

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 5月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500665

研究課題名（和文）

肝栄養エネルギー代謝を標的とする抗メタボリックシンドローム研究

研究課題名（英文） Study of anti-metabolic syndrome effects of cholesteryl ester-n3 PUFA targeting for liver energy metabolism alteration in non-alcoholic steatohepatitis rats.

研究代表者

高山 房子 (TAKAYAMA FUSAKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10236367

研究成果の概要（和文）：DHA や EPA をコレステロールとエステル化することで、有効性が約 10 倍になることを、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）進展リスク軽減効果で実証し、これらの産業的活用性を明らかにした。過剰(偏倚)栄養と栄養代謝に不十分な酸素供給により、肝栄養エネルギー代謝の機能低下・酸化ストレスと慢性炎症が惹起・加速し、NASH 病態を増悪化進展させることを再現する評価系で、両者の効果は、赤血球変形能低下や酸化ストレス・炎症遷延の改善によることが示された。

研究成果の概要（英文）： This study showed that DHA cholesteryl ester and EPA one were useful industrially, as both exerted higher effects to retard the NASH progress approximately 10 times than the respective ethyl ester. By evaluation system to reproduce NASH aggravation by choline deficient high fat diets and besides recurrent intermittent oxygen deficiency stress, it was exhibited that the efficacies resulted from relieving the decreased erythrocyte deformability and the persistent oxidative stress-inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：健康科学・薬効解析学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：NASH, 低酸素, エネルギー代謝, ミトコンドリア, 酸化ストレス, 炎症, 鉄, n-3 PUFA

1. 研究開始当初の背景

臨床症例で報告された非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の発症リスク上昇から、図1を作業仮説にし、栄養性肝代謝異常と間歇的低酸素負荷によるNASH病態モデル【特許第51

09134】を我々は開発した。肝臓は栄養代謝および生体構成分子合成の首座臓器であり、過剰(偏倚)栄養に曝されての機能破綻が、MSに大きく関与する可能性は大きい。

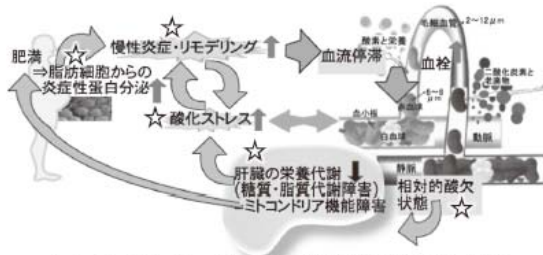


図1 メタボリックシンドローム・生活習慣病 増悪の機序

● 慢性的過剰(偏倚)栄養性肝障害とメタボリックシンドローム (MS) との関連は極めて重要であるが、看過されがちである。

● また、MSや生活習慣病の終局の生命の予後や質は、血栓・梗塞や出血により左右される。血液・循環器系機能にとって重要特質 “しなやかさ” は、生体膜内のコレステロール(Ch)の埋め込みによる‘剛性’とリン脂質二重膜構造中の不飽和脂肪酸による‘柔軟性’との融合で形成される。

○ n-3系多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)は、栄養代謝の是正、抗炎症を始めとする多様な作用により、抗MS機能に期待が寄せられる。他方、生命維持に必須の生体構成分子Chは肝臓で多く合成される。

● 体内利用性の見地による弱点として、多価不飽和脂肪酸には大気酸素分圧下での易被過酸化性、およびChには難溶解性がある。

◎ Chに脂肪酸がエステル結合したCh脂肪酸エステルは、Chの末梢から肝臓への輸送型や細胞での貯蔵型として機能する。さらに、Chによる障壁効果から、多価不飽和脂肪酸-Chエステル内の多価不飽和脂肪酸は過酸化を被り難いと報告されている。そこで、エステル結合誘導体としての利用の方が抗MS機能性に優ると想定した。

2. 研究の目的

(1) コレステロールとDHAまたはEPAとのエステル結合化合物 (DHA-EPA, Ch-EPA)の栄養代謝・生理機能の制御性を、過剰(偏倚)栄養と栄養代謝に不足の酸素供給により惹起・加速

