクロファージ細胞等)の集積による不要分子(病原体や食事性異物等)の除去、クッパー細胞や血管内皮細胞による細菌の免疫学的排除を目的に営まれる生体反応である。肥満状態では食事性脂肪や脂肪酸が異物として認識され、その結果、脂肪による炎症シグナル伝達経路の活性化が生じることで肝に炎症病態が惹起される。過剰な脂肪または脂肪酸は幾つかの細胞シグナル伝達経路によるNF- $\kappa$ Bの活性化により、炎症性サイトカインの産生を亢進させ炎症病態を惹起する。最近、肥満者の自然免疫系の活性亢進が肝障害や肝線維化にも重要な役割を果たすことが判明しつつある。

転写因子Nrf2の役割は、同遺伝子欠損マウスの解析より、生体への侵害刺激に対して生体が発動する防御機構を制御する司令塔的因子である。脂質代謝に関連して、Nrf2は高脂肪食による肝脂肪蓄積を抑止する作用も見出されている。最近、連携研究者の山本らは、Nrf2は自然免疫系の活性化を調節する因子でもあり、レドックス状態に関する恒常性の維持ならびに活性化した炎症性サイトカイン産生経路の抑制を司る因子であることを明らかにした。

近年では予防医学という言葉が注目され、日常の食生活を改善することより種々のストレスより生体を保護し、疾病を回避する考え方である。特に癌の発生には、生活環境や食生活などの様々な原因が挙げられることより、これらの予防効果を多くの植物性食品成分に期待する動きが生じている。野菜であるブロッコリーは、SOD様活性やDPPH捕捉活性が高いとの報告がなされている。米国の国立がん研究所の研究成果により、ブロッコリーに含まれるスルフォラファンには、肝臓の解毒作用を高める働きがあることが判明した。分担者石井らの研究により、その効果の一部には、含有成分のスルフォラファンのNrf2賦活化による生体内抗酸化作用にあると推察されている。スルフォラファンは生体の酸化ストレス応答能を強化する点より、肥満関連肝疾患の予防医学に有用な機能性食品と位置図けることが出来る。

## 2. 研究の目的

非アルコール性脂肪性肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis: NASH)は進行性であり、脂肪肝から肝硬変、さらには肝癌にまで進行する致死性の疾患群である。本邦においてもメタボリック症候群の増加に伴いNASH予防

の重要性が認識されている。一方、転写因子のNF-E2 related factor 2(Nrf2)は、抗酸化ストレス防御機構の発動や自然免疫系の活性化を制御する司令塔的因子であることが判明している。近年、ブロッコリーに含まれるスルフォラファンは、Nrf2活性化を介した強力な抗酸化作用が推測され、予防医学の立場より注目されている。本研究では、野生、Nrf2欠失、Nrf2過剰発現マウスにNASHを誘発するコリンメチオニン欠乏(MCD)食を投与して、Nrf2がNASHの発生と進展に対する抑制因子であることを明らかにする。また、NASHの予防と治療の立場より、スルフォラファンによるNrf2を賦活化の分子機構を解明し、スルフォラファンがNASHの発生と進展に対して抑止効果を発揮するかを判定する。

## 3. 研究の方法

(1) 野生マウス、Nrf2遺伝子欠失マウス、Keap1遺伝子欠失マウスにMCD食を投与する。NASHの重要な肝組織学的変化について、それらの出現時期と程度の観点より比較し、Nrf2がNASHの発生と進展に対する抑制因子であることを明らかにする。

(2) 上記のNASHモデルにおいて、感受性を示すと予想されるNrf2遺伝子欠失マウスと、一方、抵抗性を示すと予想されるKeap1遺伝子欠失マウスの肝標本について、Nrf2が誘導する抗酸化防御系の発動と自然免疫系の活性亢進(特にTLR4-NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路)の抑止に関する分子機構について明らかにする。

(3) NASHの予防と治療の立場より、野生とNrf2遺伝子欠失マウスに対し、Nrf2賦活化を誘導するスルフォラファンを経口投与し、Nrf2介在性にNASHの発生と進展が抑止されるかを判定する。

