

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580174

研究課題名(和文) 乱れた食生活が原因で惹起される肝臓の炎症反応：免疫・代謝機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of irregular eating on the hepatic inflammatory response in mice

## 研究代表者

大荒田 素子(OARADA, MOTOKO)

千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号：40211784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：食生活の乱れは、生活習慣病の原因となることが知られているが、その機構については不明な点が多い。近年、生活習慣病の発症・進展に炎症反応が深く関与していることが明らかにされてきている。そこで本研究では、現代人の不規則な食事(欠食やまとめ食い・ドカ食い)により誘導される炎症反応について知見を得ることを試みた。実験動物を絶食させた後、標準食(炭水化物70%)で復食させると、肝臓で炎症反応が誘導した。炎症の誘導には、TLR2シグナル経路の関与が認められた。予想に反して復食による炎症反応の誘導には、食事性脂質ではなく炭水化物、特にフルクトースよりもグルコースの影響が大きいことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Unhealthy eating behaviors increase the risk of metabolic diseases, but the underlying mechanisms are not fully elucidated. Because inflammation contributes to the pathogenesis of metabolic diseases, the objective of our present study was to address the effects of a fasting-refeeding regime, a model of irregular eating, on the hepatic inflammatory responses in mouse. Refeeding with a standard diet increased the liver expression of Tlr2 and proinflammatory mediators. These increases were attenuated in mice refed a low-carbohydrate/high-fat diet. TLR2 deficiency significantly attenuated the refeeding-induced increase in the liver expression of inflammatory genes. Dietary glucose, rather than fructose, plays a significant role in this increase. These findings suggest that an irregular eating behavior can elicit a liver inflammatory response, which is at least partly mediated by TLR2, and that dietary carbohydrates play critical roles in this process.

研究分野：栄養学

キーワード：栄養学 食生活 肝臓 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

現代人は多忙から、食事抜きやまとめ食いなど食事が不規則になりがちである。インスタント食品やレトルト食品の多用は人々の栄養状態を悪化させる。また「やせ願望」は無理なダイエットとリバウンドの繰り返しに陥りやすい。これら乱れた食生活と近年増加している生活習慣病との関係が指摘されている。申請者らも、ダイエットやリバウンドの実験モデルとして、マウスに絶食後、高タンパク質食(世界で最も実践されているダイエット食)による復食を施した。その結果、復食直後に肝実質細胞の変性・壊死が生じた。一方、長年の研究から、高タンパク質食を一定期間持続的に摂取しても肝傷害は発生しないことが知られている。これらの研究結果から、現代人の健康維持・疾病予防には、既存の栄養学的知識に加えて、食生活の乱れに起因する食事(食べ物)の栄養生理的效果について検討する必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

乱れた食生活による栄養生理的效果を解明し、その生理的效果が生体機能に及ぼす影響について知見を得ることを試みた。近年の研究から、心臓血管・代謝系疾患などの様々な生活習慣病の発症・進展に炎症反応が深く関わっていることが明らかにされてきている。そこで本研究では、乱れた食生活による肝臓での炎症反応の誘導と、肝機能障害について解析するところで、食生活の乱れと現代人の健康との関連について明らかにすることを試みた。尚、現代人の生活習慣を考慮して、乱れた食生活の代表例として、不規則な食事(欠食やまとめ食い)について実験をおこなった。

### 3. 研究の方法

(1) 総カロリー数が同じ標準食( -コーンスターチ 60% (w/w)、ショ糖 10%、カゼイン 15%、大豆油 5%) および低炭水化物/高脂肪食( -コーンスターチ 38% (w/w)、ショ糖 10%、カゼイン 15%、大豆油 8%、パーム油 8%) を当研究室で調製した。実験モデル(Balb/c系マウス、7週齢)を48時間絶食させた後、標準食もしくは低炭水化物/高脂肪食で復食(自由摂取)させた。その後、経時的に血液および肝臓を採取した。血中のグルコース、インスリン、遊離脂肪酸、alanine aminotransferase (ALT) および aspartate aminotransferase (AST) 濃度をキットにより測定した。肝臓から mRNA を抽出し、cDNA を作成後、リアルタイム PCR 法により自然免疫、炎症、ストレス、細胞傷害因子等の遺伝子発現を調べた。

