

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501010

研究課題名(和文)脂質代謝と酸化ストレス制御間のクロストーク機構に及ぼす食餌中脂質組成の役割

研究課題名(英文)Role of dietary lipid composition on the crosstalk mechanism between lipid metabolism and oxidative stress regulation.

研究代表者

上裕 俊法 (KAMISAKO, Toshinori)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20233934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Nrf2系による酸化ストレス制御と脂質代謝のクロストークを検討した。食餌中脂質の質的差異は脂肪酸分解、コレステロール排泄、コレステロール(CH)異化にNrf2系を介し影響した。CH吸収とNrf2系の関係を検討し、CH吸収量の変化はLXRの標的遺伝子である脂肪酸代謝関連遺伝子、CHトランスポーター、胆汁酸合成酵素を制御しており、Nrf2はLXRを介した脂質代謝制御に関与している事を見出した。Nrf2アクチベーターの1つ6-methylsulfinylhexylisothianate(6-MSITC)はNrf2依存性に肝への脂肪沈着とサイトカイン産生を抑制している事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The crosstalk between lipid metabolism and regulation of oxidative stress by Nrf2-keap1 system was examined. Dietary fatty acid composition affected lipid metabolism, furthermore transcription factor Nrf2 influenced activation of fatty acid oxidation, cholesterol excretion and catabolism by n-3 unsaturated fatty acid rich fish oil. There were correlations between cholesterol absorption and Nrf2 system. The changes of the quantity of cholesterol absorption affected gene expression related to fatty acid metabolism (FAS, ACC1, SREBP-1c, SCD-1c and CD36), cholesterol transport (Abcg5/abcg8), bile acid synthesis (Cyp7a1) and Nrf2 participated in these lipid metabolism which were controlled by LXR. The Nrf2 activator influenced lipid metabolism. 6-methylsulfinylhexylisothianate (6-MSITC), one of Nrf2 activators, controlled lipid deposition and cytokine production in the liver. High fat induced fatty liver was improved through Nrf2 system.

研究分野：代謝学

キーワード：酸化ストレス 脂質代謝 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

食餌中の脂質含量や油脂の脂質組成を変化させると脂質代謝の中心臓器である肝臓での脂質代謝や血清脂質に影響を及ぼす事が知られている。さらに飽和脂肪酸であるパルミチン酸は直接糖質・脂質代謝に影響を及ぼすのみならず、ミトコンドリア由来の reactive oxygen species(ROS)産生を介した酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食餌中の脂質の量的質的变化が脂質代謝、エネルギー代謝のみならず酸化ストレスに影響を及ぼすと考えられている。生体には酸化ストレスに対して防御するシステムが構築されている。このシステムでは転写因子である NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-keap1 系がセンサーとしてその発現の制御をおこなっている。

我々は食餌中脂質の量的質的な差と Nrf2-keap1 系の関連に注目し、研究開始当初までに Nrf2 ノックアウトマウス (Nrf2KO)では摂取する油脂の脂質組成の変化による脂質代謝への反応が乏しい事を見出した。これらの結果から脂質代謝と Nrf2-keap1 系による酸化ストレス制御の間にクロストークが存在すると推測している。

2. 研究の目的

本研究では肝臓における脂質代謝と Nrf2-keap1 系による酸化ストレス制御の間におけるクロストークを解明する事を目的とし、食餌中の脂質の量的、質的差異の脂質吸収・代謝に及ぼす影響、転写因子 Nrf2 の脂質吸収・代謝に及ぼす影響、コレステロール吸収と Nrf2-keap1 系による酸化ストレス制御の関係、Nrf2 アクチベーターによる酸化ストレス制御系活性化は脂質代謝に如何なる影響を明らかにした。

3. 研究の方法

(1)食餌の脂質組成が脂質吸収・代謝および Nrf2-keap1 系に及ぼす影響
脂肪酸組成の異なる各種油脂摂取が脂

質代謝と Nrf2 系による酸化ストレス制御に及ぼす影響を系統的に検討した。

8週令雄性 Nrf2KO とコントロールとなる雄性 C57BL/6J マウス (Wild type) を用い標準飼料 (AIN-93) に準拠して作成した脂肪酸組成の異なる食事 (10%大豆油、10%ラード、10%魚油含有飼料) にて4週飼育した後、血液、小腸、肝臓を採取し、体重、肝臓重量、下記の血清中生化学分析、肝臓組織像の検討、肝臓の各種脂質測定を行った。小腸および肝臓の脂質代謝関連および酸化ストレス制御系関連遺伝子産物の発現を定量した。

