

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893029

研究課題名(和文)ローズマリーの有効成分に着目した新しい非アルコール性肝炎、肝癌治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy of NASH and following carcinogenesis via natural compound of Rosemary

研究代表者

小川 光一(Ogawa, Koichi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20733637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：確たる治療法のないNASH・肝発癌に対し、我々はローズマリーエキス(RE)に含まれる1,8-cineole カルノシン酸、ローズマリン酸の効果を検討した。1,8-cineoleはhuh-7に対し抗腫瘍作用を持ち、ローズマリーエキスは肝星細胞の活性化を抑制したが、PTEN KOマウスに経口投与を行うとコントロール群よりも体重が増加し肝の脂肪化が進行した。これはローズマリーの抗鬱作用、食欲増進作用が経口摂取量の増加を通して肝の脂肪化を増悪させたものと考えられた。

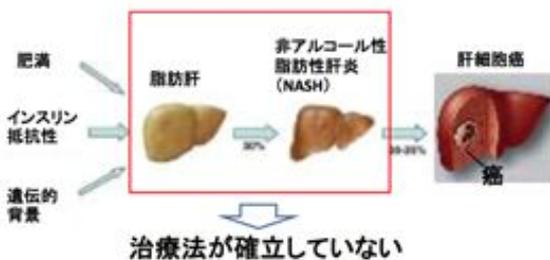
研究成果の概要(英文)：The effective treatment of NASH and following tumorigenesis is not yet to be determined. We focused on the natural compound of Rosemary extract (RE), and tested its effect. The antitumor effect of 1,8-cineole was shown on huh-7 cell lines, and RE showed suppressing effect on activated liver stellate cell. But after 8 week's oral treatment of RE on PTEN KO mouse resulted in the excess body weight and worsened liver fatty change, compared to that of control group. Rosemary has an anti-depressant and appetite promoting effect, and these could cause the adverse effects.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂肪肝 肝硬変 肝癌 ローズマリー シネオール

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞に脂肪(中性脂肪)が過度に沈着すると肝障害を引き起こす。肝臓中で脂肪滴を伴う肝細胞が30%以上認められる場合を脂肪肝という。現在、成人の20-30%は脂肪肝で、頻度は年々増加している。脂肪肝は糖尿病や肥満など生活習慣病の表現形として発症することが多くなってきた。肝臓の脂肪化に伴い炎症を起こし線維化が進行する病態は非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)と呼ばれ、肝硬変に至り、肝細胞癌を引き起こす可能性がある。成人の約1%程度がNASHであると考えられる。脂肪肝、NASHとも治療法は確立していない。



ここで我々はローズマリーに着目した。ローズマリーは地中海沿岸地方原産で、シソ科に属する常緑性低木である。生葉もしくは乾燥葉を香辛料として用いる。またその精油には1,8-cineoleの他カルノシン酸、ロズマリン酸などの有効成分を含んでおり、それらの成分はNASHの進行、肝硬変、肝癌発症を抑制することが期待できる。

## ローズマリー



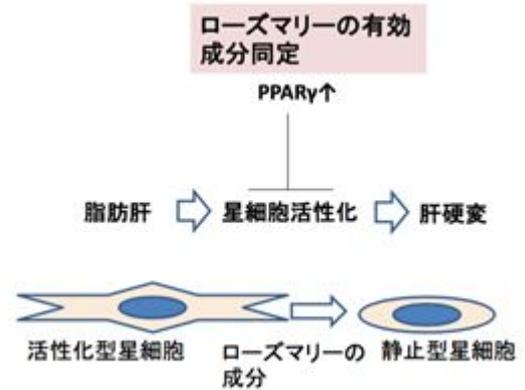
## 2. 研究の目的

ローズマリーに含まれる1,8-cineole、カルノシン酸、ロズマリン酸を組み合わせることにより効果的にNASHおよびNASHから進行する肝硬変、さらに肝細胞癌に対して画期的な治療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ローズマリーの成分による肝星細胞抑制効果の検討-in vitro

脂肪肝は肝星細胞を活性化させ、活性化した星細胞は線維を增生して肝硬変を来す。PPAR $\gamma$ の活性化が星細胞を活性化から静止型に戻すことがこれまで報告されている。本研究ではNASHモデルマウスより初代培養星細胞を採取し、ローズマリーの成分による星細胞の抑制効果を検討することとした。