肝臓で誘導される炎症反応に関与しているシグナル経路を確認する目的で、Toll-like receptor 2 (TLR2) 欠損マウス

を絶食させた後、標準食で復食させた。その後、経時的に血液、肝臓を採取し、上記(1)と同じ方法で炎症反応の誘導について検討した。

(2) ここ数十年における世界的な砂糖の需要の増加から、フルクトースの消費量が急増している。最近の研究から、フルクトースの長期間摂取が、低レベルの炎症、脂質代謝異常、およびインスリン抵抗性の原因になっていることが示唆されている。そのため食事性炭水化物の中でフルクトースは生活習慣病を初めとする様々な疾患の原因として注目を集めている。そこで本研究でも、食事性炭水化物の種類が復食に伴う炎症反応の誘導におよぼす影響について検討することを試みた。絶食したマウスに、様々な食餌性炭水化物( -コーンスターチ、グルコース、ショ糖、フルクトース、ガラクトース)を1種類だけ寒天で固めたものを復食させた。その後、経時的に血液、肝臓を採取し、上記(1)と同じ方法で炎症反応の誘導について調べた。

### 4. 研究成果

(1) 絶食後、復食時(0-17時間)の摂食量は、標準食を復食したマウスに比べて、低炭水化物/高脂肪食を復食したマウスで有意な増加が見られた。絶食により血中グルコース濃度は正常値の約1/2に低下した。復食2時間後には正常値の2倍近くまで増加し、その後、復食17時間後まで正常値より高い値を維持していた。復食2時間後のグルコース濃度は、標準食を復食したマウスで低炭水化物/高脂肪食を復食したマウスよりも高い値を示した。復食に伴い血中インスリン濃度も大きく増加したが、標準食を復食したマウスと低炭水化物/高脂肪食を復食したマウスとの間で有意差は生じなかった。血中遊離脂肪酸濃度は絶食により増加したが、復食により正常値に戻った。標準食を復食したマウスと低炭水化物/高脂肪食を復食したマウスとの間で顕著な差は認められなかった。

標準食を復食したマウスの肝臓で TLR2、炎症メディエーター(Cxcl10、Cxcl1、Cxcl2、Icam-1) および TLR シグナル抑制因子(A20、Atf3) 遺伝子の発現が増加した(図 1a,b)。増加のピークは、復食8-11時間後に生じた。一方、低炭水化物/高脂肪食を復食したマウスでは、復食に伴う TLR2 や炎症促進・抑制関連遺伝子の発現増大は、標準食を復食したマウスに比べて有意に軽減した。一方、脂肪組織での炎症誘導に関与していることが知られている TLR4 の遺伝子発現は、標準食および低炭水化物/高脂肪食を復食したマウスの肝臓で、低下していた。

TLR2 遺伝子の発現の増加と共に、TLRs の内因性リガンドである熱ショックタンパク質(Hspd1、Hmgb1、Grp94 など)の遺伝子発

現も、絶食-復食により肝臓で一時的に増加した。標準食を復食したマウスと低炭水化物/高脂肪食を復食したマウスとの間で、熱ショックタンパク質の発現増大に関しては、顕著な差は認められなかった。一方、肝臓を初めとする様々な臓器の傷害の指標である血中ALTおよびAST値も復食に伴い有意に(中程度に)増加した。ALTとAST値の増加の程度は、標準食を復食したマウスと低炭水化物/高脂肪食を復食したマウスとの間で差は認められなかった。