(2) 高コレステロール食と NPC1L1 阻害剤 ezetimibe の効果

コレステロール吸収が Nrf2 による酸化ストレス制御系に及ぼす影響を検討した。8週令雄性 Nrf2KO と Wild type を AIN-93 に準拠して作成した飼料にて飼育した群、各々のコレステロール吸収に及ぼす影響を検討するために1%コレステロールを加えた食餌を与えた群、各々に ezetimibe (0.005%)含有した食餌を与え小腸でのコレステロール吸収を阻害した群を作成した。4週飼育した後、(1)と同様の検討を行った。

(3) Nrf2 系の脂質代謝に及ぼす影響の検討

Nrf2 アクチベーターである oltiplaz(OPZ), 6-methylsulfinylhexylisothianate(6-MSITC)を投与したマウスにおける肝脂質代謝と高脂肪食誘発脂肪肝の改善作用を検討した。

1. oltiplaz の効果:雄性 Nrf2KO と Wild type 各々に、1) 4%大豆油食 12週間投与した群(C)、2) 4%大豆油食 8週間の

後 OPZ(10mg/kg/日)添加食 4 週間投与した群(C+O)、3)4%大豆油+20%ラード食 12 週間投与した群(H)、4) 4%大豆油+20%ラード食 8 週間の後、OPZ(10mg/kg/日)添加食 4 週間投与した群(H+O 群)を作成し 12 週目に肝と血液を採取し血清脂質と肝機能及び肝内脂質を測定した。肝の脂質胆汁酸代謝関連遺伝子の mRNA 発現を定量した。

2. 6-MSITC の効果：雄性 Nrf2KO と Wild type 各々に 1) 4%大豆油食 12 週間投与した群(C)、2) 4%大豆油食 8 週間の後に 6-MSITC (10mg/kg/日、4 回/週)腹腔内投与も 4 週間行った群(C+M)、3)4%大豆油+20%ラード食 12 週間投与した群(H)、4) 4%大豆油+20%ラード食 8 週間の後に 6-MSITC (10mg/kg/日、4 回/週)腹腔内投与も 4 週間行った群(H+M)を作成し、同様の計測を行った。

4. 研究成果

(1)食餌の脂質組成が脂質吸収・代謝および Nrf2-keap1 系に及ぼす影響

Wild type を脂肪酸組成の異なる食事 (10%大豆油、10%ラード、10%魚油含有飼料)にて飼育した場合、n-3 不飽和脂肪酸を多く含む魚油群にて血清、肝臓中の中性脂肪(TG)、コレステロール(CH)は有意に低く、肝臓および小腸での脂肪酸分解(PPAR α , ACOX など)、コレステロール代謝(LXR α , ABCG5/G8)、胆汁酸代謝(Cyp8b1, Cyp27a1, Baat, Bsep, Mrp2, Mrp3)関連の RNA 発現が亢進しており、脂肪酸組成の差は肝臓に加え小腸においても脂質・胆汁酸代謝に影響する事が明らかとなった。

Nrf2KO においてはこれらの遺伝子産物発現が Wild type に比べて高く、魚油

の効果は少なかったことから魚油による脂質・胆汁酸代謝への影響に Nrf2 系の関与が示唆された。

(2) 高コレステロール食と NPC1L1 阻害剤 ezetimibe によるコレステロール吸収抑制の効果

コレステロール吸収を Nrf2 による脂質代謝制御を検討した。

肝臓の脂肪沈着：Wild type、Nrf2KO と高コレステロール食において肝臓の中性脂肪とコレステロールの増加を認めた。Wild type では高コレステロール食ではマウスにおいて LXR α の標的遺伝子である脂肪酸代謝関連遺伝子(FAS, ACC1, SREBP-1c, SCD-1c, CD36)、コレステロールトランスポーター(Abcg5/abcg8)、胆汁酸合成酵素(Cyp7a1)の発現上昇を認め、ezetimibe 投与では発現低下を認めた。一方 Nrf2KO ではこれらの変化を認めなかった(表)。これらの事はマウスにおいて Nrf2 が LXR α を介した脂質代謝制御を起こしている事を示している。

(3) Nrf2activator の脂質代謝に及ぼす影響の検討

oltoplaz の効果

肝内脂質：Wild type で oltoplaz 投与にて TC 及び TG の減少は認めなかった。C+O 群に比して H+O 群 TC、TG の増加を認めたが Nrf2KO では変化を認めなかった。Nrf2KO で C 群に比して H 群で Nrf2 標的遺伝子(GCLC, GCLM), β 酸化(Acox1), CH 異化(Cyp27a1), VLDL アセンブリ及び分泌(MTTP)の遺伝子発現の増加を認めた。C+O 群に比して H+O 群では上記遺伝子に加えて β 酸化(PPAR α), CH 合成・排泄・異化(SREBP2, ABCA1, Cyp8b1, Cyp7b1)と CH 再吸収(NPC1L1), CAR 標的遺伝子(Cyp2b10)