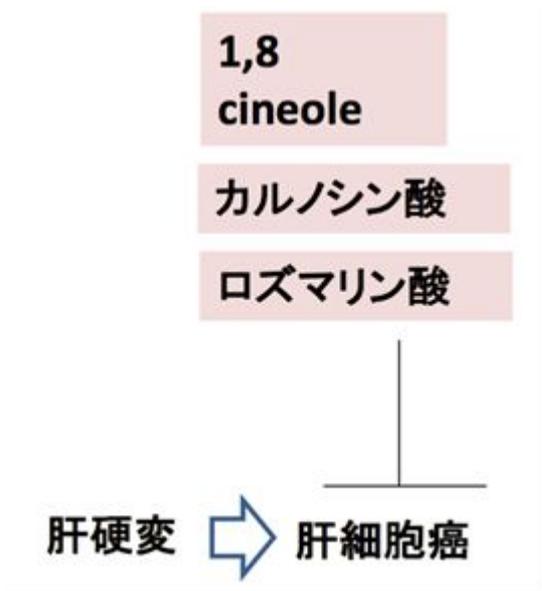


具体的には、まずPTEN KOマウス12週齢の肝よりGradient法により初代星細胞を採取した。星細胞の長径/短径が2以上をSpindle type(活性化型)、それ以下をOval type(静止型)と定義した。1度継代した後、6well dishに5000 cell/dishで播種し、RE1/5000の濃度で投与し48時間後の形態比率をランダムな10視野で比較した。さらにその直後にRNAを回収し、SMAについてのqPCRを行うことにより、星細胞の活性化を遺伝子発現の変化からも検討した(technical replicate=3)。

### ローズマリーの成分による肝細胞癌抑制効果の検討-in vitro

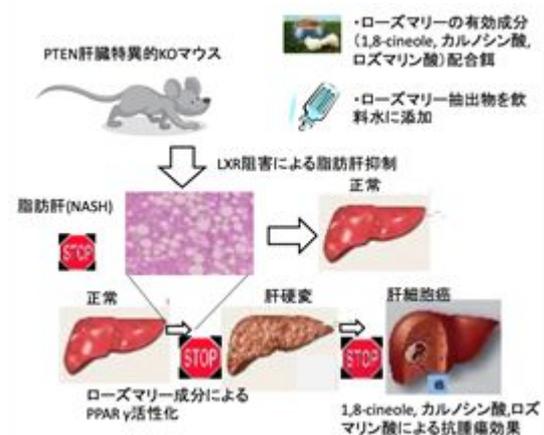
ローズマリーの成分のうち、1,8-cineoleに関しては大腸癌に対する抑制効果が報告されている。カルノシン酸とロズマリン酸に関しても種々の癌に対する抑制効果が報告されているが、いずれも肝細胞癌に対する抑制効果は明らかでない。本研究ではヒト肝癌細胞株Huh7に対し、3つの成分の抗腫瘍効果をWST-8を用いて検討することとした。シネオールは1 $\mu$ Mから1000 $\mu$ Mまで濃度を設定し、カルノシン酸・ロズマリン酸に関しては1 $\mu$ Mから100 $\mu$ Mまで濃度を設定した。また、ローズマリーは採取する地域や季節により、抽出液内でのカルノシン酸・ロズマリン酸の比が変動しているため、それぞれ1:3、3:1の割合で配合した場合の検討も同様に行った。具体的には96wellプレートにhuh-7を3000/wellずつ播種して24時間後に、各濃度の薬剤を添加し、48時間後にWST-8

assay により細胞生存率を計測した。



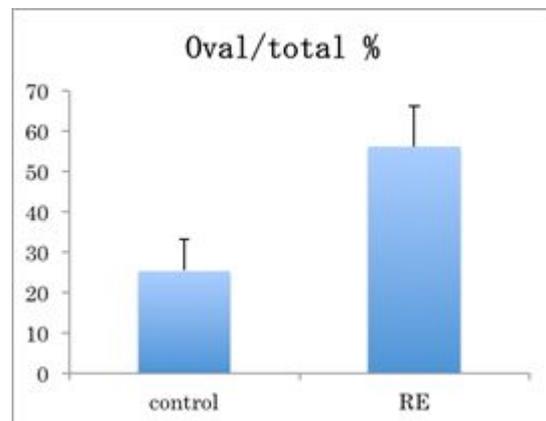
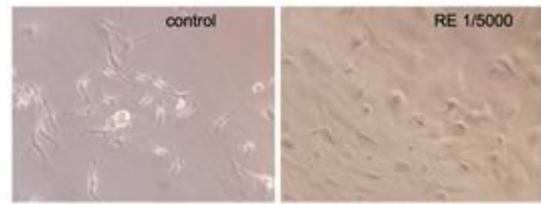
ローズマリー有効成分配合餌およびローズマリー抽出物の飲水による NASH 治療効果および肝癌予防治療法の確立

肝細胞癌を自然発生する PTEN 肝臓特異的 KO マウス(Horie Yet al J Clin Invest. 2004) に対し、ローズマリー抽出物を経口摂取させた。生後 12 週間から 8 週間投与して NASH の治療効果を検討した。検討項目は生存率、肝内脂肪含有量、肝細胞癌の個数とした。ローズマリーおよびその有効成分による NASH 治療、肝硬変治療、および肝癌予防効果の立証が目標である。ローズマリーの有効成分の配合飼料が抽出物より優位性があるようなら、将来的にはそれらの成分の製剤化を目指す。ローズマリー抽出物の飲用の方が優れているようなら、補助食品としてのローズマリーの評価を確立させていく。

