

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500969

研究課題名(和文) 脂肪性肝炎モデルを用いた抗酸化物質投与の発症予防及び治療効果について

研究課題名(英文) The onset-preventing and suppressive effects of antioxidants on non-alcoholic steatohepatitis in mice

研究代表者

中村 強 (Nakamura, Tsuyoshi)

福岡女子大学・文理学部・教授

研究者番号：30581912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、近年では軽視できない重要な生活習慣病の一つとされているが、現状は的確な効果が見いだされていない。
本疾患は酸化ストレスに伴って発症することに着目し、病態モデルの開発および抗酸化物質の投与を中心にNASHへの発症予防に関する検討を行った。すなわち、新規な病態モデルであるSTAMマウスはヒト疾患に極めて近いこと、比較的短時間に、かつ安定して発症することを確認した。また本マウスを用い、ビタミンEならびにアミノ酸(イソロイシン、ロイシン)、D-グルコースの異性体であるD-アロースの投与の効果を検討し、STAMマウスの肝障害を有意に抑制することを認めた。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is considered to be one of the important lifestyle-related diseases that are not currently manageable medically. No definite clinical effects have as yet been recognized.

We noted that this disease develops with oxidative stress and thus conducted an examination on NASH prevention focusing mainly on the development of disease models and administration of antioxidants. It was confirmed that the disease which stably develops over a relatively-short time period in STAM mice, a new disease model, is very similar to the human disease NASH. We also examined the effects of administering vitamin E, amino acids (isoleucine, leucine), and D-allose, an isomer of D-glucose, using these mice and found that the administration of these substances significantly prevented liver disorders in STAM mice.

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：特殊栄養食品 非アルコール性脂肪肝炎 抗酸化物質 ビタミンE 希少糖アロース イソロイシン
ロイシン

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者らは、健常動物および病態動物を用い、抗酸化物質を積極的に投与した場合の影響やその効果を報告してきた (Nakamura T. et al: J. Parenter Enteral Nutr., (2007))。加えて、小腸切除後や制癌剤投与後の病態動物を用い、各種栄養素が細胞性免疫能に及ぼす影響も報告してきた Nakamura T. et al: J. Clin. Biochem. Nutr. (2009)。

抗酸化栄養素に関する成果の概要は、以下の通りである。

1) 健常ラットを用い、ポリフェノール類や抗酸化ビタミンの各々を通常量もしくは食事摂取基準量を上回る量で併用投与しても、栄養状態および肝機能等には影響をしないことを報告した。

2) 開腹ラットおよび小腸切除ラット、LPS 誘発敗血症マウスを用いた場合、両抗酸化物質の併用投与は栄養状態の改善、酸化ストレスの軽減、炎症性サイトカインの産生抑制に有効であり、またこれら病態動物の症状改善にも有効であることを報告してきた。なかでも、LPS 誘発敗血症マウスでは、上記の効果に加え、極めて有意な延命効果を見出すに至った。

2. 研究の目的

近年、問題視されているメタボリック症候群のうち、特に肝疾患関連 (肝脂肪化) は肥満や糖尿病などが“1st hit”となり、次いで酸化ストレスを主体とする“2nd hit”にて NASH および肝硬変等へと重症化することが知られている。現時点では、この進展への的確な治療法は存在しないが、上記“2nd hit”を軽減するための抗酸化療法は研究され、特にビタミン E 投与に関連した総説³⁾が報告されるに至っている。

しかし、治療法としての抗酸化療法の可能性は報告されているものの、未だ確立されてはいない。

また、使用する抗酸化物質はビタミン E 以外にも、ビタミン C、N-アセチルシステイン、プロブコールなどの報告がなされている。これらはサプリメントもしくは錠剤を用いた研究である。

さらに、日常の食生活において、我々が摂取する緑茶や赤ワインには抗酸化物質であるポリフェノール類 (カテキンおよびプロアントシアニジン) が含まれており、代表的な抗酸化食品として挙げられる。これら抗酸化食品の日常的な摂取が肝脂肪化や NASH の発症に及ぼす影響 (予防効果) は検討されていない。

3. 研究の方法

1) 病態モデルの確立

NASH の有効性を探索するためには、初めに適切な NASH 病態動物を用いる必要がある。そこで、本研究では新規な NASH モデル (脂

肪性肝炎-肝癌モデル) である STAM mice (米山博之 他: 特開 2009-178143 (2009)) を用いることとし、本モデルの有用性を以下の観点から検討した。

すなわち、本モデルの有用性について以下の点を確認することとした。

病態進行がヒト NASH と類似すること。

安定的に病態が発症するモデルであること。

これまでの遺伝子改変モデル等とは異なり、脂肪肝から NASH、肝繊維化などへの進展が短期間で進行すること。

なお、本モデルを用いた研究報告はほとんどないため、本研究では肝組織学的検査にて病変や肝機能の関連なども評価項目とした。また、病態動物としての有用性が検証されれば、今後、NASH の予防法や治療法の開発に向けた大きなツールとなり得ると判断した。

