

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350132

研究課題名(和文) NAFLDにおける免疫調節機構の役割と栄養因子の影響

研究課題名(英文) Effect of probiotics on Nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

川上 貴代(笹川貴代)(Kawakami, Takayo)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：10254567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は慢性肝疾患進展ではリスクファクターとなる肥満者での腸内細菌叢の変化に着目した。そこで、プロバイオティクスでの抗肥満効果、肝炎症スコアや線維化などの指標を用いて脂肪性肝疾患進展抑制効果の検討を行った。本研究では肥満モデル動物に乳酸菌*L. plantarum*およびプレバイオティクスの同時投与したところ抗肥満および肝組織学的指標の低下を認め、肝炎症への保護効果が示唆された。また高n-3系脂肪酸含有油脂であるシールオイルをNASHモデルマウスに投与したところNASの低下が観察された。今後さらに慢性肝疾患進展予防への影響についてこれらメカニズムの検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We focused on anti-obesity effect of probiotics on progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). In this study, we observed that visceral fat accumulation and NAS (NAFLD activity score) in obese mice fed with probiotics (*Lactobacillus plantarum* 301102) and prebiotics was significantly lower than control mice. We also showed that omega 3 fatty acid rich seal oil supplementation on NASH model mouse decreased NAS significantly. This study suggests that the anti-inflammatory and anti-obesity effect of *L. plantarum* and/or seal oil might be preservation of hepatic function in NAFLD. Further examination including mechanism of mediators from intestinal bacterial flora or adipose tissue on chronic liver disease should be performed.

研究分野：栄養学

キーワード：NAFLD プロバイオティクス 肥満

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患のうち、非アルコール性脂肪性肝炎 (non alcoholic steato hepatitis; NASH) は、アルコール飲用歴がないにもかかわらず、線維化や肝実質の壊死、炎症を呈し、肝硬変へといたるとされる。NAFLD (非アルコール性脂肪性肝疾患) および NASH は、肥満、2 型糖尿病、高脂血症を伴う場合が多く進行するとアルコール性肝炎様病変を経て硬変化することから生活習慣病の肝臓での表現型ともいえる。NASH の成因としては、肝細胞脂肪沈着から、脂質過酸化や肝内鉄、あるいは糖尿病など基礎疾患のコントロール不良による種々の要因や未知のストレス要因が加わり炎症を惹起する multiple-hit 説が有力とされている。治療においてはライフスタイルを基本とした基礎疾患の治療や肝庇護薬等が試みられているものの、より効果的な治療法が望まれる。

2. 研究の目的

NAFLD および NASH ではその基盤病態である脂肪肝形成に代謝異常が重要視される。一方近年自然免疫機構など免疫機構へ腸管由来シグナルが生活習慣病における慢性炎症の発症促進に関与することが示唆されている。このような中、肥満を伴う脂肪肝患者での腸内細菌叢の異常、免疫細胞活性化亢進が炎症誘発や進行におよぼす役割の解明と予防治療への応用が注目されてきた。

本研究では肥満モデルおよび NASH モデル動物をもちいてプロバイオティクス、n-3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂の投与が肝炎症スコアや線維化の程度を観察し、体内での免疫応答に及ぼす影響を検討した。また市販緑色野菜ジュース飲用が NAFLD における肥満、肝障害指標に及ぼす効果について検討し、脂肪肝から NASH 進展予防を目指し健康に寄与する機能性食品の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肥満または脂肪肝、NASH に及ぼす機能性食品素材の検討

肥満脂肪肝モデルまたは、NASH モデルマウスを用いて、プレバイオティクスあるいは n-3 系脂肪酸含有油脂等栄養機能成分の影響を検討した。

肥満脂肪肝モデルは5週齢の雄性 C57BL/6J マウスは各試料を HFD32 に混合し、自由摂食させ実験に供した。NASH モデルマウスについては、6 週齢の雄性 STAM マウス (Steric、東京) 23 匹を使用し、高脂肪食で飼育した Control 群 (C 群: 11 匹)、シールオイル群 (S 群: 12 匹) の 2 群に分別した。C 群には紅花油、S 群にはシールオイルを 2% 混合したものを、短期間 (9 週間)、または長期間 (13 週間) 投与した。屠殺後、全摘した肝臓は、組織学的解