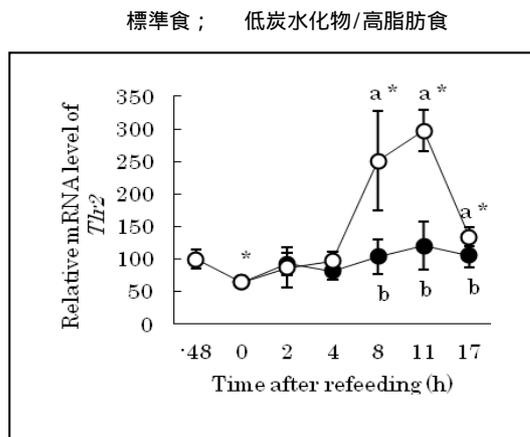


図1a 絶食-復食に伴う肝臓でのTLR2遺伝子の発現量

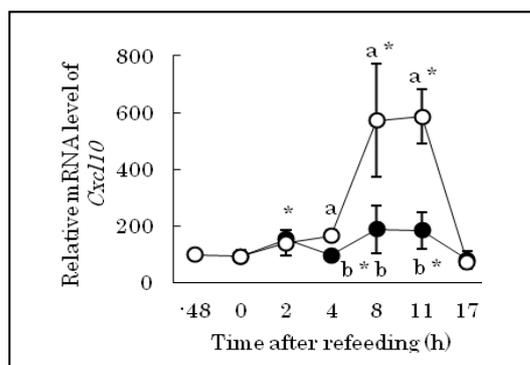


図1b 絶食-復食に伴う肝臓でのCxcl10遺伝子の発現量

復食による肝臓での炎症関連因子の遺伝子発現誘導が、予想に反して標準食に比べて低炭水化物/高脂肪食で軽減していた。この結果を踏まえ、次に、復食に伴う炎症反応の誘導における炭水化物の関与を明らかにすることを試みた。絶食したマウスに炭水化物のみ(コーンスターチとショ糖を寒天で固めたもの)を摂取量を変えて(0.2g、1.2g、および1.8g/マウス)復食させた。その結果、炭水化物のみで復食した場合でも肝臓でTLR2、炎症促進・抑制因子(Cxcl10、Icam-1、TNF- $\alpha$ 、A20、Atf30)およびTLRsの内因性リガンド(Hspd1、Hmgb1、Grp94)等の遺伝子発現が増加した(図2a,b)。更に発現の増加の程度は、復食した炭水化物の量に比例していた。また標準食による復食と同様に、

TLR4 遺伝子発現は低下していた。これらの結果は、復食により肝臓で誘導される炎症反応に食事性炭水化物が大きく関与していることを示している。

0.2g 1.2g carbohydrate  
1.8g carbohydrate

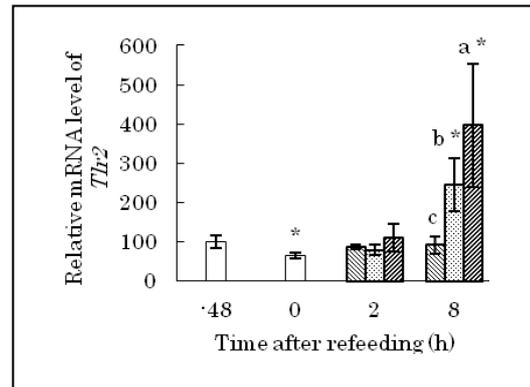


図2a 絶食後、炭水化物のみを復食したマウス・肝臓のTLR2遺伝子の発現量

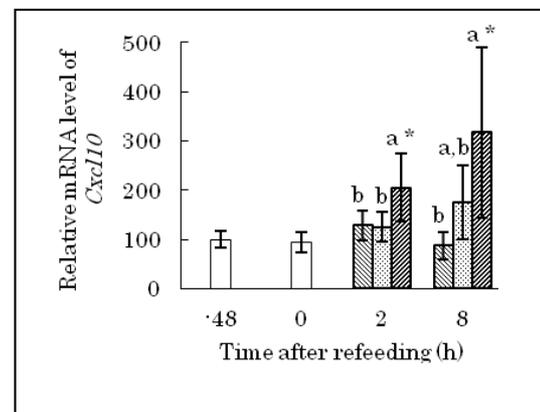


図2b 絶食後、炭水化物のみを復食したマウス・肝臓のCxcl10遺伝子の発現量

本実験では、復食に伴いTLR2遺伝子の発現が増加し、TLR4遺伝子の発現が低下した。更にTLR2遺伝子の増加と共に、炎症関連因子の遺伝子発現が増加した。この結果から、復食による肝臓での炎症反応の誘導にTLR2シグナル経路が関与していることを予測した。この点を明らかにする目的で、次に、TLR2欠損マウスに「絶食-標準食による復食」を施した。

