

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350150

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎進展時のコレステロール摂取と脂肪酸組成・インスリン抵抗性

研究課題名(英文)Cholesterol ingestion and fatty acid composition/insulin resistance during progression of non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

北森 一哉 (KITAMORI, Kazuya)

金城学院大学・生活環境学部・准教授

研究者番号：80387597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂質の「過剰蓄積」は生活習慣病の原因と考えられてきたが、近年は脂肪酸の「質」の変化の重要性が指摘されている。この研究では、我々が開発した、高脂肪・高コレステロール(HFC)添加飼料で脂肪蓄積・肝炎・線維化へと進展する非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデルSHRSP5/DmcrとWKY(対照)を使用した。飼料は、HFC飼料、コレステロールを添加しない高脂肪(HF)飼料、普通飼料をそれぞれ与え、脂肪酸組成や炎症・線維化に関連した測定を行った。同じ脂質量であってもコレステロール添加飼料で、NASH病態は重症化した。また、その重症度は、WKYよりもSHRSP5/Dmcrで顕著であった。

研究成果の概要(英文)：Excessive accumulation of lipid has been considered to be a cause of lifestyle-related diseases but in recent years, changes in the quality of fatty acids is indicated as important. This study used SHRSP5/Dmcr, a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model we developed, in which the disease progresses to fat accumulation/hepatitis/fibrosis upon ingestion of a high-fat and high-cholesterol (HFC) diet, and WKY (control). The rats were fed the HFC diet, a high-fat (HF) diet with no added cholesterol, or a common diet, and measurements of fatty acid composition and inflammation/fibrosis were taken. The cholesterol-added diet caused greater severity of NASH pathology despite having the same lipid content as the HF diet. In addition, the severity was remarkably greater in SHRSP5/Dmcr than in WKY.

研究分野：複合領域

キーワード：NASH コレステロール

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) は、肝臓に脂肪が沈着する非アルコール性脂肪肝 (NAFL) から、肝臓の慢性炎症、線維化、肝硬変など慢性進行性の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) までの各病期を含む、幅広い病態である。患者数は急増しているが、その診断は難しく、確定診断には肝生検が必要とされている。このため、早急な非侵襲性の診断・治療・食事療法の確立が望まれているが、遅々としている。

我々は、これまで、脳卒中高血圧自然発症ラット (SHRSP) の中から、高脂肪コレステロール (HFC) 飼料摂取により脂質代謝異常を発症する個体を継代的に兄妹交配し、SHRSP5/Dmcr:Arteriolipidosis-prone rats (ALR) を開発・系統維持してきた。本モデルは、HFC 飼料の比較的短い期間の摂取で、NASH のほぼ全てのタイプ (脂質沈着・炎症から線維化による偽小葉まで) を発症する、優れた NASH のモデルとなることを確認してきた。

ヒト NASH 患者は飽和脂肪酸・コレステロールを多く摂取しており、脂質の「過剰蓄積」は生活習慣病の原因と考えられてきたが、近年は脂肪酸の「質」の変化の重要性が指摘されている。

2. 研究の目的

これまで、食事性コレステロール摂取が、NASH 病態の重症化や肝臓に蓄積する脂質の量に関係する可能性を示唆してきた。しかし、食事性コレステロール摂取と蓄積する脂肪酸の「質」との関連については明らかになっていない。そこで、コレステロール摂取が蓄積する脂肪酸の質に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と飼料

全ての実験動物は specific pathogen-free 条件、室温 (23 ± 2)、湿度 ($55 \pm 5\%$)、8 時 - 20 時の 12 時間周期の明暗の基に飼育した。餌はコントロール飼料として、spontaneously hypertensive rat (SHR)、SHRSP 系統のコントロール飼料として使用される普通飼料 (SP)、普通飼料に飽和脂肪酸の多い脂質のみ添加しコレステロールを添加していない HF 飼料、普通食に飽和脂肪酸の多い脂質とコレステロールを添加した HFC 飼料、の 3 種類の飼料を使用した。

なお、動物の飼育と実験は金城学院大学実験動物委員会に承認され、動物実験の倫理ガイドラインに従って実施した。

(2) サンプル採取

動物は雄性 ALR 10 週齢とする。対象は SHR 系統のコントロールとして使用される WKY とした。それぞれの系統、18 匹を 3 群ずつに分

けた。WKY/SP 群、WKY/HF 群、WKY/HFC 群、ALR/SP 群、ALR/HF 群、ALR/HFC 群とする。摂餌期間は 10 週齢から 8 週間自由摂取で与えた。体重、血圧は摂餌後 8 週間で測定した。ペントバルビタール麻酔下で腹部大動脈より採血し、血清と肝臓を採取した。サンプルは -80 で保存し、血清から生化学検査を行った。