析や脂肪酸組成分析に使用した。脂肪合成関連遺伝子群の発現量はリアルタイム PCR にて測定した。

(2) 栄養機能としての抗肥満・脂肪肝をめざした市販緑色野菜ジュースの検討

本研究では外来受診の NAFLD 患者を対象に、通常の食事に加えて緑色野菜ジュースを 8 週間飲用し、身体状況、臨床検査値、栄養素等摂取状況、血中脂肪酸組成、血漿 トコフェロール濃度に及ぼす影響について検討した。NAFLD と診断された患者 9 例を対象とし、野菜ジュース 2 缶づつを飲用した (106kcal, protein 2.0g, fat 0.6g, carbohydrate 26.0g, Vitamin C 146mg, Vitamin E efficacy 0.96mg (two cans /day))。

4. 研究成果

(1-1) NASH モデル動物におけるプロバイオティクス等投与の影響

NASH モデル動物をもちいてプロバイオティクス等栄養機能性物質の投与が炎症スコアや線維化の程度、あるいは肝マクロファージ細胞等での免疫応答に及ぼす影響の検証を行い、脂肪肝から NASH 進展抑制を目指した機能性食品の開発の基礎資料とすること

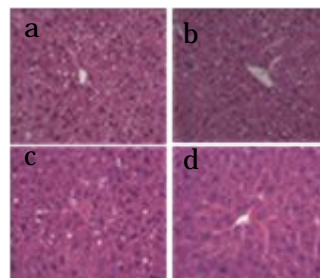


Fig1. Effect of *L. plantarum* supplementation on Histological data. a. Control, b. *L. plantarum*, c. inactivated LPd:LP-FO

Table1. Effect of *L. plantarum* supplementation on NAFLD activity

	C	LP	KP	LP-Pre
肝脂肪化	0.80±0.4	1.00±0.0	0.20±0.4	0.00±0.0*
炎症	0.60±0.5	1.00±0.7	0.40±0.5	0.20±0.4
細胞障害	1.20±0.4	1.40±0.5	1.20±1.1	0.00±0.0*
NAS	2.60±0.9	3.40±1.1	1.80±1.1	0.20±0.4*

Table2. Effect of *L. plantarum* supplementation on serum endotoxin level

	C	LP	KP	LP-Pre
Endotoxin (EU/ml)	1.2±0.6	1.7±0.4	1.6±0.2	1.7±0.6
Liver TG (mg/g)	142±33	168±37	110±43	72±25

を目的とした。肥満・脂肪肝モデル動物でのプロバイオティクス投与による組織学的、生化学的手法による炎症評価の検討を行った。プレバイオティクスとして乳酸菌株 (*L. plantarum* 301102、Miyamoto.T により供与) は培養後集菌し凍結乾燥 (LP)、不活化菌体

(KP)はオートクレーブ処理し比較に用い、またプレバイオティクスにはフルクトオリゴ糖(Pre)を使用した。

内臓脂肪重量においてコントロール群と比べてプロバイオティクスとプレバイオティクスの同時投与で有意に低い値を示した。また総コレステロール値はコントロール群と比較して同時投与群で有意に低い値を示し、また肝組織評価である NAFLD activity score (NAS) においてコントロール群と比較して有意に低値を示した。今回の検討では、肥満モデルマウスを用いて *L. plantarum* 301102 およびフルクトオリゴ糖を用いて投与することでプロバイオティクスの内臓脂肪蓄積低下や肝組織学的指標での肝炎症への保護効果が示唆された。

(1-2) 肥満モデルにおける n-3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂投与の影響

高脂肪食を基本にした NASH モデルマウスである STAM™マウスにシールオイル(SO)を2%置換し 9 週または 13 週齢での生化学的検査値、および組織学的検討を行った。検査値の比較では、短期飼育(9 週間)において、シールオイル群では血漿 TG 値の低下がみられたものの、長期飼育(13 週間)においては血液生化学的検査値および肝脂肪蓄積においてコントロール群と比較してシールオイル群は明らかな変化は認められなかった。しかし肝臓組織学的検査において短期飼育ではシールオイル群の脂肪変性および風船様変性

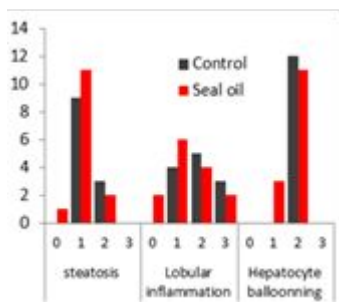


Table3. Effect of Seal Oil supplementation on Plasma and Liver TG level.

