

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：35409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700852

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎の栄養療法を目指したn-3系脂質の脂質代謝に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of n-3 fatty acids supplementation on hepatic phospholipid metabolism in nonalcoholic steatohepatitis.

研究代表者

村上 泰子(MURAKAMI, Yasuko)

福山大学・生命工学部・講師

研究者番号：90326413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態モデルである、メチオニン・コリン欠乏(MCD)食を給餌し、作成したマウスを用いて、エイコサペンタエン酸(EPA)高含有魚油を補給し、n-3系脂質補給の肝リン脂質種量、肝リン脂質脂肪酸組成、肝障害抑制効果等に与える影響について検討を行った。n-3系脂質補給は肝障害抑制や肝中性脂肪の抑制に関連していた他、MCDで生じる肝リン脂質脂肪酸組成の変化に対し、単に多価不飽和脂肪酸における脂肪酸組成の変化だけでなく、飽和脂肪酸の組成へも影響を与えており、肝障害抑制効果との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Feeding a diet deficient in both methionine and choline (MCD) is one of the most common models of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). We analyzed the effects of n-3 fatty acids (FA) supplementation on the hepatic phospholipids and injury in MCD fed mice. n-3 FA improved plasma transaminase levels and hepatic triglyceride accumulation in the MCD model of NASH. n-3 FA supplementation also change d liver phospholipids FA composition, not only polyunsaturated fatty acid but also saturated fatty acid.

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：NASH 非アルコール性脂肪性肝炎 n-3系脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

根治療法の開発が進められる C 型慢性肝疾患とは逆に、食習慣や運動習慣といった生活習慣に起因し、将来患者数の著しい増加が明らかな非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者に対する肝硬変、肝癌への進展を阻止する措置は重要な課題である。

NASH の病態改善と進展阻止に関して、これまでの臨床・実験研究により n-3 系脂肪酸の病態進展の抑制・改善への有用性を確認してきた。メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食にて長期飼育した動物モデルは脂肪肝の発生に続いて細胞死や炎症、線維化そして肝発癌をもたらす、NASH 病態モデルとして広く利用されている。MCD 供与による NASH 病態モデルを用いた n-3 系脂質の投与効果についてはエイコサペンタエン酸 (EPA) 欠乏の是正による細胞機能の改善、直接的・間接的な脂肪酸合成系 (SREBP-1c) の抑制と脂肪酸分解系 (PPAR) の活性化を介した肝脂肪蓄積の減少などが確認され、臨床への展開が支持されている。また、n-3 系脂肪酸は炎症性サイトカインの前駆体となる n-6 系脂肪酸と拮抗的に作用するが、最近の研究により炎症時には積極的に炎症収束を担う EPA 由来の物質である抗炎症性のメディエーターが関与することが報告されている。

2. 研究の目的

既に脂肪肝を発症している NASH モデルへの n-3 脂質投与が肝蓄積脂肪の n-6 脂肪酸を特異的に減少させるとした報告は、NASH における n-3 脂質の作用機序を理解するうえで大変興味深い。しかしこの結果は肝の脂質全体 (特に蓄積した中性脂肪の影響を受ける) を測定したもので、細胞の炎症・線維化に影響する肝細胞膜中のリン脂質脂肪酸の動態については明らかでない。よって、NASH に対する n-3 脂質の効果機序をより明らかにするためには、肝リン脂質脂肪酸動態や病態との相互的な関連を示すことが必要となる。本研究の目的は NASH に対する n-3 系脂質の投与効果のうち、特に肝リン脂質代謝への影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

マウス (C57BL/6J Jms Slc) に MCD 食を給餌・飼育した NASH 病態モデルに対し、EPA 高含有魚油 (EPA-28、マルハニチロ) を添加した EPA 群、EPA 高含有魚油を補給しない MCD 群および、コントロール群を設けた (各群 n=6)。EPA 高含有魚油添加 MCD 食は MCD 飼料中のラード 10%のうち 2%を EPA 高含有魚油 2%で置換して作成した。これにより飼料中 EPA は 0.0%から 4.6%に増加していた。飼育観察期間は 1、2、8 週とし、血漿および肝臓を採取した。

肝臓より抽出した肝総脂質は、ケイ酸カラムクロマトグラフィーで複合脂質を分離し、

二次元薄層クロマトグラフィー (TLC) により、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、リゾホスファチジルコリン (LPC)、スフィンゴミエリン (SM)+リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS) に単離した後、各リン脂質を抽出し、Bartlett 法によりリンの定量を行った。また、ガスクロマトグラフィーによる各リン脂質の脂肪酸分析を行い、n-3 系脂質補給の肝リン脂質種量に与える影響、肝リン脂質種脂肪酸組成等に与える影響について分析を行った。

4. 研究成果

メチオニン・コリン欠乏に特徴的な体重減少は MCD 群、EPA 群の両群で有意な差は認められなかった。また、血漿アルブミン濃度も両群間に有意な差は認められなかった。