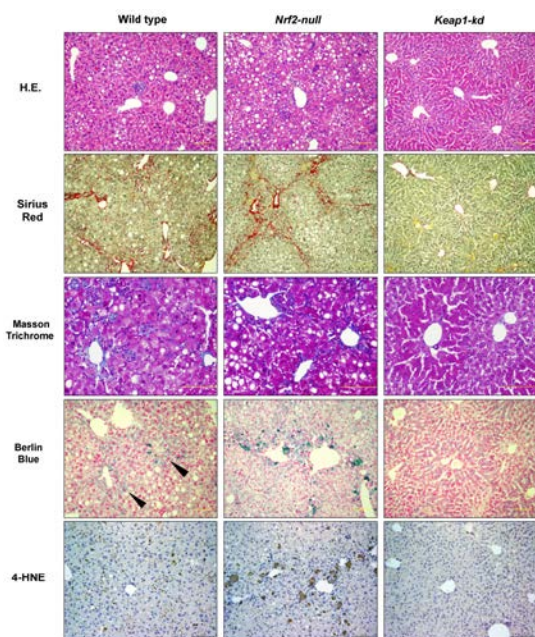
(4) スルフォラファンの抑止効果が認められた場合には、抗酸化防御系の発動と自然免疫系の活性亢進に対する修飾の観点よりそれらの分子機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

WT肝ではMCDD3週間投与にて病理学的な変化が認められなかったが、Nrf2-null肝ではNASHの病理組織像(炎症細胞浸潤、脂肪化、線維化)を呈し、Nrf2-nullではNASHが早期に誘発された。また、MCDD6週間投与では、WT肝でもNASH像が認められたが、Nrf2-nullマウスではより重症のNASH像を呈した(図1)。

血液生化学においても、AST、ALP、Bil値がMCDD投与Nrf2-nullではWTと比較して有意に高値であった。MCDD投与のWT肝では、Nrf2の発現がコントロール食投与と比較して3倍と顕著に増加していた。

図 1



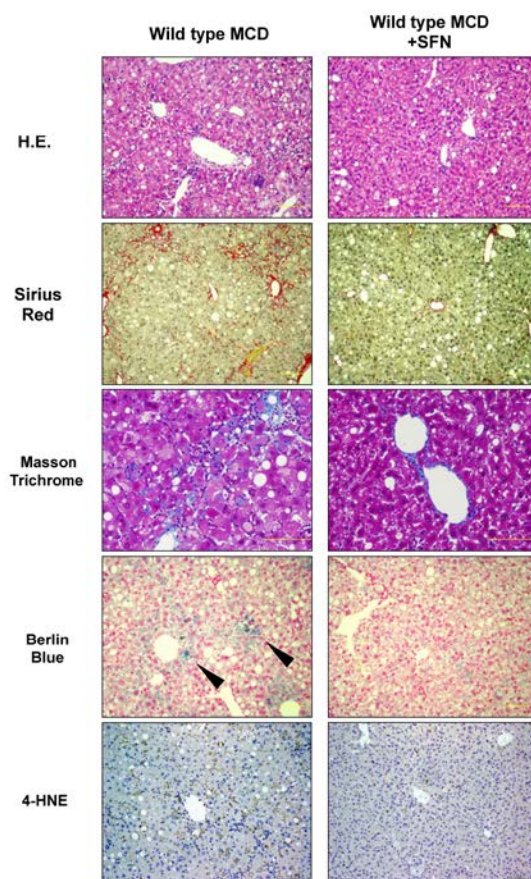
MCDD 投与 WT 肝では, Nrf2 が制御する解毒代謝酵素 NQO1, GSTa1, 抗酸化ストレス応答蛋白  $\gamma$ -GCS の発現が有意に増加し, 一方, MCDD 投与 Nrf2-null 肝では, これらの分子の発現誘導は軽微であるか, 認められなかった. 酸化ストレス防御因子の還元型グルタチオンと SOD は, MCDD 投与 Nrf2-null において WT と比較して有意にそのレベルが低下しており, Nrf2 欠失による抗酸化物質の低下が引き起こされ, NASH の早期進展に至ると考えられた. 以上の結果から, NASH の発生とその進展に対して, Nrf2 は解毒・酸化ストレス消去系分子の発現誘導を介して, 防御的役割を果たしていると推測された.