その結果、復食時の摂食量、絶食-復食に伴う血中グルコース、インスリン、および遊離脂肪酸濃度の変動に関して、コントロールマウス(野生型マウス、Balb/c)とTLR2欠損マウスとの間で有意な差は見られなかった。しかし、コントロールマウスで増加した炎症メディエーター(Cxcl10、Cxcl1、Icam-1)およびTLR2シグナル抑制因子(A20)の遺伝子発現が、TLR2欠損マウスでは有意に軽減し

ていた (図 3a,b)。これらの結果は、絶食-復食により肝臓で誘導される炎症反応で、TLR2 シグナル経路が重要な役割を果たしていることを示している。

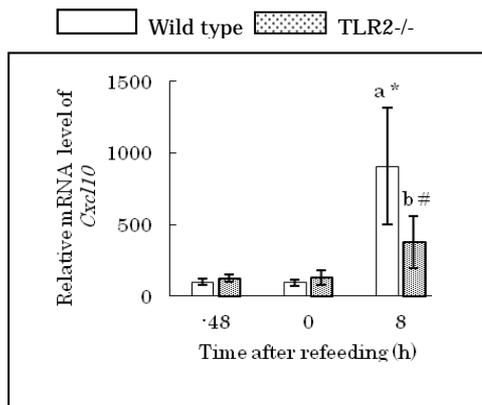


図 3a TLR2 欠損マウスにおける絶食-復食に伴う肝臓での Cxcl10 遺伝子の発現量

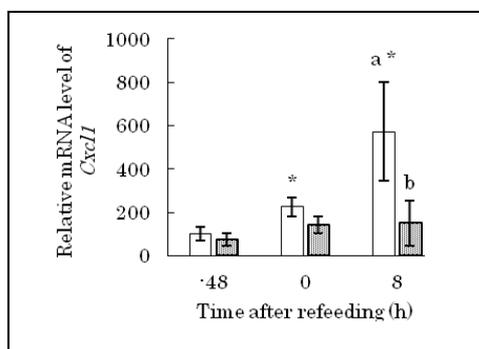


図 3b TLR2 欠損マウスにおける絶食-復食に伴う肝臓での Cxcl11 遺伝子の発現量

(2) 絶食したマウスに、5 種類 (α-コーンスターチ、グルコース、ショ糖、フルクトース、ガラクトース) の食事性炭水化物をそれぞれ 1 種類ずつ寒天で固めた物を自由摂取させた。

α-コーンスターチ、グルコース、ショ糖、およびフルクトースを復食したマウス間では、摂食量 (復食後 0-14 時間) に有意差は生じなかった。一方、ガラクトースを復食したマウスでは他の炭水化物を復食したマウスより摂食量が有意に少なかった。そのため本実験では、ガラクトースに関する実験結果を除外することにした。

復食に伴い血中グルコース濃度が増加したが、α-コーンスターチおよびグルコースを復食したマウスで、ショ糖およびフルクトースを復食したマウスより有意に増加した。血中インスリン濃度は、α-コーンスターチおよびグルコースを復食したマウスで標準値よりも有意に増加したが、ショ糖およびフルクトースを復食したマウスでは有意な増加は生じなかった。絶食により血中トリ

