

## 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：27301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614011

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝障害の発症機序の解明と、発症機序に基づいた栄養療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of pathogenic mechanism of non-alcoholic steatohepatitis and nutritional treatment based on the mechanism

研究代表者

大曲 勝久 (OMAGARI, Katsuhisa)

長崎県立大学・看護栄養学部・教授

研究者番号：90244045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：9週齢メタボリック症候群モデルラットおよび通常のSDラットに高脂肪・高コレステロール食を9週間自由摂食させたところ、高度な肝線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を発症した。SDラットではコレステロールを添加していない高脂肪食を摂取した場合はNASH様肝病変および肝線維化の発症はみられなかった。このことより、食餌性コレステロールがNASHの発症・進展に関与している可能性が示唆された。また、この餌に抗酸化作用および抗炎症作用があるフィコシアニンを追加して与えたところ、血清ASTおよびALT値はフィコシアニン添加濃度依存的に低下する傾向を示したが、明らかな肝組織学的な改善はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Nine-week-old male SHR/NDmcr-cp rats and Sprague&#8211;Dawley (SD) rats were fed with high-fat and high-cholesterol (HFC) diets for 9 weeks. At 18 weeks of age, rats developed non-alcoholic steatohepatitis (NASH) with advanced hepatic fibrosis. In contrast, SD rats fed with high-fat without high-cholesterol diets did not develop NASH and fibrosis. This may indicate that dietary cholesterol induces hepatic features of NASH and eventually progressed cirrhosis in rats within 9 weeks. Phycocyanin is a pigment found in the blue-green algae, Spirulina, which possesses anti-oxidative and anti-inflammatory effects. SD rats fed an HFC diet with phycocyanin did not reveal an obvious histopathological improvement, whereas serum transaminases levels tended to decrease in a dose-dependent manner.

研究分野：栄養学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝障害 食餌性コレステロール 肝線維化

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) は、単純性脂肪肝に酸化ストレスなどが加わって炎症や線維化を来とし、肝硬変、肝癌に進行する疾患である。わが国においても食の欧米化に伴う高脂肪食・高エネルギー食の慢性摂取により、その有病率が増加しており注目されつつある。

NASHの動物モデルはこれまで多数報告されているが、その多くは遺伝子操作を行ったり、特殊な飼料 (肝毒性物質添加食あるいは特定の栄養素の欠乏食など) を与えることによって作成されたモデルであり、ヒトにおいては高脂肪食あるいは高コレステロール食を慢性的に摂取することが NASH 発症の要因となると想定される現状においては、必ずしも適切なモデルとは言い難い。特に NASH 患者の予後を左右する肝硬変の基本病変である肝線維化を伴う動物モデルはいまだ確立されておらず、このことが NASH の病態解明および有効な治療法の開発の大きな障害となっている。

藍藻類の一種であるスピルリナ (Spirulina) は高温水・強い太陽光線・強アルカリ条件下の湖でのみ生育し、古くからアフリカ地方などで食用とされてきた。その豊富なたんぱく質含有量 (重量比約 60%) や抗炎症作用、抗ウイルス作用、コレステロール低下作用などが近年注目されている。その生理活性物質の中で、フィコシアニン (phycocyanin) は強い抗酸化能に加えて、血中アディポネクチンを増加させる作用があることから、肝臓における炎症の抑制作用による NASH 抑制効果が期待される。

よって本研究では、ヒトでの NASH 発症状況に近い動物モデルを作成し、その発症機序の検討と、発症機序に基づいた栄養療法の開発を目的に実験を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、メタボリック症候群および NASH のモデルラットである SHR/ND mcr-cp ラットおよび通常の Splague-Dawley (SD) ラットに高脂肪・高コレステロールを与えることにより肝線維化を伴う NASH が発症するかを確認し、その発症機序を検討した上で、フィコシアニンによる NASH 抑制効果の検証を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 9 週齢 SHR/NDmcr-cp ラットにおいて、高脂肪食 (HF 食) にコレステロール (5%) を添加した高脂肪・高コレステロール食 (HFC 食) を 9 週間自由摂食させ、屠殺後、血清脂質濃度の測定および肝臓の病理組織学的検討を行った。なお、組織学的検討は Kleiner

