

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 6 月 14 日現在

機関番号：25301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22500768
 研究課題名（和文） 慢性肝疾患における n-3 系由来脂質メディエーターの線維化抑制機構
 研究課題名（英文） Effect on hepatic fibrosis of omega-3 fatty acids and their lipid mediators.
 研究代表者
 川上（笹川） 貴代（KAWAKAMI-SASAGAWA TAKAYO）
 岡山県立大学・保健福祉学部・教授
 研究者番号：10254567

研究成果の概要（和文）：

慢性肝疾患進展予防は肝炎症を鎮め線維化を抑制することが重要である。本研究では第 1 に NAFLD モデル動物における実験で高 EPA 含有油脂食投与はコントロールに比較して NAFLD activity score の有意な低下を示し、炎症への影響が示唆された。第 2 に培養肝星細胞を用いて、レゾルビン等の影響を検討したところ、細胞内コラーゲン量の低下が観察された。したがってオメガ 3 系脂肪酸由来の脂質メディエーターの慢性肝疾患進展予防への影響についてさらなるメカニズムの検討が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We studied on progression of nonalcoholic Fatty liver disease (NAFLD) focus on anti-inflammatory and anti-fibrotic effect of omega3 fatty acid mediators. We showed that NAS (NAFLD activity score) in NASH model mice fed with EPA oil was significantly lower than control mice. Further, we observed that the addition of resolvins or their precursors to hepatic stellate cell cause reduction of the cellular collagen concentration. These results may derive from inhibition of production or degradation of collagen in HSC. We also investigated the serum CK18 level and its correlation with nutritional parameters in middle-aged Japanese males with NAFLD. We showed that members of the NAFLD group showed higher levels of serum CK18 levels and strongly associated with serum ALT and plasma DGLA. Abnormal fatty acid metabolism may be a factor of aggravation in NAFLD. Further examination including mechanism of omega3 fatty acid mediators on chronic liver disease should be performed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：慢性肝疾患，オメガ 3 脂肪酸，肝線維化

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患のうち、非アルコール性脂肪性

肝炎(nonalcoholic steato hepatitis; NASH) は、アルコール飲用歴がないにもかかわらず、

線維化や肝実質の壊死、炎症を呈し、肝硬変へといたるとされる。NASHの成因としてはtwo-hit説が有力とされ、肝庇護療法や抗酸化物質などが用いられているものの、より効果的な治療法が望まれている。

本研究で着目したn-3系脂肪酸は、従来オメガ6系のアラキドン酸代謝物のプロスタグランジンやロイコトリエン等産生において不飽和化酵素の競合により抗炎症に働くと考えられていた。最近n-3系EPAから産生され、局所炎症や気管支炎等で炎症の収束に働くことが発見された新規脂質メディエータであるレゾルビンE1やProtectinは動脈硬化や免疫研究等で注目を集めている。オメガ3系脂肪酸由来の脂質メディエータの肝線維化への影響については未だ明らかな結果は得られておらず、炎症収束に働く新規オメガ3系生理活性脂質の肝線維化での機構は未解明である。またAllardらはNASH肝での多価不飽和脂肪酸比率の低下と酸化ストレスの亢進を認め病態との関連性を示唆している。これまでの研究で我々はNASH患者での抗酸化ビタミン投与後肝障害指標はビタミン群で改善傾向が認められた。これらのことから体脂肪減少を目指した減量と食事脂肪酸組成の是正や補助的なビタミン投与は有効ではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 線維化の中心的役割を担う肝星細胞(HSC:Hepatic stellate cell)におけるレゾルビン等の影響と、動物実験での脂質栄養因子の肝炎や線維化への影響の検証を行う。

(2) 慢性肝炎患者防をめざした抗酸化・脂質栄養療法の基礎的検討を行う。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*ではヒト株化HSC(LI90細胞)とラットより分離したHSCにおいてオメガ3系生理活性脂質であるレゾルビンD1(Rev D1)およびその前駆体17HDoHE, またはオメガ6系生理活性脂質のPGF2 α , PGE2を添加培養し、細胞内コラーゲン量は免疫染色にて、また細胞遊走性はWound healing assayにより検討した。