2) ビタミン E の予防効果の検証

ビタミン E は代表的な抗酸化性ビタミンの一つであり、日常摂取され、また安全性も高い。NASH の治療法としての抗酸化療法は研究され、特にビタミン E 投与に関連した総説⁴⁾が報告されるに至っている。しかし、ビタミン E の日常的な摂取が肝脂肪化や NASH 発症の予防に有効であるとの研究はなされていない。

3) その他の物質の NASH 予防効果の検証

活性酸素の産生阻害が期待される物質として希少糖の一つである D-アロース、および耐糖能や脂質代謝障害の改善が期待されるアミノ酸 (イソロイシン (Ile) やロイシン (Leu)) もこれまでの知見から判断し、NASH 発症の予防効果が期待される。

本研究では、抗酸化物質投与の併用がより強い効果 (相乗効果) を有するかの検討も課題の一つである。これらの成果は NASH 等への発症予防、さらには治療に向けた新規な知見となる。また、その成果は本疾患を対象とした「特殊栄養食品 (濃厚流動食)」の開発の基盤的研究にも繋がる。本科研究期間では実施が間に合わなかったが、現在実施に向け、計画している。

³⁾ 角田 圭雄 他: Function food 3(2), 117-121 (2009)

⁴⁾ 米山博之 他: 特許文献, 特開 2009-178143 (2009)

4. 研究成果

1) 病態モデルの確立

STAM マウスはヒト疾患に極めて近く、比較的短期間で発症する病態動物であることを見出した。

肝組織像を図 1 に示す。また、6 週齢で脂肪肝となり、早くとも 8 週齢で NASH となる

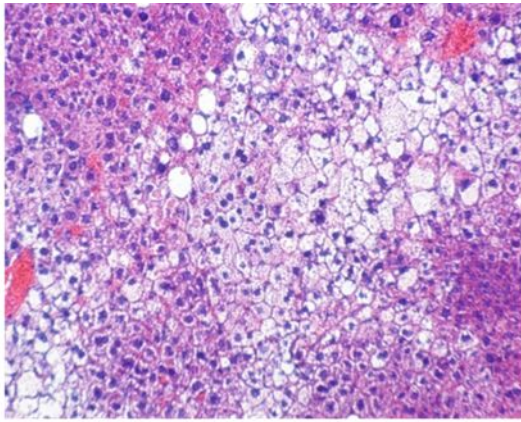


図1. STAM マウス肝臓組織画像

脂肪滴の沈着、炎症性細胞の浸潤、肝細胞の風船様腫大といったヒトNASHに極めて類似した組織像を示す。

こと、さらに 12 週齢以降は肝硬変や肝癌をも確認され、ヒト NASH の進展と極めて類似し、かつ、短期間で発症することが確認された。

2) 各種栄養素の NASH 発症予防効果

ビタミン E 投与群の肝機能検査値 (AST、ALT) は対照群に対し有意な低値を示した。

また、組織学的検査において、ビタミン E 投与群は肝脂肪化および小葉内炎症の項目において改善することが認められ、NASH の組織学的評価 (NAFLD activity score : NAS) においても改善傾向が見られた。

NAS (図 2) にて評価した結果、希少糖 D-アロース投与群はビタミン E 投与群と同様に、もしくはそれ以上に、NASH の発症抑制に有効であることを見出した。

また、D-アロース投与群の肝機能検査値及び脂肪肝は対照群に対して有意な低値を示した。

イソロイシン (Ile) 投与群やロイシン (Leu) 投与群の肝機能検査値は対照群およびバリン (Val) 投与群に比べ、低値傾向もしくは有意な低値を示した。

また、NAS を算出する際の評価項目である肝脂肪化 (score: 0-3)、小葉内炎症 (score: 0-3)、肝細胞の風船様腫大 (score: 0-2) において、低値を示し、全ての合計値である NAS も有意な低値を示した。

以上のように、新規な NASH 病態モデルである STAM マウスを用い、各種栄養素の有効性を探索した。その結果、抗酸化物質ビタミン E、希少糖 D-アロース、分岐鎖アミノ酸のなかでもイソロイシンとロイシンは、いずれも NASH 発症の予防効果、すなわち脂肪肝から NASH への進展を抑制する効果を有することが示唆された。

また、効果を示した栄養素はいずれも毒性に極めて小さい物質であることから、今後、

「特殊機能食品」あるいは「治療薬」としての応用が期待される。また、いずれの栄養素とも作用機序の解明が必要であり、これを継続して実施している。

3) 研究成果のまとめ

本科研費研究において、NASH の発症抑制に有効な物質を明らかにした。今後はこれらの物質の併用投与がより強い効果 (相乗効果) を有するかが検討課題である。加えて、その成果は NASH 等への発症予防や治療に向けた新規な知見となり、また本疾患を対象とした「特殊栄養食品 (濃厚流動食)」や「治療薬」の開発の基盤的研究にも繋がる。

