

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870026

研究課題名(和文) NAFLDにおけるプロバイオティクスの脂肪酸代謝作用ポイントの同定と治療応用

研究課題名(英文) Investigation and treatment application of the probiotic fatty acids metabolism in NAFLD

研究代表者

澤田 康司 (SAWADA, Koji)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80548660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高脂肪食負荷マウス(HFD群)と高脂肪食+プロバイオティクス(Lactobacillus brevis SBC8803)負荷マウス(Pro群)を用いて、プロバイオティクスの非アルコール性脂肪肝改善効果と、そのメカニズム解析を行うことで、プロバイオティクスの治療応用の可能性を探索した。Pro群においては28～33週の投与で、体重増加抑制の可能性が示唆された。しかし、さらなる長期投与ではHFD群、Pro群ともに体重低下が見られ、脂肪肝改善効果も個体によるばらつきが大きくなり、両群間で有意差を示す所見は認めなかった。今後は投与期間を短縮しての検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether a probiotic (Lactobacillus brevis SBC8803) improved non-alcoholic fatty liver disease in NAFLD model mice fed with a high fat diet. In mice fed with the probiotics, increasing body weight was inhibited after 28-33 weeks, however; longer treatment with the probiotic did not induce the inhibition of increasing body weight and histopathological examination did not demonstrate an improvement of fatty liver compared with those of NAFLD mice, because of decreasing body weight in both of NAFLD mice and mice treated with the probiotic. In the future, it will be needed to investigate whether short term treatment with the probiotic improves NAFLD.

研究分野：脂肪肝

キーワード：NAFLD プロバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患診療においてウイルス性肝炎は治癒またはコントロールが可能な疾患になっている。一方で、生活習慣の変化による世界的な肥満の増加に伴い、non-alcoholic steatohepatitis (NASH) 患者は増加し様々な方面から、病態・治療に関して基礎的・臨床的な研究されている。特に、近年は分子生物学的手法の進歩により腸内細菌叢の詳細な解析が可能となり、腸内細菌叢の様々な機能や、疾患との関連が報告されている。肥満と腸内細菌叢との関係性も報告され、腸内フローラの改善に有効とされるプロバイオティクスは non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/NASH を改善させる可能性がある。申請者は NAFLD モデルマウスを用いて、腸内細菌、脂質代謝、Toll-like receptors (TLRs) シグナルの関連が NASH/NAFLD 病態に関与していることを報告している。しかし、プロバイオティクスによる宿主臓器の代謝・免疫変化(脂質代謝異常、TLRs の発現異常を含めて)に関する詳細なメカニズムは検討されていない。

2. 研究の目的

プロバイオティクスによる腸管、肝臓、脂肪組織の脂質代謝関連遺伝子発現変化と、TLRs シグナル発現変化の関連性を解明し、脂質代謝における細胞内治療標的分子を同定し、プロバイオティクスとその活性物質による NASH 治療応用を探索する。

(1) プロバイオティクス投与による脂肪肝、血液生化学所見、脂質代謝異常改善効果を検討する。

(2) プロバイオティクス投与後の腸管、肝、脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) NASH モデルマウスの作成

モデルとしては高脂肪食負荷マウス：C57BL/6(8週齢、雄性)に82%高脂肪食(カロリー比)を51週間投与したNASHモデルマウスを作成する(HFD群)。

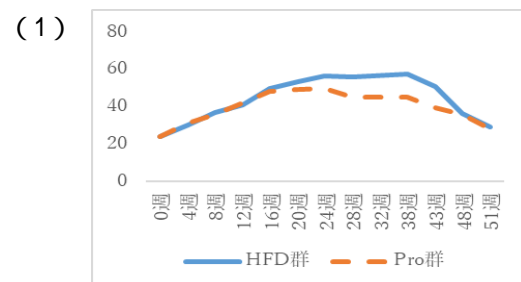
(2) プロバイオティクス投与NASHモデルマウスの作成

高脂肪食負荷 NASH モデルマウスにおけるプロバイオティクス (Lactobacillus brevis SBC8803) による脂肪肝改善効果を検討するために、プロバイオティクス投与 NASH モデルマウスを作成した。高脂肪食 + 1%プロバイオティクス群 (Pro 群) と HFD 群の 2 群に分けて、各々を 51 週間飼育してモデルマウスを作成した。

(3) モデルマウスを作成し、体重測定後、血液、肝臓、腸管を採取し、血液生化学所見、肝組織における脂肪肝の程度を解析する。

(4) 肝組織における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現変化を real time PCR 法で解析する。

4. 研究成果

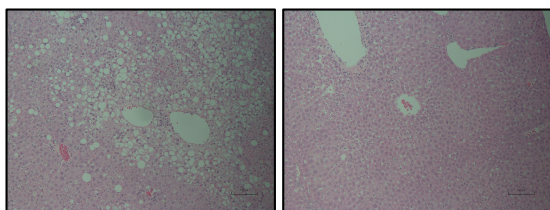


(図1: モデルマウスの体重変化 (g))

HFD 群において高脂肪食投与後、38 週までは体重増加を認めた。一方で Pro 群では 28 週から体重抑制が見られ、38 週の時点で Pro 群は体重の増加が抑制される傾向にあったが (HFD 群: 57.4g vs Pro 群: 45.0g, p=0.070)。