2種類のNASHモデルラットを作成し、EPAおよび通常食の肝炎、線維化への影響を検討した。

(2) 臨床研究では、健診受診者における非アルコール性脂肪肝(NAFLD)のマーカーであるCK18と生化学検査値や栄養摂取状況および血中脂肪酸組成を分析した。

4. 研究成果

(1) 株化HSCでの各種星細胞刺激因子投与時におけるEPA代謝産物や各種生理活性脂質が肝線維化に関わるコラーゲン合成・分解あるいは細胞遊走性への影響について観察を行った。

その結果、まずLI90細胞での各試薬添加

により細胞障害性はみとめられなかった。細胞遊走性に関してRevD1と17R-HDoHEにコントロールと明らかな差が認められなかったが、PGF2 α およびPGE2においてはコントロールと比べて細胞の移動距離に短い傾向が認められ、遊走が抑制されている様子が観察された(図1)。一方、分離HSCを用いた系では培養後PGF2 α , PGE2, 17R-HDoHEおよびRevD1を添加しコラーゲン α Iの細胞内免疫染色を行ったところ、コントロールに比し、PGF2 α , PGE2では変化は認められないものの、RevD1と17R-HDoHEでは低下傾向が観察された(図2)。

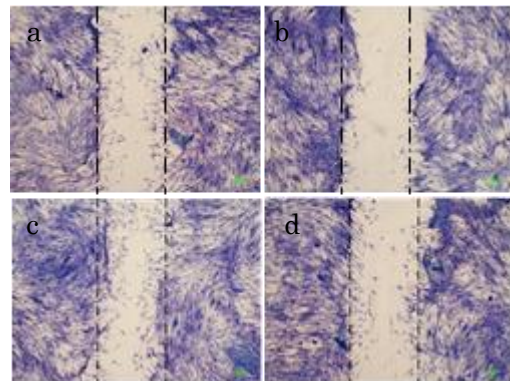


図1. LI90細胞におけるPGまたはレゾルビンの細胞遊走性への影響. a:コントロール(100mM EtOH), b:100nM PGF1 α , c:100nM 17HDoHE, d: 100nM Rev D1. ヒト株化HSCであるLI90を用いてWound healing assayを行いギムザ染色にて染色した。

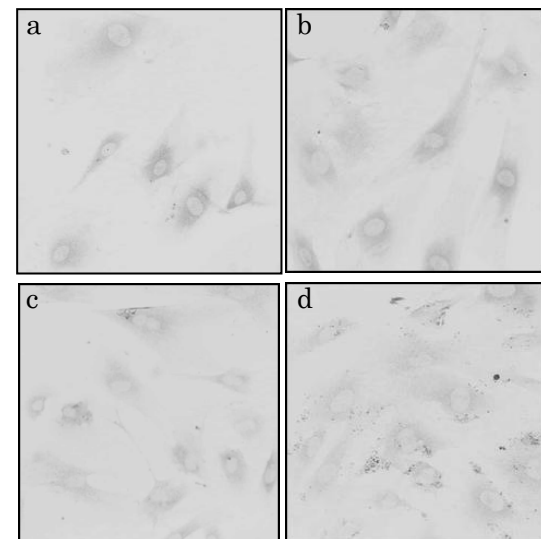


図2. 分離HSC細胞におけるPGまたはレゾルビンのコラーゲン α 1産生への影響. a:コントロール(100mM EtOH), b:100nM PGF1 α , c:100nM 17HDoHE, d: 100nM Rev D1. ラット肝星細胞は肝をコラーゲナーゼ・プロナーゼ選流にて分散し、密度勾配遠心にてHSC層を分離し使用した。抗コラーゲン α I抗体にて免疫染色した。