らが発見した NASH Clinical Research Network Scoring System に従い、スコア化した脂肪沈着 (score 0~3)、小葉内炎症 (score 0~3)、肝細胞の風船様腫大 (score 0~2) の 3 カテゴリーにより NASH の診断を行った。また肝線維化 (stage 0~4) の評価もあわせて行った。

(2) 9 週齢 SD ラットにコレステロール (1.25% および 2.5%) を添加した高脂肪食 (HFC 食) を 9 週間自由摂食させ、屠殺後、血清脂質濃度の測定および肝臓の病理組織学的検討を行った。さらに、肝臓における脂質および胆汁酸代謝関連遺伝子の発現を測定し、NASH 発症機序を検討した。

(3) 9 週齢 SD ラットにコレステロール (2.5%) を添加した高脂肪食 (HFC 食) とフィコシアニンを 9 週間同時摂取させ、NASH 発症が抑制されるか、肝臓の病理組織学的検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 9 週齢 SHR/NDmcr-cp ラット (5 匹) にコレステロール (5%) を添加した高脂肪食 (HFC 食) を 9 週間自由摂食させたところ、18 週齢時の血清トリグリセリドは  $374 \pm 37$  mg/dL、総コレステロール  $926 \pm 50$  mg/dL、空腹時血糖  $112 \pm 24$  mg/dL、インスリン  $8.2 \pm 3.6$  ng/mL であった。肝組織においては、肝臓全体に小滴性から大滴性の脂肪滴が認められ、脂肪沈着はすべてのラットで score 3 であった。小葉内炎症も強くみられ、1 視野につき 2~4 病巣みられたものが 4 匹、2 病巣未満が 1 匹であった。また、すべてのラットで軽度の肝細胞の風船様腫大が観察され、5 匹すべてが NASH と診断された。また、肝線維化に関しては、すべてのラットで stage 2 以上の線維化がみられ、5 匹中 2 匹は stage 4 の肝硬変であった。

以上の結果から、メタボリック症候群発症の素因を持つラットに高脂肪・高コレステロール食を与えると、わずか 9 週間という短いあいだに、進行した線維化を伴う NASH を発症し得ることが明らかとなった。

(2) 9 週齢 SD ラット (10 匹) にコレステロール (1.25% および 2.5%) を添加した高脂肪食 (HFC1.25 食および HFC2.5 食) を 9 週間自由摂食させたところ、18 週齢時の血清トリグリセリドはそれぞれ  $30 \pm 2$  mg/dL および  $43 \pm 17$  mg/dL、総コレステロールは  $171 \pm 13$  mg/dL および  $287 \pm 33$  mg/dL、空腹時血糖は  $189 \pm 11$  mg/dL および  $175 \pm 8$  mg/dL、インスリンは  $6.7 \pm 1.0$  ng/mL および  $3.6 \pm 0.4$  ng/mL、AST は  $54 \pm 9$  IU/L および  $118 \pm 31$  IU/L、ALT は  $26 \pm 6$  IU/L および  $54 \pm 17$  IU/L であった。肝組織においては、すべてのラットで著明な脂肪沈着 (score 3) および小葉内炎症 (score 2) がみられ、コレステロール 2.5% 添加群では 5 匹中 2 匹が stage 4 の肝硬変に進展していた。一方、コレステロールを添加していない高脂肪食