(3) 組織学的検査

ホルマリン固定した肝臓をパラフィンに包埋し、 $4 \mu\text{m}$ に薄切した。薄切した切片は、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) と、エラスチカ・ワンギーソン (E.V.) で染色した。

脂質の沈着、炎症、線維化の程度は、NAFLD 活性スコア (NAS) と線維化スコアを算出して評価した。

(4) 脂質解析

飼料、肝臓、血清の脂質抽出は、Bligh & Dyer の方法を用いて抽出した。抽出した脂質は、内部標準を加えた後、ガスクロマトグラフキャピラリーカラムにかけ、それぞれの脂肪酸を算出した。

(5) 解析

全てのデータは平均 \pm 標準偏差で示した。それぞれの系統の SP 群との比較は、Dunnett's test で解析した。同じ飼料の系統間の比較は、student t-test で解析した。有意水準は $P < 0.05$ とした。全ての計算は JMP software (SAS Institute, Cary, NC) によって解析した。

4. 研究成果

(1) 体重・血圧変化

WKY、ALR とともに、HF 飼料と HFC 飼料の体重は SP 飼料に比較し有意に減少した。また、ALR は WKY に比較し、すべての飼料群で低値を示した。

血圧は、WKY、ALR とともに 3 飼料の間に有意な変化は認められなかった。ALR の血圧は WKY に比較し、3 飼料とも有意な低値を認めた。

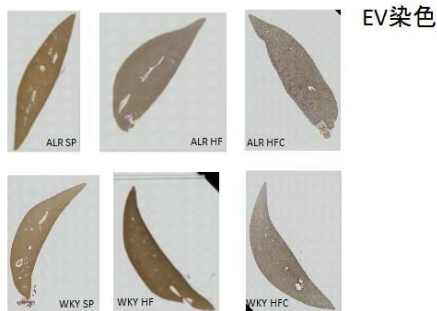
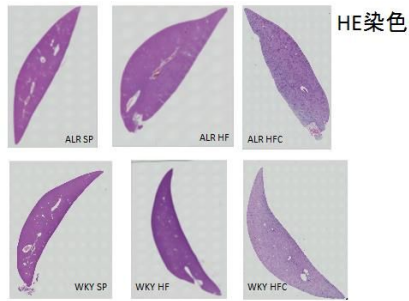
(2) 血清生化学検査

WKY の TC、AST、ALT は、HFC 群において SP 群と比較し有意な高値を示した。ALR の TG は、HFC 群において SP 群と比較し有意な低値を示し、TC、AST、ALT、 γ -GTP は、HFC 群において SP 群と比較し有意な低値を示した。また、ALR の HFC 群は、WKY の HFC 群に比較し、TC で有意な低値を、AST、ALT、 γ -GTP で有意な高値を示した。WKY、ALR の Glu は、共に SP 群に比較し他の群で有意な増加が認められなかった。

(3) 組織学的解析

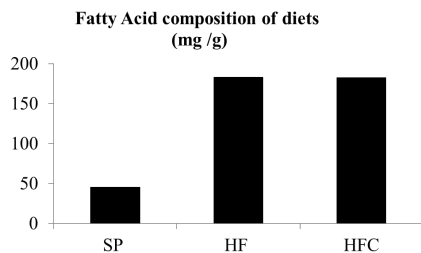
肝臓への脂質沈着・炎症・バリーニングスコアは、WKY、ALR の HFC 群において、SP 群

に比較し、有意な高値を示し、NAS も有意な高値を示した。線維化スコアは ALR の HFC 群においてのみ、有意な高値を示した。



(4) 餌脂肪酸分析

餌の脂肪酸分析の結果、総脂肪酸量は、SP 飼料に比較し、HF 飼料と HFC 飼料で高い値であった。HF 飼料と HFC 飼料の間に違いはなかった。各脂肪酸は SP 飼料に比較し、HF 飼料と HFC 飼料で 16 : 0、18 : 0、18 : 1 が多くなっていた。



