

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450450

研究課題名(和文) 高脂肪食投与による肥満ラットの敗血症下侵襲反応とトリブチリン経口投与効果の解析

研究課題名(英文) Lard-based high-fat diet worsens liver injury but attenuates lung injury in endotoxemic rats

研究代表者

三好 真琴 (Miyoshi, Makoto)

神戸大学・保健学研究科・助教

研究者番号：50433389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食投与による肥満ラットの敗血症下侵襲反応として、肝障害は増悪するが、肺障害は却って軽減されることを明らかにした。肺障害の軽減にはSLPIの関与の可能性を見出した。また、肝臓の脂質メディエーターを網羅的に解析し、多様な脂質メディエーターの変化を明らかにした。さらに、酪酸のトリグリセライドでprodrugであるトリブチリンの経口投与によりエンドトキシン投与による血中脂質代謝異常が軽減されることを明らかにした。この機序としてヒストンのアセチル化およびPPAR、による脂肪酸酸化酵素レベルの改善が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lard-based high-fat diet (HFD) feeding rats in endotoxemia worsened liver injury, but attenuated lung injury. HFD feeding enhanced proinflammatory lipid mediators 1.5 h after lipopolysaccharide injection suggesting relation to liver injury. The elevation of pulmonary secretory leukocyte protease inhibitor, anti-inflammatory protein, might be associated with the reduction of lung injury in these rats. Tributyrin, prodrug of butyrate, suppressed endotoxin-induced lipid metabolism disorder. Oral tributyrin administration prevents elevation plasma triglyceride, total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels through improved fatty acid oxidation, PPARs and histone H3 in the liver in endotoxemic rats.

研究分野：農学

キーワード：高脂肪食 敗血症 トリブチリン

1. 研究開始当初の背景

肥満に伴う代謝変化が敗血症下の病態に大きく関与すると考えられている。ICUの敗血症患者のうち Body Mass Index (BMI) ≥ 40 の肥満患者は非肥満患者と比較し予後が悪いという報告がある一方で、中程度の肥満では悪化と改善のさまざまな報告があり、肥満の敗血症下侵襲反応への影響については未だ明らかでない。肥満患者ではメタボリックシンドロームに伴う各種の疾病を有するために臨床研究による解析が困難であり、その病態の解明には動物実験が必須と考えられる。

トリブチリンは短鎖脂肪酸の中でも特に生理活性の高い酪酸の prodrug であり食品成分でもある。我々は、これまでにラットへのトリブチリン経口投与により十分な門脈血中酪酸濃度上昇を得ること、エンドトキシン lipopolysaccharide (LPS) 投与下の肝障害を顕著に抑制することを明らかにしてきた。また高脂肪食投与マウスへのトリブチリン投与による血清レプチンとインスリンの減少および肝臓トリグリセライドの減少から肥満を改善することも報告されている。以上より、トリブチリンが炎症反応や脂質代謝を改善することは明らかであるが、どのように関与するかについては不明な点が多い。

肥満ラットの敗血症下侵襲反応の詳細な解析は、今後の臨床に応用できるものであり、また本研究は食品成分である酪酸の新しい生理活性研究に発展するものと考えられ学術的な価値を有する。

2. 研究の目的

(1) 高脂肪食投与による肥満モデルラットを作製し、肥満が敗血症下の侵襲反応や脂質代謝などの病態に及ぼす影響を明らかにする。

(2) トリブチリン経口投与による敗血症下脂質代謝異常への効果を検討する。

3. 研究の方法

いずれの実験系も Wistar 系雄性ラットを使用した。

(1) 高脂肪食投与ラットにおける敗血症下侵襲反応

60% ラード含有高脂肪食 (high fat diet; HFD) を 4 あるいは 12 週間摂食させたあと、LPS を腹腔内投与し 1.5、6 時間後に犠死せしめ、血漿、肝臓および肺を採取した。血中の nitric oxide (NO)、AST、ALT、脂質濃度およびサイトカインである adiponectin、IL-6 を測定した。また組織障害を検出するためにそれぞれ HE 染色を行った。

さらに、肝臓中の adiponectin 受容体、脂肪酸酸化酵素 (FATP、FABP、CPT-1)、脂肪酸合成酵素 (SREBP-1c、FAS) の mRNA を real-time PCR で、脂肪酸分画をガスクロ

マトグラフィーで、脂質メディエーターを LC-ESI-MS/MS にて測定し、網羅的解析を行った。

肺組織では好中球の浸潤を MPO 活性で測定し、サイトカインである TNF- α 、IL-10 の mRNA や抗炎症作用を有す secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) の mRNA および蛋白発現を解析した。