する病態を再現するNASH病態で検討する。

(2) MS疾患進展における共通基盤とも想定できる図1上の☆に着目する解析により、生活習慣病の予防、治療への、Ch-DHAとCh-EPAの利用の可能性を学術的に解明し、抗MSの新たな治療標的として、栄養性肝代謝異常の概念を確立するとともに、Ch-DHAとCh-EPAの産業的利用の可能性を裏付けるデータを取得する。

3. 研究の方法

(1) Ch-DHAおよびCh-EPAの合成と安全性の確認。

(2) NASH病態動物に対するCh-DHAおよびCh-EPAの経口投与によるNASH進行リスク低減効果の検討

遊離脂肪酸としてのDHAやEPAの利用は、その易非過酸化性により生成する過酸化脂質の毒性への考慮から避けられ、エチルアルコールとのエステル化体などが利用される。そこで本課題においても、エチルアルコールとDHAやEPAとのエステル化体 (Et-DHA, Et-EPA) を対照として用いた。

- ① Ch-DHAおよびCh-EPA有効投与量の確立。
- ② Ch-DHA, Ch-EPA, Et-DHAおよびEt-EPAの有効活性比較: 有効投与量を分子内に含む遊離型DHAとEPA量に換算する。なお、以降、投与量は遊離型換算量として示す。

(3) 図1上で示す☆に対するバイオマーカー変動を調べ、Ch-DHAとCh-EPA によるNASH進行リスク低減効果の機転を解明。

4. 研究成果

(1) Ch-DHAおよびCh-EPAの合成と安全性実証 ChとDHAやEPAの弱点克服を意図し、エステル結合化合物 Ch-DHAおよびCh-EPA誘導体 (図2) を合成した。スケールとしては、1回の製造で200gの製造が可能である。

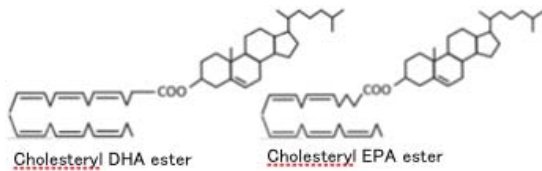


図2 Ch-DHAおよびCh-EPAの構造

なお、摂り過ぎた場合の健康への悪影響が注目されるトランス型不飽和脂肪酸への変換は、Ch-DHAおよびCh-EPA製品では惹起されていないことも確認できている。

(2) NASH進行リスク低減機能性

NASH病態動物へCh-DHA, Ch-EPAのEt-DHAおよびEt-EPA経口投与を施し、ヒト臨床NASH診断での確定診断基準の病理組織化学的検査および推定診断基準の血液生化学的肝機能マーカーの変動により、有効性を評価した。

①血液生化学的肝機能マーカーAST, ALT, ALP, およびγ-GTP : NASHラットにおける血中各酵素活性の活性上昇を、Ch-DHA, Ch-EPAのEt-DHAおよびEt-EPAは軽減し、有効性が示された。

② 病理組織化学的検査 ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソントリクローム染色およびベルリンブルー染色: NASHラットにおける肝索列の乱れ、肝組織の結合組織部分の増大および鉄沈着を、Ch-DHA, Ch-EPAのEt-DHAおよびEt-EPAは軽減し、有効性が示された。

血液生化学的肝機能マーカーの上昇や偽小葉の形成や進行した肝線維化の軽減が認められる投与量として、有効投与量は、Ch-DHAやCh-EPAではDHAとEPA遊離体換算量として10mg~100mg/kg/日であったのに対し、Et-DHAやEt-EPAではDHAとEPAの遊離型換算量100~1000 mg/kg/日を要した。

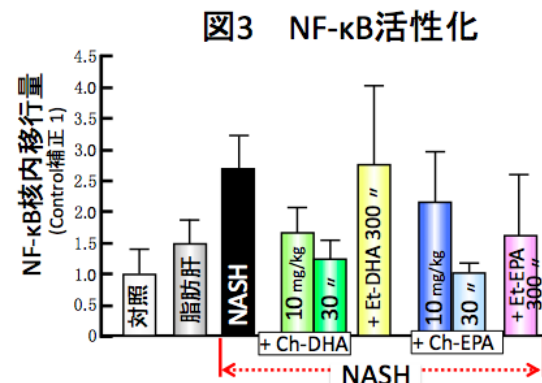
過酸化脂質は生体にとっては有害物となるため、消化管吸収されない。また、コレステロール脂肪酸エステルは血液中のリポタン