次に、コリン欠乏一亜硝酸投与によるNASHモデル動物において肝線維化にかかるEPA投与の影響を観察した。その結果、EPA投与の効果をNASHモデルラットでの肝炎および肝線維化へのこれらの影響は認められなかった

ものの血液生化学検査値において肝機能指標において軽度の炎症改善がみられ、肝炎症に何らかの効果があるものと考えられた。さらに高脂肪食を基本にした NASH モデルマウスである STAM™マウス（ステリック社作成）に高 EPA 含有油脂を 2%置換し 12 週齢での生化学的検査値、および組織学的検討を行った。結果より、血液生化学的検査値および肝脂肪蓄積においてコントロール群に比較して EPA 油群は明らかな変化は認められなかった（表 1, 2）。しかし肝臓組織学的検査値において EPA 油群において脂肪変性および風船用変性度はコントロールよりも検出が少なく、脂肪化、肝実質における炎症、肝細胞障害にて評価を行いスコア化した NAS (NAFLD activity score) の有意な低下が認められた（表 3）。一方、本週齢における線維化への影響はシリウスレッドにてコラーゲン染色陽性面積を算出し比較したものの両群で明らかな差は認められなかった。

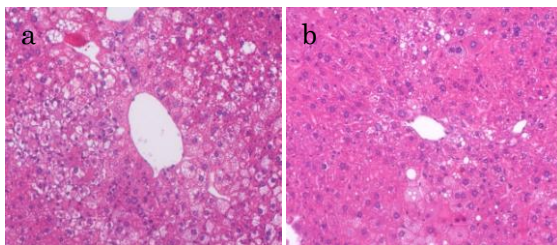


図 3. NASH モデルマウス（12 週齢）の高 EPA 含有油脂投与の肝組織学的影響. a:コントロール, b:高 EPA 含有油脂投与群. STAM™マウス(ステリック社)は高脂肪食にて飼育し、12 週齢時に解剖、肝臓組織パラフィン切片作成後 HE 染色を行った。

表 1. 血液生化学検査値

	C-group	S-group	P
TG(mg/dl)	54±26	60±50	ns
TP(g/dl)	5.4±1.0	4.8±0.9	ns
Alb(g/dl)	2.8±0.3	2.5±0.2	ns
AST(IU/l)	99±18	109±39	ns
ALT(IU/l)	57±11	60±13	ns
LDH(IU/l)	483±117	414±62	ns

表 2. 肝臓 TG

	C-group	S-group	P
TG(mg/g 肝)	93±22	80±29	ns

表 3. 肝臓組織学的評価

	C-group	S-group	P
NAS	5.5±0.6	4.0±1.1	**
脂肪変性	1.0±0.0	0.9±0.3	ns
肝小葉炎症度	2.5±0.6	1.6±0.7	*
風船様変性度	2.0±0.0	1.6±0.5	ns
線維化度(%)	0.7±0.2	0.8±0.2	ns
炎症度(%)	7.6±0.8	6.9±1.5	ns

値は平均±SD, *: P<.05, **: P<.01

(2) 我々は第一に文献調査として慢性肝疾患での栄養状態、脂肪酸摂取や脂肪酸代謝産物の影響のレビューを行い、アルコール性肝疾患と非アルコール性肝疾患での脂質栄養の展望を考察した。

さらに臨床研究として日本人男性健診受診者において NAFLD の進行マーカーとされている血清サイトケラチン 18 (CK18) と脂肪肝および血中脂肪酸組成を分析し、生化学検査値等、血清脂肪酸組成や栄養摂取状況との関連を検討した。その結果、CK18 は ALT と血中 DGLA (Dihomo- γ -linoleic acid) は相関し、ALT, AST, BMI との関連を認めた。

これらの結果から、

(1) HSC におけるオメガ 3 系脂質メディエータである RevD1 の影響を検討したところ、HSC でのコラーゲン産生がレゾルビン添加で抑制されていることが見出されたものの、細胞遊走性について変化は認めらず、むしろ PG の抑制傾向がみられた。これらの機序についてはさらに詳細に解明されることが望まれた。

