

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780128

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎の新しい予防法の開発：ガーリック由来含硫化合物に着目して

研究課題名(英文)Effects of diallyl trisulfide derived from garlic on fatty liver model of mice.

研究代表者

深尾 友美 (HOSONO-FUKAO, Tomomi)

お茶の水女子大学・生命情報学教育研究センター・特任講師

研究者番号：20470172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ガーリック香気成分diallyl trisulfide(DATS)は、肝臓の解毒酵素GSTの増強とCYP2E1抑制を介した薬物性急性肝障害の予防、体熱産生誘導、脂質代謝改善など、様々な機能が報告されている。本研究では、非アルコール性脂肪性肝炎NASHを対象として、DATSが脂肪肝に与える影響について2つのマウスモデルを用いて検討した。その結果、いずれにおいてもDATS摂取により顕著な脂肪性肝炎の抑制効果は認められなかったが、肝脂質減少作用に関しては部分的に確認された。DATSと肝脂質蓄積との関連について、今後詳細に明らかとなることを期待する。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is liver inflammation of fat and fibrous tissue in the liver that progresses to liver cirrhosis. In this study, the effect of diallyl trisulfide (DATS), one of the garlic flavor components, on NASH model was investigated. At first, the effect of DATS on fatty liver induced by methionine-choline-deficient diet in mice was investigated. DATS treatment reduced the hepatic fat droplets and hepatic triglyceride content. DATS slightly suppressed the levels of AST and ALT in plasma. Second, the effect of DATS on fatty liver using another NASH model, STAM mice was investigated. Although DATS slightly suppressed the plasma TG concentration, no other prominent improvements of hepatic condition were found in this experiment. In conclusion, DATS partially suppressed the TG accumulation in fatty liver in experimental mice model, but the protective effect against the steatosis was weak in this experiment.

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：分子栄養学

キーワード：NASH ガーリック

1. 研究開始当初の背景

(1) 飲酒習慣がないにも関わらず、アルコール性肝炎と同じような肝臓の状態になる病気を「非アルコール性脂肪肝 (NASH)」という。肝細胞への脂質蓄積、肝組織の慢性炎症・線維化進展、さらには肝発癌にまで至る進行性の肝病変である。病態の解明が充分でないため 現在のところ有効な治療方法はないが、内臓脂肪蓄積を基盤とするメタボリックシンドローム、インスリン抵抗性・耐糖能異常、糖尿病、脂質代謝異常、薬物障害、酸化ストレスとの関連が指摘されている。

(2) 一方、病気の予防や改善を期待して、食品機能性研究が活発に行われている。申請者はガーリックの機能性研究に取り組んできた。ガーリックは古くから薬用効果を期待して食べられてきた歴史があり、抗酸化作用、抗肥満作用、抗糖尿病、抗血栓作用、抗がん作用を示すと言われている。その作用成分として、申請者らを含む国内外の研究グループはガーリックの加熱調理により発生するオイル状の含硫化合物 diallyl trisulfide (DATS, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{-SSS-CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) を報告した。DATS は 肝臓の解毒酵素 Glutathione S-transferase 増強と酸化酵素 CYP2E1 抑制を介して肝障害予防する、TRPV1 受容体を活性化して体熱産生を誘導する、脂質代謝異常を改善すること (未発表データ) ことを実験動物レベル・培養細胞レベルで見出している。

2. 研究の目的

(1) 前項で述べた DATS の機能性の対象は、NASH 予防で指摘される肝病態やメタボリックシンドローム等と対応している。このようなことから DATS の摂取が NASH の治療や予防に応用できると考えた。