を摂取した個体においては、NASH 様肝病変および肝線維化の発症はみられなかった。

HFC 食を投与して NASH を発症した肝臓ではコレステロール (図 1) およびトリグリセリドをはじめとした脂肪酸代謝物が顕著に蓄積しており、ミトコンドリアにおけるコレステロールの蓄積もみられた。肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現および酵素活性を検討した結果、脂肪酸  $\beta$  酸化に関与する CPT 活性は高値を示す一方で、肝臓における脂質排出経路の一つである超低密度リポタンパク質の合成に関与する MTP の mRNA 発現量は低下していたことから、HFC 食摂取によって脂肪酸  $\beta$  酸化能の低下やトリグリセリドおよびコレステロール排出能の低下を生じていることが示唆された。また、肝臓における胆汁酸代謝関連遺伝子の発現の検討では、胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1 の mRNA 発現量は高値を示した一方で、肝臓コレステロールを胆汁中へ排出する輸送担体である ABCG5 の mRNA 発現量は低下傾向にあり、胆汁酸合成の亢進および胆汁酸抱合・排出の低下が示唆された。それには核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) による胆汁酸恒常性の維持の破綻が関与している可能性が考えられた (図 2)。また、肝臓の線維化に関連するコラーゲンタンパク質コード遺伝子である COL1A1 および COL4A1 の mRNA 発現量は高値を示し、線維化の誘因因子である TGF- $\beta$ 1 もコラーゲン遺伝子と類似した mRNA 発現傾向を示した。

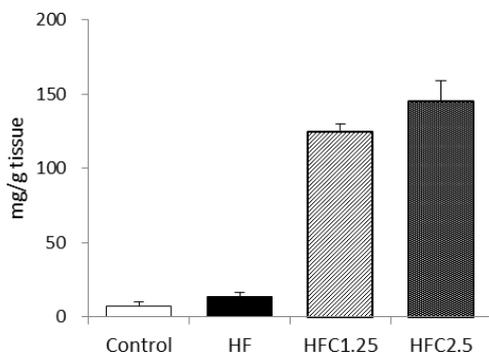


図 1 肝臓コレステロール濃度

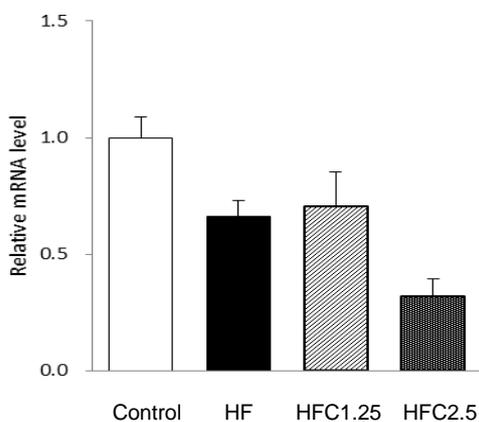


図 2 肝臓 FXR mRNA 発現量

以上の結果から、メタボリック症候群発症の素因を持たない SD ラットにおいても、高脂肪食摂取下においては、食餌性コレステロールが脂質および胆汁酸代謝に影響を与え、NASH および肝線維化の発症に寄与することが示唆された。

(3) 9 週齢 SD ラット (11 匹) にコレステロール (2.5%) を添加した高脂肪食 (HFC 食) とフィコシアニン (0.5% および 1.5%) を 9 週間同時摂取させたところ、血清 AST および ALT 値はフィコシアニン添加濃度依存的に低下する傾向を示したが、フィコシアニン非添加群に比べて、肝脂肪沈着の程度はやや軽度であったものの、肝線維化を含めて明らかな肝組織学的な改善はみられなかった。

(4) 以上の結果から、本研究においては、メタボリック症候群のモデルラットである SHR/NDmcr-cp ラットのみならず、通常の SD ラットにおいても高脂肪・高コレステロールを与えることにより 9 週間という比較的短期間に高度な肝線維化を伴う NASH を作成できることが明らかとなった。胆嚢を持たないラットにおいて食餌性コレステロールの吸収を促すために添加したコール酸の影響も否定できないが、この動物モデルは、高脂肪・高コレステロール食といった食生活の関与が想定されるヒトにおける NASH の発症機序の解明および有効な栄養療法の開発に貢献できるものと期待される。