(5) 血清中脂肪酸分析

血清中の総脂肪酸は、HFC 群において、ALR は WKY に比較し、有意な低値を示した。また、n-6/n-3 は、有意な高値を示した。16 : 1、18 : 1 は、WKY、ALR 共に SP 群に比較し、HFC 群で有意な高値を示した。20 : 4、20 : 6 は、WKY、ALR 共に SP 群に比較し、HFC 群で有意な低値を示した。

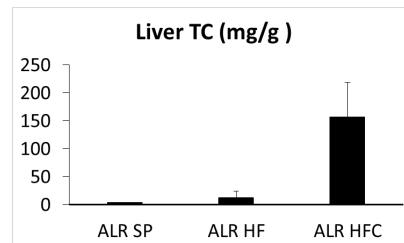
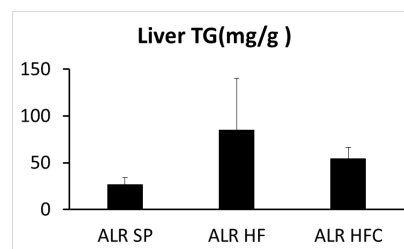
(6) 肝臓中脂肪酸分析

肝臓中の総脂肪酸は、有意な差が認められなかったが、n-6/n-3 は、WKY、ALR 共に、それぞれの SP 群に比較し有意な高値を示した。

また、ALR の HFC 群は、WKY の HFC 群に比較し、有意な高値を示した。18 : 1、20 : 1 は、WKY、ALR 共に、HF 群、HFC 群でそれぞれの SP 群に比較し、有意な高値を示した。16 : 1 は、WKY、ALR 共に、HFC 群でそれぞれの SP 群に比較し、有意な高値を示した。18 : 3、20 : 4、20 : 5、22 : 5、22 : 6 は、WKY の HFC 群で SP 群に比較し、有意な低値を認めた。20 : 4、22 : 5、22 : 6 は ALR の HF 群、HFC 群で、WKY の同じ飼料群に比較し、有意な低値を示した。

(7) 肝臓中 TG、TC

肝臓障害の進行している、ALR において肝臓中、TG、TC の測定を行った。TG は、SP 群に比較し、HF 群で有意に高値を示した。TC は、SP 群に比較し、HFC 群で有意な高値を示した。



(8) 酵素活性

不飽和化酵素活性として、16 : 1/16 : 0 は、WKY、ALR 共に、HFC 群で有意な高値を示した。

飼料の脂肪酸量が同じであっても、コレステロールが添加されると、WKY においても肝障害の悪化が認められた。肝障害の程度は WKY よりも ALR の方が重度であり、WKY では認められなかった重度の線維化が認められた。コレステロール摂取は肝障害を重症化することと、その重症度には系統差があることを示唆した。

また、飼料の脂肪酸量が同じであっても、コレステロール添加により、脂肪酸組成は変化した。その変化は、一価不飽和脂肪酸の増加が顕著であった。この結果もまた、WKY よりも ALR において顕著であった。また、これらの脂肪酸組成の変化は、血清中よりも肝臓中の方が大きかった。コレステロール摂取が蓄積する脂肪酸の質に影響を及ぼすことを示唆した。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

非アルコール性脂肪性肝疾患におけるコレステロール摂取の影響と肝臓脂肪酸組成の変化. 北森一哉、宮澤大介、内藤久雄、土倉覚、安井菜穂美、池田克巳、家森幸男、那須民江. 第51回高血圧関連疾患モデル学会. 2015年10月30日. 大阪.

SHRSP5/Dmcrの食事による非アルコール性脂肪性肝疾患モデルとしての検討. 北森一哉、内藤久雄、玉田葉月、土倉覚、安井菜穂美、池田克巳、家森幸男、那須民江. 第49回高血圧関連疾患モデル学会学術総会. 2013年9月7日. 東京.

非アルコール性脂肪性肝疾患に関する脂肪酸とコレステロールの影響. 北森一哉、宮澤大介、内藤久雄、玉田葉月、土倉覚、安井菜穂美、池田克巳、家森幸男、那須民江. 日本食品化学学会第19回総会・学術大会. 2013年8月30日. 名古屋.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北森 一哉 (KITAMORI, Kazuya)

金城学院大学・生活環境学部・准教授

研究者番号：80387597

(2)研究分担者

宮澤 大介 (MIYAZAWA, Daisuke)

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：70434553

那須 民江 (NAKAJIMA, Tamie)

中部大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：10020794

(3)連携研究者