さらに重要な点は, 肝における非ヘム鉄濃度は Nrf2 ノックアウトマウスで顕著に増加しており, それに平行して, 酸化ストレス指標である 4-HNE レベルも増加していた (図). 本マウスでは鉄排泄輸送体の ferroportin 1 の発現レベルが低下していた. 各マウスからの初代培養肝細胞を用いた実験においても, メチオニンコリン欠乏培地では, Nrf2 ノックアウトマウス由来肝細胞の肝細胞から培地への鉄排泄は他のマウス由来肝細胞に比較して低下していた. これらの結果より, Nrf2 の賦活化は抗酸化ストレス応答のみならず, 肝細胞における鉄代謝を調節し, 脂肪性肝炎の発症と進展を防御すると推測された.

さらに治療的観点より, ブロッコリースプラウト (新芽) から Nrf2 の活性化剤として見出された Sulforaphen (SFN) を投与した野性型 (WT) マウスに対して MCD 食投与を行い, Nrf2 の賦活化が脂肪性肝炎の発症と進展に対して抑止効果を示すか検討した. SFN+MCD

食を作製し WT への投与を行った. 6 および 13 週間投与の双方において, Nrf2-null では WT と比較してより重症の脂肪性肝炎像を呈していた. Nrf2 制御下の抗酸化ストレス遺伝子群は, Nrf2-null ではそれらの発現レベルはごく軽微にのみ認められた. WT の SFN+MCD 投与群では MCD 投与群と比較して, 脂肪性肝炎における炎症および線維化が有意に抑制されていた (図 2). Nrf2-null マウスでは SFN による改善効果は認められず, このことより, SFN は Nrf2 の活性化を介して酸化ストレスの増加を抑制し, その結果, 肝病変の増悪を防御したものと考えられた. Nrf2 は MCD 誘発脂肪性肝炎に対して, 酸化ストレス消去系分子の発現誘導を介して, 肝病変の発症と進展に抑止的役割を果たすと推測された. Nrf2 は今後の NASH 治療における分子標的として重要であると考えられた. これに関連して, 機能性食品成分である SFN による Nrf2 活性化は NASH に対する新しい治療手段として有用であると考えられた.

図 2



##### 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) 全て査読有

① Oh S, Tanaka K, Warabi E, Shoda J :

