

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：27401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870513

研究課題名(和文)フルクトース摂取によるNASH発症のリスク評価および病態発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Research on risk evaluation and elucidation of the onset of fructose-induced non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

山元 涼子 (YAMAMOTO, RYOKO)

熊本県立大学・環境共生学部・助手

研究者番号：50580429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：日常的なフルクトースの摂取がNASH発症に及ぼす影響について検討をおこなった。マウスに10%フルクトース水を最長24週間自由摂取させ、血液生化学検査および肝臓組織学的検査、遺伝子発現解析を行なった。その結果、血液生化学検査及び遺伝子発現解析では、対象群と差は認められなかった。肝臓組織学的検査では、NASHだけでなく脂肪肝の誘導も確認されなかったが炎症細胞の浸潤が確認された。今回の試験条件ではフルクトース摂取によるNASHの発症は確認されなかったが、一般的なヒトでの検査で実施されない組織の結果で変化が認められたことから、日常的なフルクトースの摂取が及ぼす影響について、今後も検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：To investigate the risk evaluation and elucidation of the onset of daily fructose consumption induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH), C57BL/6J mice were fed 10%(w/v) fructose by drinking water ad libitum for up to 24 weeks. A risk of daily fructose consumption was evaluated with biochemical analysis, hepatic histological analysis and hepatic gene expression analysis. Plasma AST, ALT, CHO, TG and GLC and hepatic steatosis-related genes expression in 10% fructose fed mice for 24 weeks were not difference compared with the control mice (tap water). Although, inflammation in liver was observed by histological analysis, symptoms of NASH or simple steatosis were not found in this study. From the result that inflammation of liver was observed in 10% fructose fed mice, it is necessary to further study on influence of daily fructose consumption on liver.

研究分野：食生活学

キーワード：NAFLD NASH フルクトース

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は予後良好な単純性脂肪肝と予後不良の非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に大別される病態である。NASH を発症すると肝硬変、肝癌のリスクが高まることから、単純性脂肪肝から NASH 発症のメカニズムの解明が望まれている。

ヒト NAFLD 患者において、NASH や肝繊維化を伴う重症型の NAFLD 患者はフルクトース摂取量が多いことが報告されており、フルクトースの摂取は NAFLD さらには NASH 発症の危険因子であると考えられている (Thuy *et al.*, 2008; Abdelmalek *et al.*, 2010)。一方、動物実験ではフルクトース誘発性モデルは NAFLD モデルとしては位置づけられているが、NASH には至らないとの報告がある (Kanuri *et al.*, 2013)。現行の NASH モデルは、遺伝子改変モデルやコリン-メチオニン欠乏食のような特殊食品での誘発モデルが用いられている。しかし、ヒトの病因は遺伝子改変のような単一遺伝子の変異や特定の栄養素の欠乏が発症に起因するとは考えにくい。また、フルクトース食を用いた NAFLD 研究の多くはフルクトース含有量が約 60% と非常に多く、ヒトの食生活を模しているとは言い難い。

研究代表者らは、これまで Wister ラットおよび ICR マウスを用いた実験において 10% フルクトース水を 20 日間飲水させることにより肝細胞への脂肪の蓄積、血清中の AST および ALT の異常が生じることを明らかにした。さらに、フルクトース摂取により ICR マウスの血中遊離アミノ酸組成は大きくバランスを崩し、またその組成はヒト肝疾患患者と類似することを明らかにした (論文未発表)。しかし、ヒト NASH 診断法を用いて肝臓の病理診断を行った結果、障害の程度は軽度であり NASH 発症には至っていなかったが、投与期間等を検討することで単純性脂肪肝だけでなく、NASH を発症する可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではヒトの食生活においても摂取可能な濃度でのフルクトースの日常的な摂取による NASH 発症のリスク評価を行うとともに、単純性脂肪肝から NASH を発症する要因や病態解明の検証を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) フルクトース摂取に伴う NASH 発症のリスク評価