(2) 慢性肝疾患予防をめざし健診受診者のうち脂肪肝が疑われる男性を対象に CK18 と脂肪肝および血中脂肪酸組成の関連を検討したところ、CK18 は ALT と血中 DGLA は相関し、ALT, AST, BMI との関連を認めた。このことから体内での脂肪合成や食事脂肪酸などが影響する脂質代謝異常が NAFLD の進行に関連すると考えられた。したがって肥満や食事脂肪酸の是正ならびに抗酸化ビタミンの摂取は NAFLD 進行に有効ではないかと推察された。

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 3 件)

① Tabuchi M, Tomioka K, Kawakami T, Murakami Y, Hiramatsu M, Itoshima T, Sugawara S, Kawashima A, Okita M, Tsukamoto I. Serum cytokeratin M30 level and its correlation with nutritional parameters in middle-aged Japanese males with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), *J Nutr Sci Vitaminol*, 56,271-278, 2010,

② 富岡加代子, 川上貴代, 田淵真愉美, 笹埜三世里: 非アルコール性脂肪性肝疾患患者の栄養管理: 症例による病態栄養講座第 66 回, 栄養評価と治療, 27 (3) 2010.

③ 富岡加代子, 田淵真愉美, 川上貴代: 慢性肝疾患の病態栄養とその管理, 成人病と生活習慣病 42, 217-224, 2012.

[学会発表] (計 10 件)

① 田淵真愉美, 川上貴代, 富岡加代子, 健診における脂肪肝の性差に関する検討, 第 57 回日本栄養改善学会学術総会, 2010 年 9 月 11 日 (女子栄養大学・坂戸市)

② Kawakami T, Murakami Y, Tomioka K, Tabuchi M, Katayama K, Okita M: Supplementation of antioxidative vitamins treatment for nonalcoholic steatohepatitis. 7th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition, Jun 8, 2011, Bangkok, Thailand.

③ Tomioka K, Tabuchi M, Murakami Y, Kawakami T, Nakajima N, Okita M: Trans-fatty Acid Compositions of Serum Phospholipids in Middle-aged Japanese Males. 7th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition, Jun 7, 2011, Bangkok, Thailand.

④ 川上貴代, 片山敬子, 村上泰子, 富岡加代子, 田淵真愉美 (2011): 株化肝星細胞活性化に及ぼす亜鉛動態の影響, 第 65 回日本栄養・食糧学会大会, 2011 年 5 月 15 日, お茶の水女子大学, 文京区.

⑤ 川上貴代, 岡村愛香, 佐藤由佳, 大坂敬子, 田淵真愉美, 富岡加代子: 亜鉛欠乏が誘導する肝星細胞活性化における活性酸素の影響, 第 8 回日本栄養改善学会中国支部学術総会, 2012 年 7 月 8 日, 島根県立大学, 松江市

[図書] (計 1 件)

① Kawakami T, Murakami Y, Okita M: Chapter 41 Dietary fatty acids and alcoholic liver disease. 'Alcohol, Nutrition, and Health Consequences', Ronald R. Watson, Victor Preedy and Sherma Zibadi eds, 533-543 (2013) Humana Press, New York.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

① 川上貴代, 脂肪肝を防いで肝心要の肝臓守ろう, 山陽新聞生き生き栄養楽, 2012 年 7 月 21 日, 山陽新聞夕刊

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 (笹川) 貴代 (KAWAKAMI-SASAGAWA TAKAYO)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号: 10254567

(2) 研究分担者

湯浅明子 (YUASA AKIKO)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・

准教授

研究者番号: 90295709

(3) 連携研究者

村上泰子 (MURAKAMI YASUKO)

福山大学・生命工学部・講師

研究者番号: 90326413

垣渕直子 (KAKIBUCHI NAOKO)

香川短期大学・生活文化学科・准教授

研究者番号: 70310886