本研究は、DATS による NASH の予防と治療の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト NASH の発症経路全体の表現型・分子機構などに完全に合致するモデル動物は現在のところ知られていないが、NASH 関連モデル動物として各種のマウスが多く利用されている。実験 1 として、メチオニン及びコリン無添加飼料 (Methionine and Choline deficient Diet, MCD) は脂肪肝の動物モデルで一般的に使われる飼料で、ヒトの NASH 症状に類似した状態をつくることできるといわれている。一般的に MCD 食は、タンパク源をアミノ酸混合としてメチオニンを配合しない、ビタミンとして利用される重酒石酸コリンまたは塩化コリンを配合しないという考え方で設計されている。メチオニンとコリンが欠乏するとリポタンパク質 very low density lipoprotein (VLDL) の合成

が阻害され、肝臓でトリグリセリドが増加するため脂肪の蓄積が起こり、結果的に脂肪肝となる。MCD 食の継続投与により、体重減少、肝障害マーカーの上昇、肝臓での脂質過酸化・脂肪変性・炎症などがみられる。DATS に関するこれまでの報告から、DATS の摂取が NASH を予防・改善する可能性が考えられた。そこで DATS が NASH モデルマウスの病態発症を予防するか否かを明らかにするため、MCD 食摂取マウスを用いて NASH モデルを作成し、DATS を長期投与の影響を非投与群と比較した。

(2) 6 週齢雄性 C57BL/6Ncr マウスを日本エスエルシー株式会社から購入した。マウスは、室温 25 °C、明期 12 時間暗期 12 時間の照明周期に設定された飼育室に搬入後、環境順応させた。本実験開始 1 日目に、Control-Corn oil 群 5 匹、Control-DATS 群 6 匹、MCD-Corn oil 群 8 匹、MCD-DATS 群 6 匹の 4 群に分けた。MCD 群には MCD 食を投与し、Control 群にはメチオニン及びコリン含有の Control 食を給餌した。Corn oil 群は corn oil 50 μl を、DATS 群は DATS 1 mg (5.6 μmol) を corn oil 50 μl に溶解したサンプルを本実験開始 1 日目より実験終了まで週 3 回胃ゾンデ投与した。なお、DATS は有機合成し HPLC にて純度 99% 以上に精製されたものを使用した。本実験開始 36 日目にすべてのマウスを屠殺し、解剖を行って肝臓及び血液を採取した。得られた試料を用いて、肝障害や脂質に関わる血漿パラメータ、肝総脂質、肝病理検査、肝 GST 活性等を測定した。測定したデータは平均値 \pm SD もしくは平均値 \pm SE で表した。各群間の差は一元配置分散分析にて統計処理を行い、有意差が認められれば、その後 Steel-Dwass の多重比較検定を行い群間の有意差を検定した ($p < 0.05$)。これらの統計分析には、SPSS16.0 J を用いた。本実験は、国立大学法人お茶の水女子大学動物実験委員会による審査と承認を受け、関連の規則に従って実施した。

(3) 実験 2 では、MCD 食モデルに替わる別の方法として、ヒト NASH に類似した病態を安定的に発症するとされる STAM マウスを用いて、DATS 摂取による脂肪肝抑制効果について検討した。STAM マウスは脂肪肝から肝炎、線維化、肝癌までの進行がヒト NASH と類似した病態進行で発現するモデルマウスとして、株式会社ステリック再生医科学研究所より提供されている。本マウスは 1st hit としての streptozotocin 投与と継続的な 2nd hit として的高脂肪食負荷の組み合わせにより病態を惹起するため、遺伝子改変を伴わないことを特徴とする。NASH の予防法や治療法の評価ツールとして近年注目を集めており、現在国内外の研究機関で使用され始めている。本実験ではこの STAM マウスに DATS を継続的に投与し、非投与群と比較することで、脂肪肝を