血中の肝傷害指標である血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 値は、MCD 群では、いずれの観察期間においても高値を示したが (図 1)、EPA 群では MCD 群に比べ低値を示した。総ビリルビン値は、MCD 群はコントロール群に比べいずれの期間でも高値を示したが、EPA 群の高値は 1 週目を除き有意差は認められなかった。

肝中性脂肪量の評価より、EPA 群では肝臓への脂肪蓄積が有意に抑制されていた (表 1)。コントロール群 8 週目における肝中性脂肪量追増加は、解剖時の観察より内臓脂肪沈着に関連した肝への脂肪蓄積とみられる。

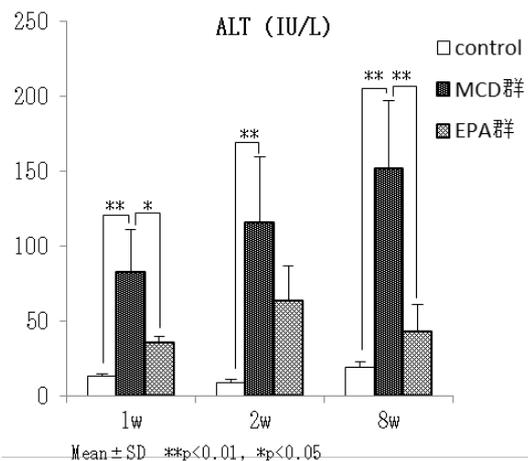


図 1 MCD マウスへの EPA 高含有油補給による血漿 ALT 値の抑制

表 1 肝中性脂肪量の変化

	control	MCD 群	EPA 群
1w	9 ± 3	15 ± 5	10 ± 4
2w	14 ± 6	17 ± 8	12 ± 5
8w	33 ± 8	30 ± 12	10 ± 5 *#

* p<0.05 control との比較、# p<0.05 MCD 群との比較

観察 8 週目における線維化初期の程度をシリウスレッド染色にて評価した。染色面積はコントロール群に比べ、MCD 食供与で約 3 倍に増加していた ($p < 0.01$)。EPA 群では MCD 群に比べ線維増生の減少傾向がうかがえたが、有意の低下ではなかった (図 2)。

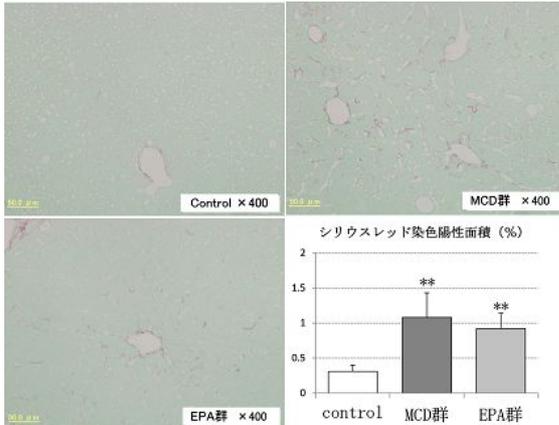


図 2 肝線維化の比較
** $p < 0.01$ control との比較

コリン・メチオニン欠乏状態にある MCD 群、EPA 群では、いずれも PC がコントロール群より低下していた。また、PE はコントロール群に比べ MCD 群で増加していた。PI は、コントロール群に比べ MCD 群、EPA 群で増加していた (図 3)。

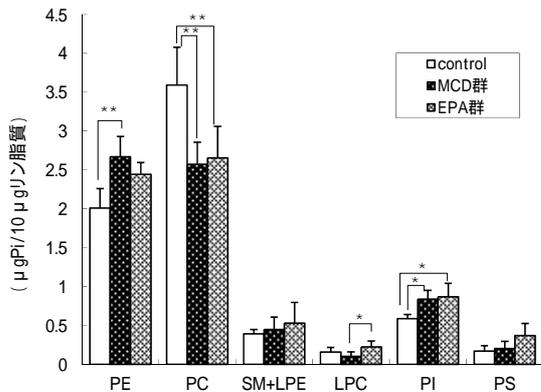


図 3 肝リン脂質量の変化 (8 週目)
Mean \pm SD ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

PC の脂肪酸組成は、MCD 群でコントロール群に比べ、パルミチン酸の減少やステアリン酸の増加が見られたが、飽和脂肪酸の総量には差はなかった。一方、EPA 群ではパルミチン酸の減少は見られず、ステアリン酸の増加が確認された。また、EPA を主とする n-3 系脂肪酸の増加とともに、n-6 系脂肪酸であるリノール酸やアラキドン酸の低下が認められた (表 2)。

コリン・メチオニン欠乏で増加あるいは増加傾向にあった PE は、MCD 群でアラキドン酸

や EPA などの多価不飽和脂肪酸の減少が特徴的であった。EPA 群では、n-3 系脂肪酸の増加とともにパルミチン酸などの飽和脂肪酸の増加とアラキドン酸の低下が認められた (表 3)。