(2) トリブチリン経口投与による脂質代謝への効果

トリブチリン 1.0 g/kg を経口投与後 LPS 腹腔内投与によりエンドトキシン血症を誘発した。LPS 投与後 1.5、6、24 時間後に血漿および肝臓を採取し、肝臓中の核内受容体 (PPAR- α 、PPAR- γ 、LXR- α 、RXR- α) や脂肪酸酸化酵素、脂肪酸合成酵素の mRNA、血中脂質濃度を測定した。また機序のひとつとしてヒストンアセチル化を調べた。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食投与ラットにおける敗血症下侵襲反応

HFD の 4 週間および 12 週間摂取により体重はコントロールラットと比較しそれぞれ 7%、11% と増加した。また肥満モデルへの LPS 投与により生存率が低下し、血中 NO 濃度増加および LDL コレステロール濃度増加や HDL コレステロール濃度低下、等の脂質代謝異常を示した (表 1)。

表 1. LPS 投与後の血漿中脂質代謝変化

Parameter	CD 0 h	HFD 0 h	CD 6 h	HFD 6 h
TG (mg/dL)	33.9 \pm 7.6	52.9 \pm 4.0 **	113.0 \pm 8.4 ^{SS}	117.0 \pm 12.7 ^{##}
LDL-C (mg/dL)	10.1 \pm 0.7	8.6 \pm 0.6	11.7 \pm 0.4	14.0 \pm 0.5 ^{##*}
HDL-C (mg/dL)	21.8 \pm 0.7	17.8 \pm 0.5**	20.3 \pm 0.6	16.3 \pm 0.7 **
FFA (μ Eq/L)	1508 \pm 113	1784 \pm 120	1747 \pm 55	2234 \pm 179

Mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CD at the same time point; ^{SS} $p < 0.01$ vs. CD at

0 h; ^{##} $p < 0.01$ vs. HFD at 0 h.

4 週間の HFD 摂取では善玉アディポサイトカインである adiponectin の血中濃度低下に加え、肝臓組織中では adiponectin 受容体発現低下を認め、肝臓は増加した (図 1、2)。この機序として、肝臓中の脂肪酸代謝酵素と脂質メディエーターの変化に着目したところ、12 週間の HFD 摂取によって、FATP、FABP、CPT-1 などの脂肪酸酸化酵素および SREBP-1c、FAS などの脂肪酸合成酵素は LPS 投与後に増加した。脂質メディエーターの網羅的な解析では、アラキドン酸由来である PGE₂、TXB₂ は LPS 投与 1.5 時間後に HFD

表 2. トリブチリンおよび LPS 投与後の血漿中脂質代謝変化

blood biochemical tests	LPS 0 h		LPS 24 h	
	vehicle	tributyrin	vehicle	tributyrin
triglyceride (mg/dL)	37.2 ± 5.7	49.6 ± 6.7	79.3 ± 6.5	63.2 ± 4.4
total cholesterol (mg/dL)	75.5 ± 3.7	70.0 ± 0.7	86.2 ± 3.0	77.2 ± 2.7 #
low-density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	11.7 ± 1.4	12.5 ± 0.3	23.5 ± 1.4	18.9 ± 1.2 #
high-density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	23.3 ± 1.1	20.8 ± 1.6	18.5 ± 1.3	19.8 ± 0.8
free fatty acid (μEq/L)	1487.8 ± 139.1	1385.5 ± 54.0	1375.9 ± 69.3	1326.1 ± 58.4
glucose (mg/dL)	129.5 ± 3.2	113.8 ± 8.4	141.1 ± 7.4	153.2 ± 6.9

Mean ± SEM. # $p < 0.05$ vs. vehicle group at the same time point

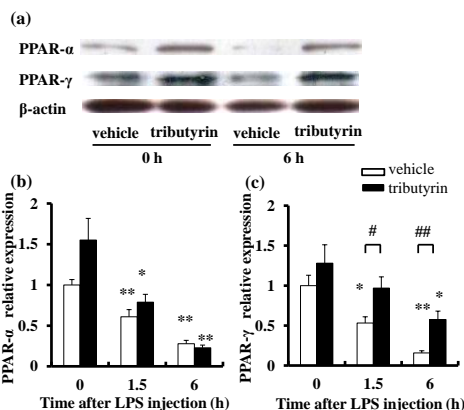


図6. LPS投与後の肝臓中PPAR-α、PPAR-γ発現
(a) 蛋白発現; (b) PPAR-α mRNA発現; (c) PPAR-γ mRNA発現.
Mean ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0 h, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. vehicle group at the same time point.