中心とした肝臓に対する DATS の効果を検討した。

(4)4 週齢雄性 STAM マウス(C57BL/6J)を株式会社ステリック再生医科学研究所から購入した。対照として、4 週齢雄性 C57BL/6J 正常マウスを購入し Control 群とした。各マウスは、室温 25 °C、明期・暗期ともに 12 時間の照明周期に設定された飼育室に搬入後、環境順応させた。その間、Control 群には通常食 CE-2 を、STAM マウスには同社製の高脂肪食 High Fat Diet (HFD)32 を給餌した。本実験開始 1 日目に Control 群 10 匹、STAM-Corn oil 群 10 匹、STAM-DATS 群 10 匹の 3 群に分けた。Control 及び STAM-Con oil 群は corn oil 50 μ l / 20 g b. w. を、STAM-DATS 群は DATS 0.1 mg (0.56 μ mol) を corn oil 50 μ l に溶解したものを本実験開始 1 日目より実験終了まで週 3 回ゾンデで胃内強制投与した。解剖予定時刻 24 時間前から絶食とし、本実験開始 25 日目に全群を解剖し、血液の採取、肝臓、脾臓、腎周囲脂肪をただちに摘出した。得られた試料は実験 1 と同様に解析した。

4. 研究成果

(1) MCD モデル：体重及び肝重量

各群の平均体重及び肝重量を Table 1 に示した。Control-Corn oil 群は CC 群、Control-DATS 群は CD 群、MCD-Corn oil 群は MC 群、MCD-DATS 群は MD 群 と表記した。体重及び肝重量は MC 群及び MD 群で顕著に低かった。一方で、肝/体重比は全群で差はみられなかった。

Table 1

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Liver weight (g)	Liver index (%)	Average food intake (g/day)
CC	22.4 \pm 0.75 ^a	28.2 \pm 0.59 ^a	1.4 \pm 0.07 ^a	4.8 \pm 0.18 ^a	3.34 \pm 0.09 ^{ab}
CD	21.9 \pm 0.94 ^a	27.0 \pm 3.18 ^a	1.4 \pm 0.17 ^a	5.2 \pm 0.32 ^a	3.22 \pm 0.21 ^a
MC	22.4 \pm 1.06 ^a	15.4 \pm 0.75 ^b	0.8 \pm 0.11 ^b	5.3 \pm 0.57 ^a	4.46 \pm 0.86 ^b
MD	22.7 \pm 0.81 ^a	14.7 \pm 0.78 ^b	0.8 \pm 0.04 ^b	5.3 \pm 0.30 ^a	3.29 \pm 0.63 ^{ab}

(2) MCD モデル：血漿中のアミノトランスフェラーゼ活性

血漿中の AST 及び ALT 活性を Fig.1 に示した。AST/ALT 比は、CC 群で 2.15 \pm 0.04、CD 群で 2.69 \pm 0.47、MC 群で 1.03 \pm 0.09、MD 群で 1.13 \pm 0.09 だった。AST 及び ALT は肝細胞の変性・壊死に伴い逸脱し血中で上昇する酵素で、ヒト NASH では一般に ALT 優位の軽度上昇を認め、NASH における AST/ALT 比は通常 1 未満である。CC 群と CD 群の AST 及び ALT 活性は、正常肝同様 AST 優位 (AST>ALT) であった。CC 群と CD 群を比較して ALT・AST とともに差はなく、DATS 摂取による肝障害等の副作用は見られないことを確認した。

CC 群と比較して、MC 群及び MD 群では AST・ALT とともに顕著に高値を示した。AST/ALT 比は 1 未満とはならなかったものの、ALT 優位の傾向が確認された。MC 群-MD 群間において統計学的に有意な差はみられなかったものの、DATS 摂取によりこれらアミノトランスフェラーゼ活性は低値を示す傾向となった。