グリセリド濃度が低下したが、α-コーンスターチおよびグルコースによる復食で速やかに正常値に回復した。

α-コーンスターチおよびグルコースを復食したマウスの肝臓で、TLR2、炎症メディエーター (Cxcl2、Cxcl10、Cxcl1、Nfkb1、Nfkb2、RelB、Sectm1a、IL1b)、ストレス応答因子 (Atf3、Asns、Gadd45a、Perk、Inhbe) および解毒因子 (Hmx1、Gsta1、Abca8b) の遺伝子発現が増大した (図 4a-c)。一方、ショ糖およびフルクトースを復食したマウスでは、復食に伴うこれらの遺伝子発現の増加は、かなり軽減された。

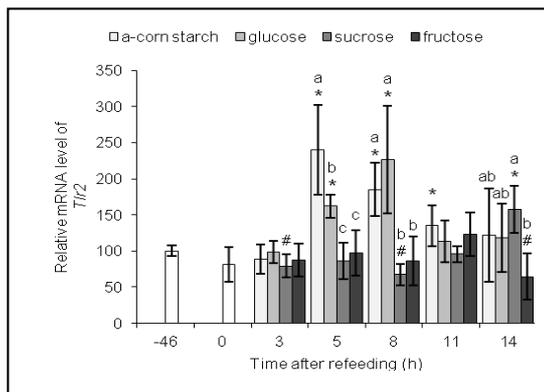


図 4a 絶食後、異なる炭水化物を復食したマウス・肝臓の TLR2 遺伝子の発現量

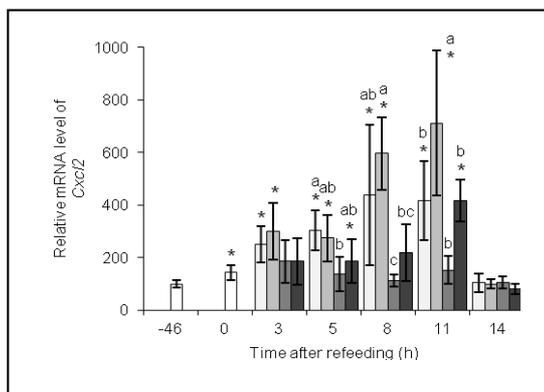


図 4b 絶食後、異なる炭水化物を復食したマウス肝臓の Cxcl2 遺伝子の発現量

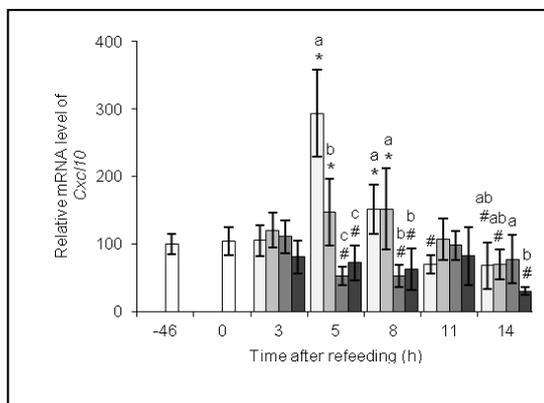


図 4c 絶食後、異なる炭水化物を復食したマウス肝臓の Cxcl10 遺伝子の発現量

更に、 $\alpha$ -コングスターチおよびグルコースを復食したマウスでは、組織再構築因子 (Gdf15、Krt23、Myc、Tnfrsf12a、Mthfd2) やがん抑制因子 (p53、Txnrd1、Btg2) の遺伝子発現も増加した。一方、ショ糖およびフルクトースを復食したマウスでは、 $\alpha$ -コングスターチおよびグルコースを復食したマウスと比べて、これらの遺伝子発現の増加は軽減された。絶食と1種類の食事性炭水化物による復食で、TLRsの内因性リガンドである熱ショックタンパク質 (HspA5、Hsp90aa1、Hspd1、Hsp22、Grp94) およびHmgb1の遺伝子発現も増加した。各炭水化物間で増加の程度に顕著な差は認められなかった。加えて $\alpha$ -コングスターチもしくはグルコースを復食したマウスでは、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ の肝臓での産生量 (タンパク質レベル) が、復食後、有意に増加した。一方、ショ糖およびフルクトースを復食したマウスでは、IL-1 $\beta$ 産生量の増加は生じなかった。