ヒトの食生活においても摂取可能な量を考慮し、清涼飲料水に含まれる糖質量を参考

に、本研究でのフルクトース水の濃度は 10% とした。

実験 1: 雄性 C57BL/6J マウスに 10% フルクトース水を 2, 4, 8, 12 週間自由飲水させ、フルクトースによる NASH 発症のリスク評価を行った。飼育期間中は AIN93G を給餌した。解剖時に、血液および肝臓を採取し、血中 AST, ALT, GLC, TG, CHO および CRP の測定、肝臓中 TG, CHO の測定を行った。さらに肝臓組織切片を作製し、肝臓組織学的検査を行った。

実験 2: 実験 1 の結果をうけ、実験 2 では以下の通り検討条件を変え実施した。

性別の変更: NAFLD の有病率の性差についてはこれまで男性が女性よりも高頻度との報告が多いが、NASH に関しては性差による有病率については明らかになっていない。しかし、過去のフルクトース飲水による NAFLD 研究において、雌性がより感受性が高いことが報告されていたことから、雄性から雌性に切り替え実施した。

餌の組成変更: AIN93 組成の餌では炭水化物としてスクロースが用いられていることから、餌からの糖質の影響を軽減するため、スクロース無添加の組成の飼料に変更した。

投与期間の変更: 12 週の投与では病変が軽度であったことから、24 週まで投与期間を延長した。

以上の項目について条件設定を変更し、実験 2 では雌性 C57BL/6J マウスに 10% フルクトース水を自由飲水させ、12, 16, 24 週後解剖、フルクトースによる NASH 発症のリスク評価を行った。飼育期間中はスクロース無添加 AIN93M を給餌した。解剖時に、血液および肝臓を採取し、実験 1 と同様の項目について測定を行った。

(2) 日常的なフルクトース摂取が肝臓中の遺伝子発現へおよぼす影響

10% フルクトース水を 24 週間摂取したマウスの肝臓 (実験 2 のサンプル) を用いて解析を行った。マウス肝臓より total RNA を抽出し、cDNA を合成した後 Mouse Fatty Liver RT² Profiler PCR array (Qiagen) にて遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) フルクトース摂取に伴う NASH 発症のリスク評価

雄性マウスを用いた検討 (実験 1)

10% フルクトース水の飲水開始 8 週目において血中 TG の上昇、12 週目において ALT の上昇が確認された。肝臓中の TG は対象群 (水道水飲水) と比較すると 8 週目より上昇傾向を示した。肝臓組織学的検査の結果では、12 週目において肝臓中脂肪蓄積および炎症細胞の浸潤が確認される個体が認められた。しかし、12 週目では対象群の個体でも肝臓の組織学的検査において脂肪滴が確認される個体が認められた。

血液検査の値について、既存の NASH 病態モデルである STAM マウスと比較した結果、フルクトース摂取では AST, ALT の値は低値を示す傾向にあり、肝臓組織学的検査の結果でも NASH 病変のモデルと比較すると軽度の肝機能異常であることが示唆された。

雌性マウスを用いた検討 (実験 2)

実験 1 において、雄性マウスを用いた 12 週間投与の検討では、NASH 病変が認められなかったことから、実験 2 ではマウスの性別、餌の組成、投与期間の 3 点について再検討を行い試験を実施した。

その結果、24 週間の投与において、フルクトース飲水と水道水との間では体重および AST, ALT, TG, CHO および GLC 値に有意差は認められなかった。しかし、肝臓重量、生殖器周囲の脂肪重量、肝臓中の総脂質量においては、有意差は認められないものの、フルクトースの摂取によって上昇傾向を示した。肝臓の組織検査の結果では、脂肪蓄積は軽度で、一部炎症細胞の浸潤が確認された。しかし、NASH の肝臓病変とは言い難い組織像を呈した (図 1)。