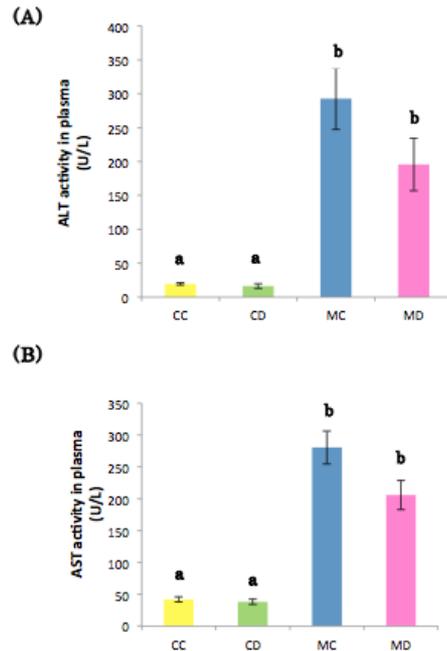


Fig.1 血漿中の血漿中の (A) ALT 活性 (B) AST 活性

(3) MCD モデル：肝臓と血漿中の中性脂質量及び総コレステロール量

血漿中の中性脂質及び総コレステロール濃度を Fig. 2 に示し、肝臓中の中性脂質量を Fig.3 に示した。血漿中の TG 濃度は MD 群で、TC 濃度は MC 及び MD 群で顕著に低かった。肝臓中の TG 量は MCD 食群で顕著に高値を示したが、DATS 摂取により低下する傾向が見られた。

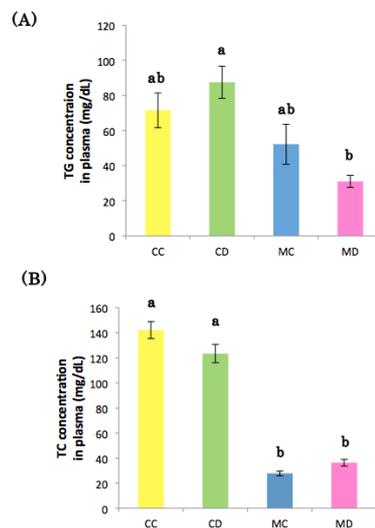


Fig.2 血漿中(A) TG 及び(B) TC 濃度

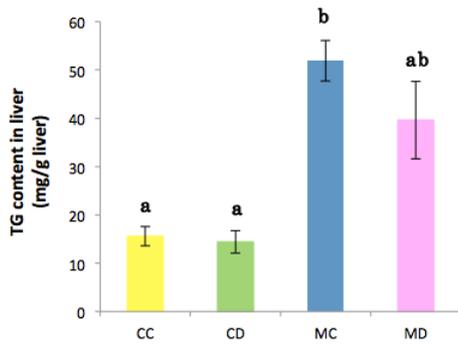


Fig. 3 肝臓中の中性脂質量

(4) MCD モデル：肝臓の病理組織学的検査

肝組織から切片を作製し、HE 染色したものを光学顕微鏡にて観察した。CC 及び CD 群においては DATS 投与の有無で組織像に大きな違いは見られなかった。一方、MC 群では、染色したすべてのマウスで一部の肝実質細胞の壊死と脱落、空胞化など、著しい損傷が確認された。MD 群では組織の一部において損傷が見られたが、MC 群より損傷の程度は小さく、正常な肝実質細胞が観察されるなど CC 群に近い組織像が得られた（図は省略）。

さらに、肝組織切片の Oil red O 染色像を Fig. 4 に示した。MC 群では、大滴性の脂肪変性が主体の脂肪沈着がすべての個体で認められた。一方、MD 群では MC 群と比べて脂肪滴のサイズが小さく、脂肪変性の程度が低かった。

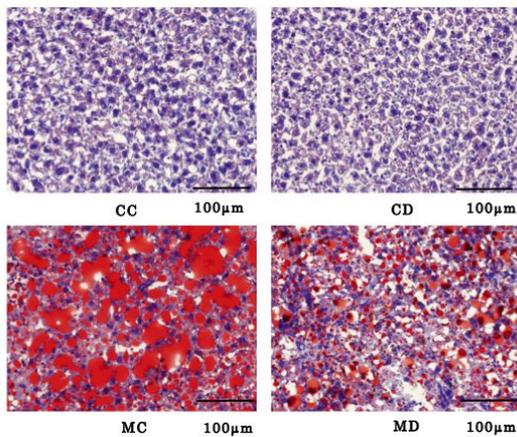


Fig. 4 Oil red O 染色肝組織像

(5) MCD モデル：第二相解毒酵素誘導活性

肝臓中の GST 誘導活性を Fig. 5 に示した。CC 群に対して CD 群で GST 活性が高い傾向が確認できた。MCD 食群においては、DATS 摂取による顕著な違いはみられなかった。