表 2 肝ホスファチジルコリン (PC) 脂肪酸組成 (8 週目、mol%)

	control	MCD 群	EPA 群
16:0	45.0 ± 1.7	38.0 $\pm 3.3^{**}$	47.4 $\pm 1.1^{##}$
18:0	8.6 ± 0.9	17.2 $\pm 2.0^{**}$	15.4 $\pm 0.8^{**}$
22:0	0.4 ± 0.0	0.3 $\pm 0.1^*$	0.1 $\pm 0.1^{**##}$
16:1	4.1 ± 0.2	2.1 $\pm 0.6^{**}$	2.5 $\pm 0.3^{**}$
18:1	16.5 ± 0.6	14.8 $\pm 2.2^*$	13.3 ± 1.2
18:2n-6	11.0 ± 0.5	12.8 ± 1.2	8.4 $\pm 0.5^{**##}$
20:4n-6	9.0 ± 0.6	8.8 ± 1.4	2.4 $\pm 0.2^{**##}$
20:5n-3	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	4.5 $\pm 0.4^{**##}$
22:5n-3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 $\pm 0.2^{**##}$
SFA	54.6 ± 0.9	56.0 ± 2.1	64.0 $\pm 1.1^{**##}$
MUFA	20.7 ± 0.5	17.0 $\pm 2.7^*$	15.8 $\pm 1.3^*$
PUFA	24.7 ± 0.4	27.0 ± 2.7	20.2 $\pm 0.3^{##}$
n-3 系 PUFA	21.9 ± 0.8	24.0 ± 2.5	11.4 $\pm 0.7^{**##}$
n-6 系 PUFA	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.7	8.8 $\pm 0.8^{**##}$

Mean \pm SD ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$: control との比較、## $p < 0.01$: MCD 群との比較

表 3 肝ホスファエタノールアミン (PE) 脂肪酸組成 (8 週目、mol%)

	control	MCD 群	EPA 群
16:0	30.2 ± 1.8	29.9 ± 3.0	37.9 $\pm 1.7^{##}$
18:0	20.5 ± 1.8	23.7 $\pm 1.7^*$	25.8 $\pm 1.4^{**}$
22:0	1.0 ± 0.1	0.4 $\pm 0.2^{**}$	0.4 $\pm 0.3^{**}$
16:1	2.0 ± 0.3	1.4 $\pm 0.3^{**}$	1.4 $\pm 0.2^*$
18:1	12.3 ± 0.4	15.7 $\pm 0.9^{**}$	12.2 $\pm 0.9^{##}$
18:2n-6	4.0 ± 0.6	5.7 $\pm 0.6^{**}$	3.4 $\pm 0.2^{##}$
20:4n-6	20.4 ± 0.6	13.7 $\pm 1.0^{**}$	3.5 $\pm 0.5^{**##}$
20:5n-3	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1	4.6 $\pm 0.6^{**##}$
22:5n-3	0.4 ± 0.2	0.1 $\pm 0.1^{**}$	0.4 $\pm 0.1^{##}$
SFA	52.0 ± 0.9	54.2 $\pm 1.7^*$	65.2 $\pm 1.4^{**##}$
MUFA	14.5 ± 0.6	17.3 $\pm 1.0^{**}$	13.6 $\pm 1.0^{##}$
PUFA	33.5	28.5	21.2

n-3系 PUFA	25.7 ±0.7	20.4 ±2.4**	7.4 ±1.5**##
n-6系 PUFA	7.8 ±0.3	8.1 ±1.3**	13.9 ±0.7**##
	±0.5	±1.6	±0.9**##

Mean ± SD **p<0.01, *p<0.05 : control との比較、##p<0.01 : MCD 群との比較

本研究では EPA 補給により、肝傷害指標である血漿 AST、ALT の改善がみられた。これには EPA の有する抗酸化作用が有効に作用したとも推測できるが、今回観察された肝リン脂質における脂肪酸組成の違いが、肝細胞傷害の抑制と関連していることも一因として考えられる。EPA 群で飽和脂肪酸が多かったことについては、EPA 投与がリン脂質の生合成やリモデリングに影響を与えている可能性が推測される。MCD-NASH モデルへの n-3 系脂肪酸の投与が肝リン脂質脂肪酸組成に与えた機序については未だ考察段階であり、今後、他の NASH モデルの解析も含め、検討を行いたい。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

瓜倉 真衣、村上 泰子、田中 保 . キャベツの調理過程における抗潰瘍性リン脂質の産生 . 第 60 回日本栄養改善学会学術総会 . 平成 25 年 09 月 14 日 . 兵庫県神戸市 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村上 泰子 (MURAKAMI, Yasuko)
福山大学・生命工学部・講師

研究者番号 : 9 0 3 2 6 4 1 3