		C	SO
Plasma TG	9wk	313.6±305.3	164.3±90.0
	(mg/g)	13wk	319.6±415.3
Liver TG	9wk	63.8±11.1	63.7±8.30
	(mg/g)	13wk	83.9±22.1

度はコントロールよりも検出頻度が少なく、脂肪化、肝実質における炎症、肝細胞障害の各指標でスコア化した NAS では、有意な低下が認められた。一方、長期飼育による肝腫瘍形成や線維化の程度には明らかな差は認められなかった。

(2) NAFLD における緑色野菜ジュースの飲用が血清 ALT 値に及ぼす影響

8 週間後緑色野菜ジュースの飲用により、9 例中 6 例に ALT の低下が認められた。そこで血清 ALT 値の低下を認めた 6 例を Responder、認められなかった 3 例を Non-responder として解析したところ、Non-responder は BMI が Responder より高く、飲用期間中、BMI、腹囲、体脂肪率の変化はなかった。一方、Responder ではボディマスインデックス (BMI)、腹囲、体脂肪率は開始時より低下した。さらに血清 AST 値においては、Responder では Non-responder に比し約 80%まで有意に低下、また血漿 トコフェロール濃度は 8 週後に Non-responder に比し上昇した。

野菜ジュース飲用中の赤血球膜脂肪酸組成を分析したところ、Responder では 8 週間後にリノール酸、アラキドン酸、EPA などの貴不飽和脂肪酸比率の上昇と Lipogenic index (16:0/18:2n-6) の低下が Non-responder に比し有意に認められた。また肥満やメタボリックシンドロームに関連するとされる D5D index (20:4n-6/20:3n-6) は Responder で有意に上昇した。D5D index 変化率と血清 ALT 値の変化率には負の相関 $r = -0.783$, $p=0.013$ も認められたことから、野菜ジュース摂取は特に BMI < 30 の軽度肥満者においては、脂肪酸代謝に影響をおよぼし、血漿 トコフェロール濃度の上昇により血清 ALT 値の低下、肝機能改善をもたらす可能性を示唆した。

以上、本研究では脂肪肝から NASH 進展抑制を目指した機能性食品の開発の基礎資料とすることを目的とし NASH モデル動物をもちいてプロバイオティクス乳酸菌株 (*L. plantarum* 301102) およびプレバイオティクス、高 n-3 系多価不飽和脂肪酸含有油脂であるシールオイルについて栄養機能性物質の投与が炎症スコアや線維化の程度、内臓脂肪蓄積に対する改善が示唆された。また抗酸化成分であるビタミン C などを含む市販緑色ジュースの飲用の予備的な研究ではあるが、軽度肥満者については 8 週間の飲用により内臓脂肪肥満および肝障害指標の改善が認められた。肥満・脂肪肝でのこれら機能性食品素材は、腸内細菌叢の変化、脂肪組織、肝マクロファージ細胞等での免疫応答に及ぼす影響等が慢性炎症の発現に関与したのではないかと考えられた。今後はこれらの機能性をもつ食品素材を組み合わせた食品の実現や実用化にむけた研究が期待された。

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)

田淵真愉美、久保木真、水道裕久、河原和枝、富岡加代子、川上貴代、平松智子、塚本幾代：NAFLDにおける緑色野菜ジュースの飲用が血清ALT値に及ぼす影響、岡山県立大学保健福祉学部紀要、第22巻、27-38ページ（2015）

Ecklonia cava polyphenol has a protective effect against ethanol-induced liver injury in a cyclic AMP-dependent manner. H. Yamashita, M. Goto, I. Matsui-Yuasa and A. Kojima-Yuasa. *Marin Drugs* 13: 3877-3891 (2015).

〔学会発表〕(計3件)

Takayo Kawakami, Yasuko Murakami, Mayumi Tabuchi, Satoko Hiramatsu, Miho Mihara : Seal oil attenuates hepatic inflammation in NASH model mice、12th Asian Congress of Nutrition (12th ACN2015) May 14 (Thu) - 18 (Mon), 2015

森 香子、大槻 朱美、川上 祐生、神崎 圭太、山本 登志子、川上 貴代、木本 眞順美、山下 広美、高橋 吉孝：非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウス肝における血小板型12S-リポキシゲナーゼの発現上昇、第89回日本生化学会（仙台）平成28年（2016年）9月25日～27日

川上貴代、椎木奏江、小林紗也加、原あゆみ、吉井晴華、中村昇二、宮本拓：肥満モデルマウスにおけるプロバイオティクスの影響、第71回日本栄養・食糧学会大会(宜野湾市)、2017年5月19日～21日

〔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

川上(笹川)貴代(Kawakami - SASAGAWA Takayo)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：10254567

(2) 研究分担者

湯浅明子(YUASA Akiko)
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・准教授
研究者番号：90295709

田淵真愉美(TABUCHI Mayumi)
岡山県立大学・保健福祉学部・准教授