パク質により全身に輸送される。Ch-DHAおよびCh-EPAは遊離脂肪酸形の弱点を克服できる化合物であることが、NASH進行予防効果から示された。

(3) Ch-DHAとCh-EPA によるNASH進行リスク低減効果の機転を説明: 図1上で示す☆が作用点として有望と考え、Ch-DHAとCh-EPA投与による影響を検討しNASH進行リスク低減効果の作用点を追究した。

①酸化ストレス-炎症反応に対する制御性

i) NF-κB活性化: 酸化ストレスと炎症反応をクロストークさせる転写因子であるNF-κBのNASHでの活性化をCh-DHAやCh-EPAは軽減した。Et-DHAやEt-EPA投与に比べ、少量のCh-DHAやCh-EPA経口投与で用量依存的(10, 30 mg/kg/日)にNF-κB活性化を抑制した(図3)。



ii) 炎症性蛋白TNF-α, PAI-1の血中レベル: NASHにおける炎症性蛋白 TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)の血中レベル上昇をCh-DHAやCh-EPA経口投与は用量依存的(10, 30 mg/kg/日)に低下させた。

iii) 肝組織中好中球の浸潤: 好中球の浸潤は、好中球に最も豊富に存在するタンパクミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性で評価した。肝ホモジネート上清中MPO活性はNASHラットで上昇し、この上昇をCh-DHAや

Ch-EPA経口投与は用量依存的(10, 30 mg/kg/日)に軽減した。軽減作用はCh-EPA方が優っていた。

iv) 末梢血中CD29陽性細胞:CD29の発現亢進は細胞外への白血球遊走亢進の指標であり、接着性も亢進する。末梢血から調製した白血球・リンパ球上のCD29は蛍光色素標識抗CD29抗体処理試料のフローサイトメトリー測定により検出した。NASHラットではCD29の発現亢進が惹起されていた。Ch-DHAとCh-EPA投与はCD29の発現亢進を軽減し、白血球の遊走接着を抑制し、炎症反応による血液流動性の低下を改善する効果が示された。

v) 白血球の活性化:好中球は活性化すると、侵入病原性微生物の殺滅に向け、多量の活性酸素・フリーラジカル種を産生する。合理性を欠く活性化は酸化障害や標的誤りの炎症反応の遷延は組織炎症・線維化やがんに結びつくリスクをはらむ。好中球のプライミング状態(易被刺激性)は、産生される活性酸素・フリーラジカル種の量で評価できる。好中球が産生する活性酸素・フリーラジカル種によるルミノール酸化発光を化学発光検出により計測することで、好中球の活性化・プライミング状態を評価した。

NASHラット試料での化学発光量の増大をCh-DHAとCh-EPA投与は軽減し、炎症反応からの活性酸素・フリーラジカル量を減じ、炎症遷延のブロック効果が望めることが実証された。なお、直接的な活性酸素・フリーラジカルの消去活性は認められなかった。

v) 肝組織鉄沈着:生体必須元素の鉄の過剰は酸化ストレス-炎症関連により、肝炎・線維化を進展させることが知られており、瀉血療法の臨床上的有用性で実証されている。

肝ホモジネート上清を試料とする鉄含量を分光光度測定法により定量した。NASH肝組織

における鉄沈着にはCh-EPA投与のみに軽減する傾向が認められた。

vi) 肝ミトコンドリアの機能障害に対する改善効果が、◎NASHにおけるATP産生効率低下に対する復活効果および◎ミトコンドリアエネルギー代謝から派生する活性酸素・フリーラジカル量の増大で示される栄養代謝性酸化ストレス亢進に対する低減作用から実証された。

② 低酸素ストレスで惹起される動脈血中酸素分圧低下に対する改善効果が、Ch-EPA投与群で認められた。この改善効果は、NASHでの赤血球膜の変形能の低下が、Ch-EPA投与による赤血球膜の変形能の回復に基づくことを明らかにできた。赤血球膜にスピラベル剤5-nitroxide stearate を取込ませて計測するESRスペクトルからもとめられるorder parameter (S) 値の変動から実証できた。