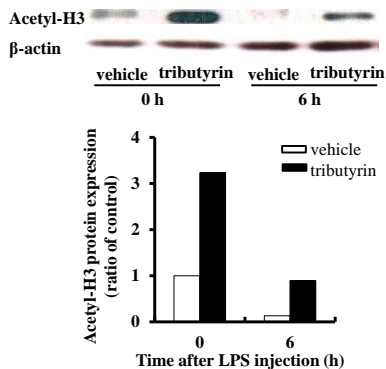


図7. LPS投与後の肝臓中Acetyl-H3蛋白発現

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) Miyoshi M, Iizuka N, Sakai S, Fujiwara M, Aoyama-Ishikawa M, Maeshige N, Hamada Y, Takahashi M, Usami M. Oral tributyrin prevents endotoxin-induced lipid metabolism disorder. Clin Nutr ESPEN 10, e83-e88, 2015. 査読有 doi:10.1016/j.clnesp.2015.02.001

(2) Fujiwara M, Miyoshi M, Sakai S, Nishiokada A, Aoyama-Ishikawa M, Maeshige N, Usami Y, Hamada Y, Takahashi M, Usami M. Lard-based high-fat diet increases secretory leukocyte protease inhibitor expression and attenuates the inflammatory response of acute lung injury in endotoxemic rats. Clin Nutr 34, 997-1009, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.clnu.2014.11.001.

(3) Nishiokada A, Miyoshi M, Fujiwara M, Aoyama-Ishikawa M, Maeshige N, Takahashi M, Hamada Y, Usami Y, Honda M, Arita M, Usami M. Changes of hepatic lipid mediators associated with intake of high-fat diet for 12 weeks in endotoxemic rats using LC-ESI-MS/MS. Clin Nutr 34, 685-693, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.clnu.2014.07.013.

(4) Sakai S, Iizuka N, Fujiwara M, Miyoshi M, Aoyama M, Maeshige N, Hamada Y, Usami Y, Usami M. Mild obesity reduces survival and adiponectin sensitivity in endotoxemic rats. J Surg Res 185, 353-363, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.jss.2013.06.002.

[学会発表] (計 7 件)

(1) 甲斐元規、三好真琴、西山雄也、梶田歩、石川(青山)倫子、前重伯壯、井上岳人、植村弥希子、山下勇人、古賀由華、宇佐美眞. 12週間ラード含有高脂肪食摂取が急性炎症下の肝組織中PPARαとPPARγ発現を上昇させる. 第6回機能油脂懇話会、2015年11月14日、明治大学駿河台キャンパス(東京都)

(2) Kai M, Fujiwara M, Miyoshi M, Nishiyama Y, Aoyama-Ishikawa M, Maeshige N, Inoue T, Uemura M, Yamashita Y, Koga Y, Usami M. Up-regulation of hepatic PPARα and PPARγ in endotoxemic rats by feeding lard-rich high-fat diet for 12 weeks. The 37th Congress of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition. 2015年9月5-8日、Lisbon, Portugal

(3) 甲斐元規、藤原麻有、三好真琴、西山雄也、青山倫子、前重伯壯、井上岳人、植村弥希子、山下勇人、高橋路子、濱田康弘、宇佐美眞. 4週間あるいは12週間ラード含有高脂肪食摂取による急性炎症下の肝組織中脂肪酸分画、脂肪酸酸化・合成酵素の変動. 第12回日本機能性食品医学学会総会、2014年12月12-13日、国立京都国際会館(京都府)

(4) Nishiokada A, Miyoshi M, Fujiwara M, Aoyama-Ishikawa M, Nishiyama Y, Kai M, Maeshige N, Takahashi M, Hamada Y, Usami Y, Arita M, Usami M. Changes of hepatic lipid mediators associated with intake of high-fat diet for twelve weeks in endotoxemic rats using LC-ESI-MS/MS. The 36th Congress of the

European Society of Parenteral and Enteral Nutrition. 2014 年、9 月 6-9 日、Geneva, Switzerland

(5) 西山雄也、西岡田亜矢、藤原麻有、三好真琴、甲斐元規、青山倫子、山下勇人、前重伯壯、高橋路子、濱田康弘、有田誠、宇佐美眞. ラード含有高脂肪食投与ラットにおけるエンドトキシン血症下の肝組織中脂質メディエーター変動 -LC-ESI-MS/MS 解析-. 第 51 回日本外科代謝栄養学会、2014 年 7 月 4-5 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

(6) 西山雄也、西岡田亜矢、藤原麻有、三好真琴、甲斐元規、青山倫子、山下勇人、井上岳人、前重伯壯、高橋路子、濱田康弘、有田誠、宇佐美眞. 12 週間の高脂肪食投与によるラットエンドトキシン血症下の肝組織中脂質メディエーターと脂肪酸代謝酵素の経時変化. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 31 日、6 月 1 日、酪農学園大学 (北海道)

(7) 甲斐元規、藤原麻有、西岡田亜矢、三好真琴、西山雄也、青山倫子、前重伯壯、山下勇人、井上岳人、高橋路子、濱田康弘、宇佐美眞. ラード含有高脂肪食投与によるラット肝障害下の脂肪酸分画の変動. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 31 日、6 月 1 日、酪農学園大学 (北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 真琴 (Miyoshi Makoto)
神戸大学・保健学研究科・助教
研究者番号：50433389

(2) 研究分担者

宇佐美 眞 (Usami Makoto)
神戸大学・保健学研究科・教授
研究者番号：00193855