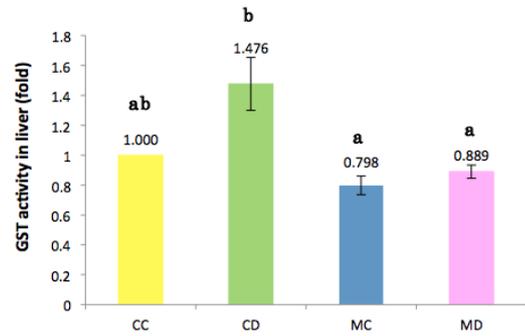


Fig. 5 肝臓の GST 活性

(6) STAM マウス：体重及び臓器重量

実験 1 において、MCD 食を摂取させたマウスの肝臓に対する DATS の影響について検討を行った。その結果、DATS の摂取では血漿中アミノトランスフェラーゼ活性の抑制と、肝臓中 TG 量、大滴性の脂肪滴が減少する傾向がみられた。

そこで本章では、MCD 食モデルに替わる別の方法として、ヒト NASH に類似した病態を安定的に発症するとされる STAMTM マウスを用いて、DATS 摂取による脂肪肝抑制効果について検討した各群の体重及び臓器重量を

Table 2 体重及び臓器重量

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Average food intake (g/day)	Liver (g)	Liver index (%)	Perirenal fat (g)	Perirenal fat index (%)	Spleen (g)	Spleen index (%)
Control	19.0±0.91 ^b	22.2±1.02 ^b	4.28±0.10 ^a	0.91±0.08 ^a	4.10±0.19 ^a	0.11±0.06 ^a	0.50±0.28 ^a	0.036±0.01 ^a	0.16±0.04 ^a
STAM	13.3±1.96 ^a	16.6±2.67 ^a	4.54±0.98 ^a	1.26±0.15 ^b	7.77±1.48 ^b	0.23±0.12 ^a	1.35±0.53 ^b	0.150±0.06 ^b	0.93±0.48 ^b
STAM-DATS	13.1±0.86 ^a	15.9±2.21 ^a	4.12±0.72 ^a	1.15±0.22 ^b	7.29±1.40 ^b	0.20±0.12 ^a	1.19±0.61 ^b	0.142±0.1 ^b	0.91±0.59 ^b

Table 2 に示した。なお、Control 群は Cont 群、STAM-Cornoil 群は STAM 群、STAM-DATS 群は DATS 群 と表した。摂餌量は全群で差はなかったものの、最終体重は STAM マウスと比較して Cont 群で有意に高かった。STAM マウスでは、肝肥大及び腎周囲脂肪の割合増加、脾臓の腫大が認められ、肝臓に関しては肉眼的観察においても一部でクリーム色のまだら模様が確認できた。これらは DATS 群でも同様であった。

(7) 血糖値

24時間絶食させた後の血糖値を Fig. 6 に示した。Control 群と比較して、STAM 群及び DATS 群で顕著に上昇した。STAM マウスは生後すぐに streptozotocin を投与されており、膵臓ランゲンハルス島の細胞が特異的に破壊されることで高血糖値を示す。この著しい高血糖は DATS 摂取により若干低下する傾向が見られたものの、顕著な差ではなかった。

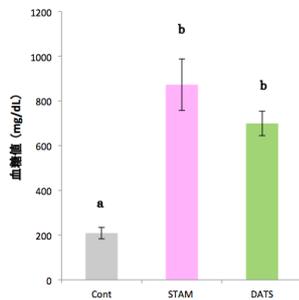


Fig 6 24 時間絶食後の血糖値

(8) 血漿中のアミノトランスフェラーゼ活性

血漿中の AST 及び ALT 活性を Fig. 7 に示した。Cont 群と比較して STAM 群及び DATS 群において AST は顕著に上昇し、ALT は上昇傾向が見られた。