現在、食品・医薬品応用に向けた、更なる探索研究を実施中である。

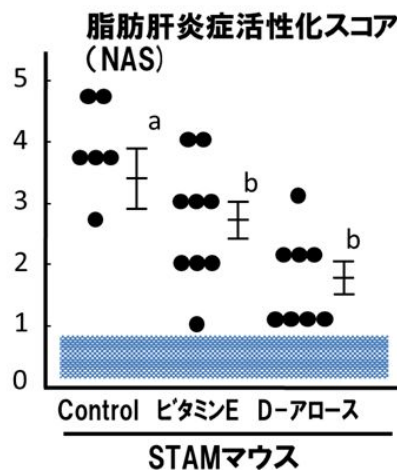


図2 D-アロース投与におけるNASに及ぼす影響

NASH病態動物(STAMマウス)のNASは著明な高値を示す。しかし、D-アロース投与によって、NASは軽減し、その効果は抗酸化物質であるビタミンEとほぼ同等、もしくはそれ以上であった。

NAS: 脂肪肝炎症活性化スコア (NAFLD activity score)

Control: n=6, ビタミンE: n=9, D-アロース: n=8

平均±SEM

異符号間で有意差あり、Steel-Dwass法にて(p<0.05)

■: 正常値 (n=6)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[学会発表](計8件)

飯田綾香、山元涼子、濱野桃子、上田京子、若松恭子、米山博之、中村 強、日本栄養・食糧学会、NASH 病態モデルマウス (STAMマウス) の病態評価、2014年6月1日、札幌

山元涼子、江頭美咲、飯田綾香、濱野桃子、米山博之、谷川 健、南 久則、徳田雅明、中村 強、日本栄養・食糧学会、希少糖 D-アロース投与による非アルコール性脂肪肝炎の発症抑制効果、2014年5月31日、札幌

飯田綾香、山元涼子、片桐義範、上田京子、若松恭子、米山博之、中村 強、日本アミノ酸学会、NASH 病態モデルマウス (STAM®マウス) の病態評価、2013 年 11 月 2 日、熊本

山元涼子、江頭美咲、飯田綾香、若松恭子、米山博之、谷川 健、南 久則、徳田雅明、中村 強、日本栄養・食糧学会九州・沖縄合同支部会、希少糖 D-アロース投与による非アルコール性脂肪肝炎の発症抑制効果について病態マウスを用いた基礎的検討、2013 年 10 月 18 日、福岡

真島 彩、境 良子、飯田綾香、片桐義範、上田京子、谷川 健、田中芳明、中村 強、日本栄養食糧学会、フルクトースの過剰摂取によるマウスの肝機能及び血清遊離アミノ酸組成に及ぼす影響、2013 年 5 月 26 日、名古屋

山元涼子、中村瑞穂、小川詩織、飯田綾香、片桐義範、若松恭子、米山博之、谷川健、田中芳明、中村 強、日本栄養・食糧学会、NASH 病態モデルマウスを用いたビタミン E 投与による発症予防効果の検討、2013 年 5 月 26 日、名古屋

山元涼子、中川歩美、中下千尋、片桐義範、黒田理恵子、上田京子、谷川 健、田中芳明、中村 強、日本栄養・食糧学会、ラットの血中遊離アミノ酸組成および肝機能に及ぼすフルクトース摂取の影響、2012 年 5 月 19 日、仙台

小島 渚、山元涼子、中川歩美、中下千尋、片桐義範、黒田理恵子、上田京子、谷川 健、田中芳明、中村 強、九州代謝・栄養研究会、フルクトース投与による NASH モデル作製法の検討、2012 年 3 月 24 日、鹿児島

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：非アルコール性脂肪性肝炎の改善剤および改善用栄養組成物

発明者：中村 強、山元涼子、飯田綾香、徳田雅明、大隈一裕

権利者：公立大学法人福岡女子大学
国立大学法人香川大学
松谷化学工業株式会社

種類：特許

番号：特願 2014-63903

出願年月日：2014 年 3 月 26 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 強 (ナカムラ ツヨシ)

公立大学法人福岡女子大学国際文理学部
食・健康学科 教授

研究者番号：30581912

(2) 研究分担者

山元涼子 (ヤマモト リョウコ)
公立大学法人熊本県立大学環境共生学部
食健康科学科 助手
研究者番号：50580429

(3) 連携研究者

田中芳明 (タナカ ヨシアキ)
久留米大学医学部安全管理部 教授
研究者番号：50188348

山田健一 (ヤマダ ケンイチ)
九州大学薬学部薬学研究科
生物物理薬学 准教授
研究者番号：60346806