の低下を認めた。H 群に比して H+O 群では SREBP2, ABCA1, MTP, Cyp27a1, BAAT, PPAR α , Acox1 の増加を認めた。Nrf2KO で CH 異化律速酵素(Cyp7a1)とその調節経路のレセプター(FGFR4)の発現調節不全を認めた。線維化マーカー(Collagen type Ia1)は Nrf2KO の C+O 群に比して H+O 群で低下を認めた。Nrf2KO では Wild type に比して肝臓の脂肪沈着、線維化が強かった。OPZ は組織学的には脂肪肝の改善作用は認めなかったが、OPZ 添加の基での高脂肪食が脂肪酸酸化、VLDL 分泌、コレステロール排泄や胆汁酸への異化の亢進に加え線維化の抑制を認めた。Nrf2KO の肝線維化に高脂肪食摂取と OPZ が相加的に関与していた。

6-MSITC の効果

Nrf2 標的遺伝子産物に対する効果: Nrf2 標的遺伝子である NQO-1, GCLC, Mrp4 は Wild type で C 群に比して H 群で増加し H+M 群で抑制された。一方 Nrf2KO で変化はなかった。

脂肪肝の改善: Wild type では肝内中性脂肪は C 群に比して H 群で増加を認め、H+M 群では低下を認めた。Nrf2KO では改善はなかった。肝組織像 (HE 染色) では Wild type で C 群に比して H 群で著明な脂肪滴を認めるも H+M 群で脂肪滴は減少していた。一方 Nrf2KO では改善はなかった。肝 mRNA レベルでは肝への脂肪酸取り込みと合成を担う遺伝子 PPAR γ , CD36, SREBP-1c も Nrf2 標的遺伝子と同様の発現変化の傾向にあった。さらに炎症マーカーである TNF α , MCP-1 の発現も同様の变化であった。以上の事から高脂肪食摂取下で 6-MSITC 投与によって Wild type では脂肪肝改善と炎症性サイトカインの改善傾向があったが Nrf2KO では改善が認められなかったことから 6-MSITC は Nrf2 依存性に肝への脂肪沈着とサイトカイン産生を抑制する事が明らかとなった。高脂肪食摂取マウ

スにて食品成分である 6-MSITC は Nrf2 を介して脂肪肝を改善した。

表. Hepatic expression of Nrf2 target genes and lipid metabolism-related genes in wild type and Nrf2KO mice.

	Wild type mice			Nrf2KO mice		
	Control	EZ	CH	Control	EZ	CH
Gclc	1.00 ± 0.22	0.49 ± 0.34	1.01 ± 0.13	0.50 ± 0.20	0.51 ± 0.16	0.34 ± 0.05 c
Ho-1	1.00 ± 0.38	0.43 ± 0.15	1.11 ± 0.23	0.73 ± 0.10	0.56 ± 0.11	0.51 ± 0.11
Ppara	1.00 ± 0.22	0.61 ± 0.13	1.69 ± 0.19 d	1.31 ± 0.16	1.16 ± 0.16	0.89 ± 0.11
Acox	1.00 ± 0.27	0.52 ± 0.10	1.78 ± 0.32 d	1.05 ± 0.19	0.80 ± 0.15	0.78 ± 0.13
Cpt1	1.00 ± 0.27	0.50 ± 0.10	1.37 ± 0.40 c	1.12 ± 0.18	0.97 ± 0.15	0.78 ± 0.13
Srebp-1c	1.00 ± 0.42	0.26 ± 0.06	2.03 ± 0.40 d	0.72 ± 0.16	0.58 ± 0.11	1.28 ± 0.18
Fas	1.00 ± 0.40	0.54 ± 0.11	0.72 ± 0.17	0.87 ± 0.20	0.90 ± 0.08	0.40 ± 0.05
Acc1	1.00 ± 0.24	0.55 ± 0.12	1.09 ± 0.14	1.08 ± 0.20	0.83 ± 0.11	0.58 ± 0.06
CD36	1.00 ± 0.31	0.34 ± 0.09	1.57 ± 0.33 d	0.84 ± 0.21	0.37 ± 0.07	0.78 ± 0.16
SCD1	1.00 ± 0.29	0.36 ± 0.05	1.84 ± 0.29 c	1.52 ± 0.43	0.76 ± 0.14	1.24 ± 0.31
Srebp-2	1.00 ± 0.19	0.79 ± 0.19	0.69 ± 0.12	0.95 ± 0.14	1.21 ± 0.13	0.47 ± 0.04 c
Hmg-CoA-R	1.00 ± 0.42	1.60 ± 0.57	0.86 ± 0.20	1.56 ± 0.38	1.70 ± 0.13	0.58 ± 0.07
Lxra	1.00 ± 0.17	0.57 ± 0.12	1.18 ± 0.15 c	1.08 ± 0.15	0.87 ± 0.13	0.71 ± 0.11
Abcg5	1.00 ± 0.34	0.47 ± 0.07	4.39 ± 1.11b,d	0.77 ± 0.07	0.63 ± 0.04	1.70 ± 0.19
Abcg8	1.00 ± 0.32	0.69 ± 0.12	4.52 ± 0.95 b,d	0.87 ± 0.11	1.00 ± 0.07	1.78 ± 0.26