しかし、今回検討したフィコシアニンは、その強い抗酸化能に加えて、アディポネクチン mRNA 発現亢進を介して血中アディポネクチンを増加させる作用があることが先行研究により明らかにされていることから、肝臓におけるアディポネクチン受容体受容体を介したエネルギー代謝の亢進や炎症の抑制作用による NASH 抑制効果が期待されたが、今回行った実験条件では、その効果は確認できなかった。今後、実験条件を再検討した上で確認する必要がある。

## 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 4 件)

- ① Ichimura M, Kawase M, Omagari K, et al. High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces nonalcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepato Res* 45: 458-469, 2015
- ② Ichimura M, Hatanaka M, Omagari K, et al. An SHR/NDmcr-cp rat model of non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis induced by a high-fat, high-cholesterol diet. *J Obes Weight Loss Ther* 5: 244, 2015. doi: 10.4172/2165-7904. 1000244
- ③ Omagari K, Yoshikawa C, Inoue S, et al.

Abdominal subcutaneous adipose tissue accumulation is positively correlated with hepatic steatosis in Sprague-Dawley rats. Acta Med Nagasaki 59: 47-56, 2014.

- ④ Ichimura M, Kato S, Omagari K, et al. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. Nutr Res 33: 397-405, 2013.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 市村真祐子、常山幸一、大曲勝久、SD ラットにおける高脂肪・高コレステロール食による NASH 肝硬変モデルの作成. 第 18 回日本肝臓学会大会、平成 26 年 10 月 23 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ② Ichimura M, Kawase M, Omagari K, et al. High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces nonalcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. 23rd conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 平成 26 年 3 月 12 日、ブリスベーン (オーストラリア)
- ③ Ichimura M, Hatanaka M, Omagari K, et al. Phycocyanin prevents hypertension through improving vascular dysfunction. The 8th Japan-Korea International Nursing Conference, 平成 25 年 10 月 4 日、長崎県立大学 (長崎県・西彼杵郡)
- ④ 市村真祐子、畑中麻衣子、大曲勝久、他. 高コレステロール・高脂肪食による高度線維化を伴う NASH 動物モデルの作成. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会、平成 25 年 5 月 26 日、名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

[その他]

- ① 研究成果に関連する掲載論文等の情報は、研究代表者が所属する大学のホームページおよび研究室のホームページに公開している。

「[http://sun.ac.jp/research/researcher/researcher\\_detail/?uid=omagari](http://sun.ac.jp/research/researcher/researcher_detail/?uid=omagari)」

「<http://sun.ac.jp/prof/omagari/>」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大曲 勝久 (OMAGARI Katsuhisa)

長崎県立大学・看護栄養学部・教授

研究者番号：90244045

### (2) 研究協力者

市村 真祐子 (ICHIMURA Mayuko)

長崎県立大学・人間健康科学研究科・院生

畑中麻衣子 (HATANAKA Maiko)

長崎県立大学・人間健康科学研究科・院生

加藤 滋子 (KATO Shigeko)

元・長崎県立大学・看護栄養学部・助教

現・東京大学・大学院医学系研究科

常山 幸一 (TSUNEYAMA Koichi)

元・富山大学・医学部・准教授

現・徳島大学・医歯薬学研究部・教授

後藤 紫方 (GOTO Shiho)

坂元 藍 (SAKAMOTO Ai)

鳥居 春菜 (TORII Haruna)

服部 美紀 (HATTORI Miki)

川瀬 未来 (KAWASE Miku)

増住 美貴 (MASUZUMI Miki)

榊 弥香 (SAKAKI Mika)

井上 晋一 (INOUE Shin-ichi)

田中 悠菜 (TANAKA Yuna)

村山 敏江 (MURAYAMA Toshie)

吉川 千里 (YOSHIKAWA Chisato)