③ NASHで惹起される低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α)の発現量減少に対する影響: 本課題のNASH病態モデルは脂肪肝担持動物に対し、反復性の間歇的低酸素ストレスを負荷して作製することから、HIF-1 α の発現はNASHで亢進することを推測していたが、逆であった。NASHにおける、HIF-1 α 発現低下に対しての回復効果はCh-EPAおよびEt-EPAに認められた。

以上から、有効性は同質であったが、Et-DHAやEt-EPAより遥かに作用活性に優るCh-DHAとCh-EPAの抗MS機能性が実証され、その作用機序のプロファイル化ができた。

本研究で確立された評価系は、肝臓の栄養エネルギー代謝機能、炎症と血流停滞の改善機能に基づき、MSや肥満症から生活習慣病への重症化の予防・治療、インスリン抵抗性の改善などに幅広く使用できる機能性素材や治

療・予防薬の探求に応用できる。

全身倦怠感や黄疸といった肝臓病特有の症状を示さないために、従来看過されていた過栄養性により惹起される肝機能異常状態について本課題の成果により、過剰栄養エネルギー代謝（主に肝）-相対的酸欠 [‘酸素で燃やして’ ATPをつくる栄養物質は多量に流入] -酸化ストレス亢進-炎症駆動転写因子NF κ Bの活性化-慢性炎症・組織の異常増殖を巡るメビウスの輪の解明が図れた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- 1) Kabuto H, Yamanushi T, Janjua N, Takayama F, Mankura M: Effects of squalene/squalane on dopamine levels, antioxidant enzyme activity, and fatty acid composition in the striatum of Parkinson's disease mouse model. *J Oleo Sci*, 査読有 62(1);21-28 (2013)
- 2) Pak W, Takayama F, Mine M, Nakamoto K, Kodo Y, Mankura M, Egashira T, Kawasaki H, Mori A: Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of spirulina on rat model of non-alcoholic steatohepatitis. 査読有 *J Clin Biochem Nutr*, 51(3);227-234 (2012)
- 3) Panot T, Takatori S, Sun P, Zamami Y, (他5名, 4番目): Do Cholinergic Nerves Innervating Rat Mesenteric Arteries Regulate Vascular Tone? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 査読有, 303;R1147-1156 (2012)
- 4) 高山房子, 中本賀寿夫, 峰麻奈加, 杉本志保, 白穎, 江頭亨, 川崎博巳, 黄堂泰昌, 万倉三正, 岡田茂, 森昭胤: NASHをターゲットとする食品の開発. *臨床化学*, 査読有, 40;333-340 (2011)
- 5) Ban S, Kasuga J, Nakagome I, Nobusada H, Takayama F, (他2名): Structure-

based design, synthesis, and nonalcoholic steatohepatitis (NASH)-preventive effect of phenylpropanoic acid peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α -selective agonists. *Bioorg Med Chem*, 査読有, 193183-193191 (2011)

- 6) 万倉三正, 西岡巧志, 加太英明(他5名, 5番目): DHA製品の開発と機能性評価. *ジャパンフードサイエンス*, 査読無, 49; 45-52 (2010)
- 7) Takayama F, Nakamoto N, Totani N, (他4名): Effects of docosahexaenoic acid in an experimental rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Oleo Sci*, 査読有, 59;407-414 (2010)

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/therah1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 房子 (TAKAYAMA Fusako)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 10236367

(2) 研究分担者

岡田 茂 (OKADA Shigeru)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・特命教授, 名誉教授
研究者番号: 20033201

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 (6名)

①杉本 志保 (SUGIMOTO Shiho)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・博士前期課程・大学院生
(H22→H23)

②万倉 三正 (MANKURA Mitsumasa)
池田糖化工業株式会社・理事
備前化成株式会社・顧問

- ③佐藤 ふみ (SATO Fumi)
池田糖化工業株式会社・研究室・研究員
- ④豊田 博 (TOYODA Hiroshi)
岡山協立病院・病理部・部長
- ⑤渡辺 律子 (WATANABE Ritsuko)
岡山協立病院・病理部・主任
- ⑥森 昭胤 (OKADA Shigeru)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・特
命教授, 名誉教授