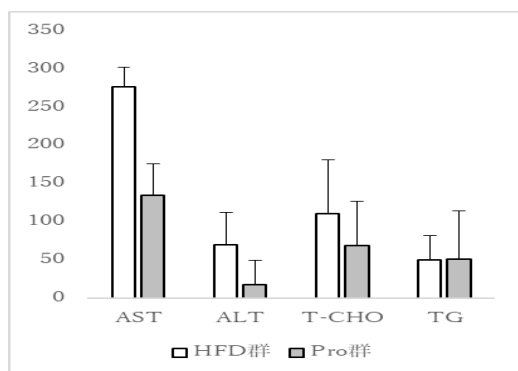
モデル作成終了時の51週ではHFD群29g、Pro群28gと同程度まで体重は減少した。

(2) 肝組織における脂肪肝改善の評価



(図2:HFD群 HEx100)(図3:Pro群 HEx100) 51週時の肝組織所見においてHFD群では中心静脈周囲を中心に大滴性の脂肪沈着を認めた。Pro群においては大滴性の脂肪滴の減少を認めたが、個体によってばらつきを多く認めた。

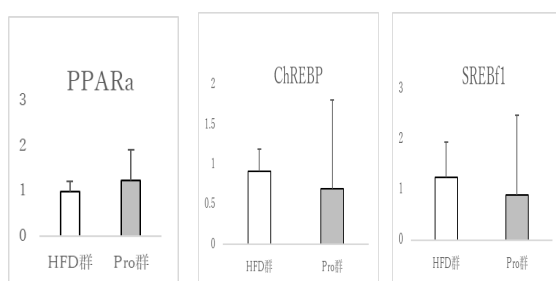
血液生化学所見



(図3:HFD群、Pro群血液生化学所見)

HFD群に比較しPro群ではAST, ALT, T-CHOは低下傾向にあったが、組織学的所見と同様に個体差が大きく、有意差な差は認められなかった。

(3) 肝組織における脂質代謝関連遺伝子の発現変化



(図4:HFD群、Pro群の肝組織における脂質代謝関連遺伝子 mRNA の発現変化、relative expression)

酸化関連の PPARα、脂肪酸合成に関わる ChREBP、SREBF1 は HFD 群、Pro 群で発現変化に有意差は認めなかった。

(4) 以上から、プロバイオティクス (Lactobacillus brevis SBC8803) を 28~33 週で投与すること高脂肪食単独に比較し体重抑制効果の可能性が示唆された。しかし、51 週間の長期投与では HFD 群、Pro 群両方で個体差が大きくなり、両群間で有意差を認める遺伝子発現や血液検査は認めなかった。今後は、投与期間を短縮しての検討が必要である。

<引用文献>

Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatol Res.* 2014. 44: 920-934. DOI: 10.1111/hepr.12199.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Hasebe T, Tanaka H, Sawada K, Nakajima S, Ohtake T, Fujiya M, Kohgo Y. Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in a fatty liver mouse model. *J Gastroenterol.* 2017. 52: 341-351. doi: 10.1007/s00535-016-1237-6. 査読あり

澤田 康司、大竹 孝明、中嶋 駿介、阿部 真美、高後 裕. NAFLD における Toll-like receptor, 脂質代謝、腸内フローラの相互作用. 酸化ストレスと肝疾患.

第 10 卷: 85-90, 2015. 査読なし

大竹 孝明, 澤田 康司, 高後 裕. 新しい消化器疾患動物モデル(第 15 回) 非アルコール性脂肪性肝障害モデル動物 脂肪性肝障害モデルを用いた肝炎発症のメカニズムの解析. 分子消化器病(1348-995X)11 巻 3 号 Page265-269 (2014 年 9 月号) 査読なし

Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of nonalcoholic fatty liver disease in mice. Hepatol Res. 2014. 44:920-934. DOI: 10.1111/hepr.12199. 査読あり

[学会発表](計 5 件)

Hasebe T, Sawada K, Nakajima S, Tanaka H, Ohtake T, Fujiya M, Kohgo Y. Liver sinusoid endothelial cell derived bone morphogenetic protein binding endothelial regulator (BMPER) induces iron overload of high-fat diet induced obese mice. AASLD The Liver Meeting 2015. 2015 年 11 月 15 日, San Francisco

長谷部 拓夢, 澤田 康司, 中嶋 駿介, 大竹 孝明, 藤谷 幹浩, 高後 裕. マウス脂肪肝鉄代謝異常における非実質細胞パラクライン作用に関する研究. 第 23 回消化器関連学会週間 (JDDW2015), 2015 年 10 月 8 日, 東京

長谷部 拓夢, 澤田 康司, 中嶋 駿介, 田中 宏樹, 大竹 孝明, 高後 裕. マウス脂肪肝における鉄代謝異常と非実質細胞性シグナルの関連. 第 39 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会. 2015 年 8 月 30 日 岡山

澤田 康司, 大竹 孝明, 高後 裕, NAFLD

病態における腸内フローラ・脂質代謝・自然免疫の相互作用. 第 51 回日本肝臓学会総会 2015 年 5 月 21 日 熊本

澤田 康司, 大竹 孝明, 中嶋 駿介, 阿部 真美, 藤谷 幹浩, 高後 裕. Cathelicidin 誘導を介した脂肪酸の Toll-like receptors 発現誘導に関する検討. 第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月 23 日, 東京

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称: NASH/NAFLD の疾患感受性遺伝子多型の同定と診断への応用

発明者: 高後裕, 田中宏樹, 大竹孝明, 佐々木勝則, 中嶋駿介, 澤田康司, 長谷部拓夢

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-061455

出願年月日: 平成 27 年 3 月 24 日

国内外の別: 国内

名称: 肝細胞における脂肪蓄積量を低減させるための脂肪低減剤

発明者: 田中宏樹, 清水恵子, 中嶋駿介, 澤田康司, 長谷部拓夢

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-212412

出願年月日: 平成 28 年 10 月 31 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 康司 (SAWADA, Koji)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80548660