復食に伴い血中ALT値が中程度、有意に増加した。 $\alpha$ -コングスターチおよびグルコースを復食したマウスでは、ショ糖およびフルクトースを復食したマウスと比べて増加の程度が大きかった。

本研究から、現代の乱れた食生活の典型である不規則な食事 (食事抜きやドカ食い) により、肝臓で炎症反応が誘導されることが示された。この炎症反応の誘導には、以前より生活習慣病との関係が指摘されている脂質 (主に動物性脂肪) よりも炭水化物の関与が大きいことが明らかになった。近年、食事の洋風化から脂質の過剰摂取と疾患との関連に関心が集まっている。今回の結果は、現代人の食生活の問題点を考える上で、脂質に加えて新たに炭水化物についても注意を払う必要を示している。

これまでの研究から、動物性脂質 (飽和脂肪酸) の過剰摂取により脂肪組織で誘導される炎症反応には、主にTLR4シグナル経路が関与していることが明らかにされている。しかし今回の結果から、不規則な食事により肝臓で誘導される炎症反応にはTLR4ではなくTLR2シグナル経路が主に関与していることが明らかになった。

病原体センサーであるTLRsとその非感染性 (内因性) リガンドとの反応が、炎症反応の制御を介して心臓血管系や代謝性疾患の発症・進展に深く関与していることが明らかにされてきている。本実験では、絶食や復食に伴い肝臓でTLR2の発現増加と共に、TLRsの内因性リガンド (熱ショックタンパク質など) の発現増加も一次的ではあるが確認された。内因性リガンドは普段、細胞内に存在している。そのためTLR2やTLR4など細胞表面に存在するセンサーと反応するためには、ストレスや傷害などにより内因性リガンドが細胞外へ放出されることが必要になる。今回、

復食により肝細胞崩壊が中程度ではあるが促進した。これらの結果から、絶食-復食により肝臓でTLR2とTLRsの内因性リガンドとの反応の機会が増し、炎症反応が誘導されることが示唆された。

近年、砂糖の消費量増大に伴い、フルクトースと疾患との関連についての研究報告も増えている。しかしながら本研究の結果は、砂糖の過剰摂取に加え、グルコースが主原料である食品を空腹時にまとめて食い (ドカ食い) する危険性についても示唆するものである。

#### まとめ

不規則な食事により、肝臓でTLR2シグナル経路を介した炎症反応が誘導されることが明らかになった。この炎症反応の誘導には、食事性脂質ではなく炭水化物が関与していた。また炭水化物の中ではフルクトースよりもグルコースの影響が大きいことが判明した。今回、実験モデルとして、絶食-復食を実験動物に1回のみ施したが、現代病 (糖尿病など) との関係性を明らかにするためには、今後、複数回の絶食-復食による影響について検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Motoko Oarada, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Tomoki Abe, Takeshi Nikawa, Takashi Miki and Tohru Gonoj. Refeeding with glucose rather than fructose elicits a greater hepatic inflammatory response and hepatocyte destruction. *Nutrition* 2015; 31:757-765. 査読有 doi: 10.1016/j.nut.2014.11.014.

Motoko Oarada, Takashi Miki, Shohei Kohno, Kanae Sakai, Takeshi Nikawa, Mitsutoshi Yoneyama, Tohru Gonoj. Refeeding with a standard diet after a 48-h fast elicits an inflammatory response in the mouse liver. *J Nutr Biochem*. 2013;24:1314-23. 査読有 doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.10.006.

〔学会発表〕(計1件)

大荒田素子「不規則な食事と肝機能」日本食品免疫学会 第6回シンポジウム 招待講演, 2013年6月12日, 東京大学 (東京都・文京区)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大荒田 素子 (OARADA Motoko)  
千葉大学・真菌医学研究センター・助教  
研究者番号: 40211784

(2)研究分担者

五ノ井 透 (GONOI Tohru)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授

研究者番号： 30134365