(9) 肝臓と血漿中の中性脂質量及び総コレステロール量

血漿中の中性脂質及び総コレステロール濃度を Fig. 9 に示し、肝臓中の中性脂質量を Fig. 10 に示した。血漿中 TC 量は STAM 群及び DATS 群において、血漿中 TG 量は STAM 群で顕著に増加した。DATS 摂取により血漿中 TG 量は若干減少する傾向があったものの、統計学的に有意な差ではなかった。肝臓中の中性脂質量は個体差が大きく、全群において差は見られなかった。

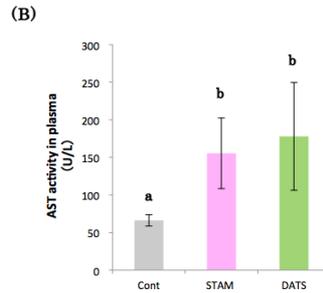
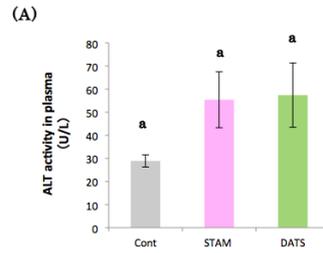


Fig. 7 血漿中(A) ALT 活性 (B)AST 活性

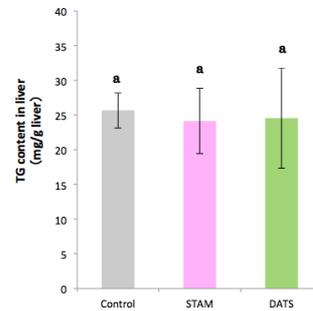


Fig. 8 血漿中(A) TG 濃度 (B) TC 濃度

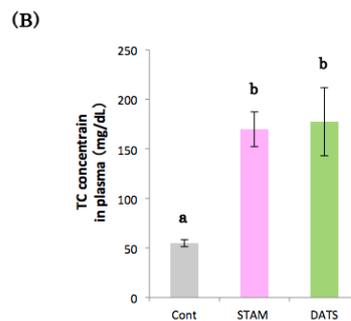
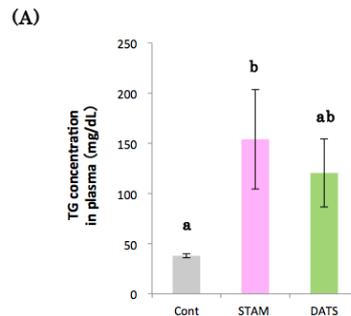


Fig. 9 血漿中(A) TG 濃度 (B) TC 濃度

(10) 肝臓の病理組織学的検査

肝組織切片を HE 染色、PAS 染色、Oil red O 染色し、光学顕微鏡にて観察した結果をそれぞれ Fig. 10 に示した。なお、掲載した組織

像は、典型的な組織像を全個体の中から選んでいる。

HE 染色及び PAS 染色の結果、STAM 群及び DATS 群ではすべての個体で肝細胞の風船様膨化が多数観察され、さらには炎症細胞の浸潤と線維化と推測される所見も確認された。組織像中の白く抜けて見える空胞化部分は脂肪滴であるが、STAM 群、DATS 群ともに脂肪化は軽度であった。なお、Cont 群においては微小な脂肪滴は見られたが、肝細胞の ballooning や炎症所見は確認されなかった。

Oil red O 染色の結果、STAM 群、DATS 群ともすべての個体で微小な脂肪滴が観察された。Cont 群では微小な脂肪滴が肝小葉全体に分布しているのに対し、STAM 群及び DATS 群では脂肪滴の分布が偏在していた (図は省略)。