- a $p < 0.05$ significant difference from mice fed with control diet.
- b $p < 0.01$ significant difference from mice fed with control diet.
- c $p < 0.05$ significant difference from mice fed with ezetimibe diet.
- d $p < 0.01$ significant difference from mice fed with ezetimibe diet.
- e $p < 0.05$ significant difference between genotypes.

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)

Toshinori Kamisako, Yuji Tanaka, Yoshizumi Kishino, Takanori Ikeda, Kazuo Yamamoto, Shiori Masuda, Hiroshi Ogawa Role of Nrf2 in the alteration of cholesterol and bile acid metabolism-related gene expression by dietary cholesterol in high fat-fed mice. J Clin Biochem Nutr 54(2):90-4.2014 (査読有)

Yoshizumi Kishino, Yuji Tanaka, Takanori

Ikeda, Kazuo Yamamoto, Hiroshi Ogawa, Yoshinori Iwatani, Toshinori Kamisako. Ezetimibe increases hepatic iron levels in mice fed a high-fat diet J Pharmacol Exp Ther 345(3):483-91 2013 (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

Yuji Tanaka, Toshinori Kamisako. Ezetimibe prevents diosgenin-induced cholestatic liver injury in mice. 2014AASLD Annual Meeting (Boston, USA) 2014

田中裕滋 池田高紀 山本和夫 小川博 上碓俊法 ワサビ由来 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネートはマウスの高脂肪食誘発性脂肪肝を Nrf2 依存性に改善する 第 50 回日本肝臓学会総会(ホテルニューオータニ 東京) 2014.6

田中裕滋 池田高紀 山本和夫 小川博 上碓俊法 エゼチミブ投薬によるジオスゲニン誘発胆汁鬱滞性肝障害の抑制効果 第 50 回日本肝臓学会総会(ホテルニューオータニ 東京) 2014.6

Yuji Tanaka, Toshinori Kamisako. Wasabi derivative 6-methylsulfinyl isothiocyanate, a potent Nrf2 activator, prevents the fatty liver produced by a high-fat diet but does not attenuate hepatic iron. 2013AASLD Annual Meeting (Boston, USA) 2013

田中裕滋 岸野好純 池田高紀 山本和夫 小川博 上碓俊法 高脂肪食摂取マウスにおけるエゼチミブ投薬による肝内鉄値増加 第 49 回日本肝臓学会総会(京王プラザ 東京) 2013.6

田中裕滋 池田高紀 山本和夫 小川博 上碓俊法 ワークショップ:胆汁酸研究の最近のシンポ 高脂肪食摂取 Nrf2 欠損マウスにおけるオルチプラズによる肝障害の改善効果 第 49 回日本肝臓学会総会(京王プラザ 東京) 2013.6

Yuji Tanaka, Toshinori Kamisako. The Nrf2 activator oltiplaz alters cholesterol and bile acid metabolism related genes expression via Nrf2-dependent and independent signal in mice fed a high-fat

diet. 2012AASLD Annual Meeting (Boston, USA) 2012

田中裕滋、池田高紀、山本和夫、小川博、上碓俊法 Nrf2 activator である ortiplaz は Nrf2 非依存性に脂質・胆汁酸代謝に影響を及ぼす 第 48 回日本肝臓学会総会(日航ホテル金沢 金沢) 2012.6

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上碓 俊法 (KAMISAKO Toshinori)

近畿大学医学部附属病院・教授

研究者番号: 20233934

(2) 研究分担者

田中 裕滋 (TANAKA Yuji)

近畿大学医学部附属病院・講師

研究者番号: 00465650

(3) 連携研究者

なし