- Exercise training decreases elevated serum ferritin and lipid peroxidation marker levels in middle-aged obese men with non-alcoholic fatty liver disease. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2013, In press.
- ② Oh S, Kim M, Eto M, Kim B, Shoda J, Tanaka K.: New approach for obesity treatment incorporating individual self-management education. *J Obesity & Weight Loss Therapy* 2013, In press.
- ③ Oh S, Tanaka K, Warabi E, Shoda J.: Exercise reduces inflammation and oxidative stress in obesity-related liver diseases. *MSSE* 2013, In press.
- ④ Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, Harada N, Taguchi K, Hashimoto E, Itoh K, Ishii T, Utsunomiya H, Yamamoto M, Shoda J: Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol* 47:924-35, 2012.
- ⑤ Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Gotoh N, Tokushige K, Hashimoto E, Utsunomiya H, Takahashi H, Ishii T, Yamamoto M, Shoda J.: Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. *J Gastroenterol* 2012, DOI 10.1007/s00535-012-0659-z
- ⑥ Okada K, Ma D, Warabi E, Morito N, Akiyama K, Yamagata K, Bukawa H, Shoda J, Ishii T, Yanagawa T.: Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in Peroxiredoxin I-deficient mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:503-509, 2012.
- ⑦ Yamanashi Y, Takada T, Shoda J, Suzuki H.: Novel Function of Niemann-Pick C1-Like 1 as a Negative Regulator of Niemann-Pick C2 Protein. *Hepatology* 55:953-64, 2012.
- ⑧ Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, Harada N, Taguchi K, Hashimoto E, Itoh K, Ishii T, Utsunomiya H, Yamamoto M, Shoda J: Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol* 47:924-35, 2012.
- ⑨ Yamanashi Y, Takada T, Yoshikado T, Shoda J, Suzuki H.: Biliary NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. *Gastroenterology* 140:1664-1674, 2011.
- [学会発表] (計 8 件)
- ① 正田純一, 藤 栄治, 山本雅之: 肝病態における転写因 nuclear factor-E2-related factor-2 (Nrf2) の演じる生体防御機構 (招待講演). 第 7 回臨床ストレス応答学会 (東京), 2012. 11. 24-25
- ② 呉 世昶, 田中喜代次, 正田純一: 運動療法は体重減少とは独立して肝病態と代謝異常を改善する. 第 16 回日本肝臓学会大会 (神戸), 2012. 10. 10-13
- ③ 正田純一: 胆石の種類と成因. 日本胆道学会認定指導医養成講座 3 (招待講演). 第 48 回日本胆道学会学術集会 (東京), 2012. 9. 20-21
- ④ 小野塚太郎, 志田隆史, 呉世昶, 田中喜代次, 正田純一: 減量目的の運動療法が肥満者の肝病態に及ぼす影響について 第 67 回日本体力医学会総会 (岐阜), 2012. 9. 14-16
- ⑤ Oh S, Warabi E, Tanaka K, Shoda J.: Nrf2 activation greatly improves exercise endurance capacity against muscular fatigue by free radicals. The 16th SFRR Biennial Meeting (London, UK), 2012. 9. 6-9
- ⑥ 岡本嘉一, 磯辺智範, 小野塚太郎, 志田隆史, 池田 瑛, 南 学, 正田純一: 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) における骨格筋脂肪化が肝病態へ及ぼす影響. 第 48 回日本肝臓学会総会 (金沢), 2012. 6. 7-8
- ⑦ 丸山 剛, 鈴木康裕, 石川公久, 江口 清, 正田純一: 非アルコール性脂肪性肝疾患に対するハイブリッド訓練法によるインスリン分泌能について. 第 49 回日本リハビリテーション医学学術集会 (福岡), 2012. 5. 31-6. 2
- ⑧ 呉 世昶, 田中喜代次, 正田純一: 減量目的の運動療法が肥満者の肝病態に及ぼす

影響について. 第 98 回日本消化器病学会  
総会 (東京), 2012. 4. 19-21

[図書] (計 6 件)

- ① Shoda J & Yamamoto M: Gallbladder Cancer Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. Horizons in Cancer Research. Volume 48. pp.1-24. NOVA Science, 2012.
- ② 正田純一: 漢方薬の有効性と医療科学  
インチンコウ湯 漢方薬の薬効と薬理  
日本伝統医学テキスト 漢方編 平成  
22・23 年度厚生労働科学研究費補助金  
地域医療基盤開発推進研究事業「統合医  
療を推進するための日本伝統医学の標準  
化」研究班 pp. 295-297, 2012.
- ③ Shoda J: Inchinkoto, Clinical efficacy  
and pharmacology, Textbook of  
Traditional Japanese Medicine, Health  
and Labour Sciences Research Grant,  
Research on the standardization of  
traditional Japanese Medicine  
promoting integrated medicine. pp.  
230-232, 2012.
- ④ 正田純一: 胆石症・胆道炎・胆道がん 胆  
石症 概念・定義と疫学 最新医学社(大  
阪), pp.13-25 2011.
- ⑤ 正田純一: 胆道癌発生の分子機序  
Annual Review 消化器 2011 中外医学社  
(東京) pp.293-299, 2010.
- ⑥ 正田純一: 胆道感染症 南江堂(東京),  
pp.366-369, 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 宏 (TAKAHASHI HIROSHI)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 70236313

### (2) 研究分担者

正田 純一 (SHODA JUNICHI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 90241827

柳川 徹 (YANAGAWA TORU)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 10312852

宇都宮 洋才 (UTSUNOMIYA HIROTOSHI)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60264876

岡本 嘉一 (OKAMOTO YOSHIKAZU)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 90420083

石井 哲郎 (ISHII TETSHUROU)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 20111370 (H22→H23)