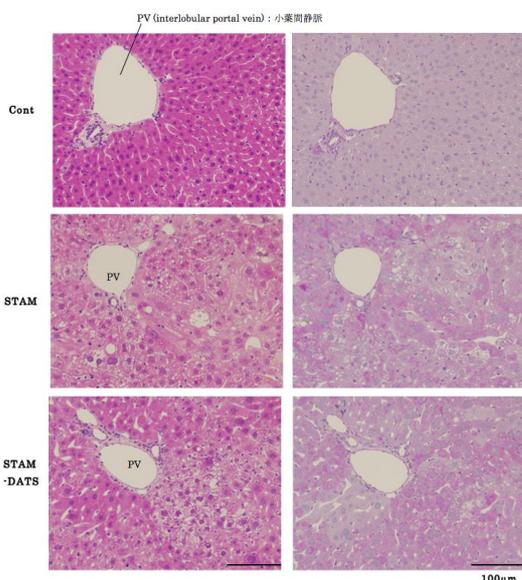


Fig.10 門脈域付近の肝組織像 (左: HE 染色、右: PAS 染色)

(11) まとめ

実験 1 として、メチオニン・コリン欠乏食摂取により誘発させた脂肪肝モデルマウスを用いて検討を行った。5 週間の MCD 食摂取による影響として、脂肪肝の誘発及びアミノトランスフェラーゼの逸脱を指標とした肝損傷が認められた。これに対して、DATS 投与により肝臓中 TG 量は減少する傾向が見られた。特に、肝臓の組織病理学的所見では DATS 摂取により大滴性脂肪滴の減少が確認されたことから、DATS はメチオニン・コリン欠乏による脂肪肝に対して、穏やかな脂肪肝改善効果を有する可能性が新たに示された。

続いて、DATS が示す脂肪肝改善効果をさらに追究するために、異なる NASH モデルマウスを用いて検討を行った。NASH モデルマウスとして市販されている STAM マウスを用いて検討した。STAM マウスは、MCD 食摂取 NASH モデルとは異なり、病態惹起の背景にインスリン抵抗性を有することを特徴とする。本実験において、STAM マウスは 8 週齢で肝肥大及び脾臓の腫大、AST 上昇、血中脂質増加、著

しい高血糖を示した。これに対して DATS の摂取は血漿 TG 量の抑制傾向を示したものの、その他顕著な改善作用は見られなかった。この理由として、DATS 投与が少量であったことや、脂肪肝よりもさらに炎症が進行した脂肪性肝炎の病態にあり、DATS 摂取で肝炎抑制には至らなかったことが考えられた。

本研究では、食品成分の有用性に関する研究の一端として、ガーリック香気成分 DATS の脂肪肝改善効果を検討した。一連の結果から、DATS 摂取により脂肪肝抑制効果は顕著には認められなかったものの、肝脂質減少作用に関しては部分的に確認された。DATS と肝脂質蓄積との関わりが示唆されたことから、本知見が DATS と脂質代謝の関連解明に結びつくことを期待する。

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 2 件)

Suda S, Watanabe K, Tanaka Y, Watanabe K, Tanaka R, Ogihara J, Ariga T, Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T., Identification of molecular target of diallyl trisulfide in leukemic cells., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 査読あり、2014, *in press*

Watanabe K, Hosono T, Watanabe K, Hosono-Fukao T, Ariga T, Seki T. Diallyl trisulfide induces apoptosis in Jurkat cells by the modification of cysteine residues in thioredoxin. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 査読あり、2014, *in press*

[学会発表](計 1 件)

松田悠、細野(深尾)友美、細野崇、森光康次郎、ガーリック香気成分 diallyl trisulfide が非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスに及ぼす影響、第 28 回 日本香辛料研究会 学術講演会、2013 年 11 月、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深尾 友美 (HOSONO-FUKAO, Tomomi)
お茶の水女子大学・生命情報学教育研究センター・特任講師
研究者番号: 20470172

(2) 研究分担者

なし