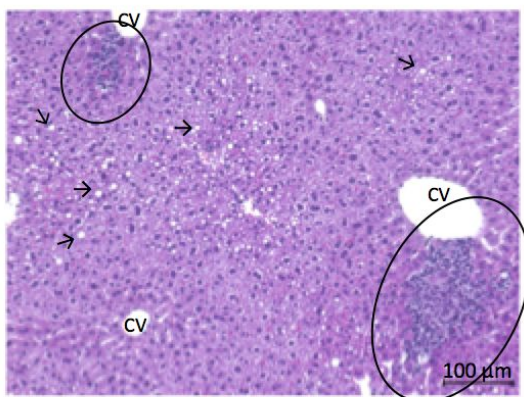


図1. 肝臓の組織画像

10%フルクトース水24週間の飲水によって肝臓中に炎症細胞の浸潤が確認された。
○で囲まれている箇所:炎症細胞の浸潤
CV: 中心静脈、→: 脂肪滴

今回、10%フルクトース水を飲水させることにより1日の飲水量は有意に増加していた。しかし、摂食量は減少していたことから、1日の摂取エネルギー量は、水道水を飲水したマウスと差は認められなかった。1日あたりの摂取エネルギー量に占める単純糖質の摂取割合を算出すると約15%であり、WHOの推奨する10%以下よりも高い割合であった。

(2) 日常的なフルクトース摂取に伴う肝臓中の遺伝子発現への影響

(1)の結果より、今回の条件下ではフルクトースの摂取によって NASH を発症しないことが示唆されたが、病理所見や1日あたりの糖質の摂取量を考慮すると、10%濃度のフルクトースの日常的な摂取が安全である

とは言い難い結果である。そこで、脂肪肝に関連する 84 遺伝子が搭載された RT² Profiler PCR array (Mouse Fatty Liver)を用いて肝臓中の遺伝子解析を行なったが、顕著な変動は認められなかった (図 2)。

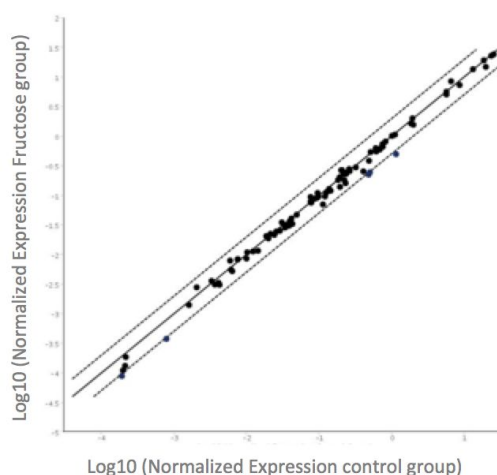


図2. RT² Profiler PCR arrayによる肝臓の遺伝子発現解析 (Scatter Plot)

脂肪肝関連遺伝子84遺伝子についてフルクトース摂取による顕著な変化は認められなかった。

(3)まとめ

清涼飲料水と同程度の濃度のフルクトース摂取による NAFLD/NASH 発症への影響を検討した。しかし、今回の条件下では NASH 発症には至らなかった。

今回の飲水量、摂食量から1日の摂取エネルギー量に対する単純糖質の摂取割合を算出すると約15%であり、WHOの推奨する1日の摂取エネルギー量に対する単純糖質の摂取割合よりも高い条件であった。本研究の成果からは、この程度の摂取量では体重増加やヒトの診断で一般的に測定される血液検査の値には影響を与えないことが示唆された。しかし、肝臓中での炎症細胞の浸潤が確認されたことから、清涼飲料水程度のフルクトースの日常的な摂取が及ぼす影響については、今後も検討する必要があると考える。

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1件)

1. Yamamoto R, Iida A, Tanikawa K, Shiratsuchi H, Tokuda M, Matsui T, Nakamura T. Dietary D-allose ameliorates hepatic inflammation in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Food Science and Technology Research* 23 (2), 319-327.

〔学会発表〕(計1件)

1. Kinoshita W, Iida A, Nakamura M, Yamamoto R, Hamano M, Katagiri Y,

Wakamatsu K, Komeyama H, Nakamura T.
Preventive effects of Vitamin E on
non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in a
novel mouse model using streptozotocin and a
high-fat diet. The 69th Annual Meeting of
Japan Society of Nutrition and Food science,
2015 May, Japan .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山元 涼子 (YAMAMOTO RYOKO)

熊本県立大学・環境共生学部・助手

研究者番号：50580429