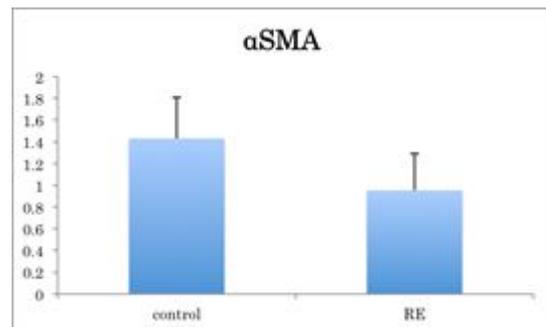


#### 4. 研究成果

RE による肝星細胞抑制効果の検討を行った。PTEN KO マウスより採取した初代肝星細胞に 1/5000 の濃度で RE を加えると、活性型の星細胞が有意に減少した。

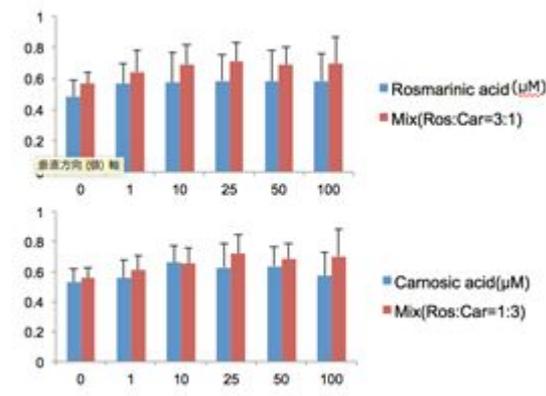
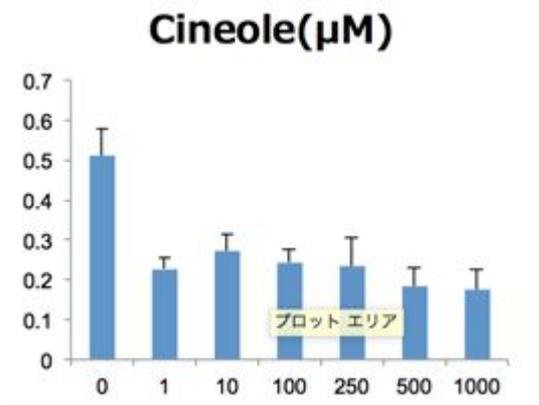


これにより RE による肝線維の抑制効果が示唆された。

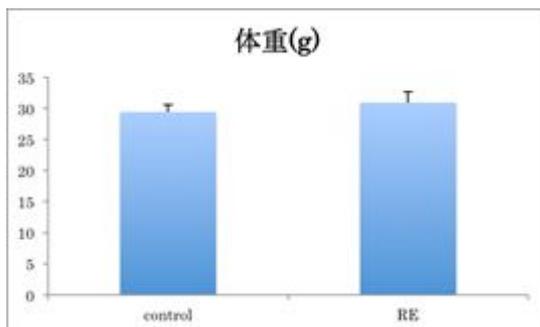


さらに肝線維化に關与する SMA の遺伝子変化を qPCR により測定すると、有意差はつかないものの RE 投与群で遺伝子発現が低下しており、RE が星細胞の活性化が抑制することが遺伝子発現の点からも支持された。

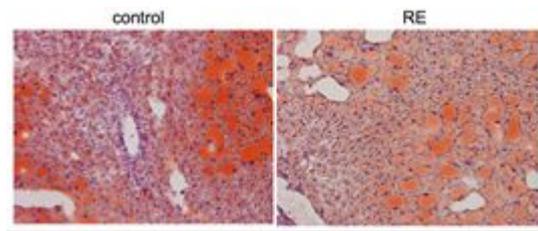
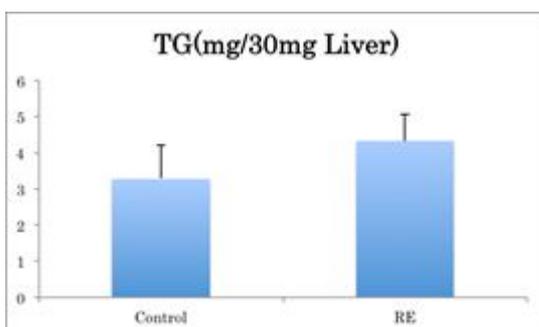
RE の主成分であるローズマリン酸、カルノシン酸、1,8-cineole をそれぞれ単剤として用いて、ヒト肝癌細胞株 Huh7 に対する腫瘍増殖抑制効果 WST-8 を検討した。1,8-cineole のみが有意に増殖抑制効果を示した(横軸：薬剤濃度、縦軸：細胞生存率)



エタノールで抽出したローズマリーエキス(以下 RE)を肝特異的 PTEN ノックアウトマウスに 12 週齢から 20 週齢まで経口内服させた。生存率は両群において 100%であり、肝癌の発生は認められなかった。仮説とは異なり、RE 投与群では実験終了時に control 群と比較し体重に差は認めなかった。



また、有意差はないものの肝の脂肪化が RE 群において進行していた。



この理由としては、ローズマリーには抗うつ効果・食欲増進作用があることが知られており、精油成分による NASH 改善効果よりも食餌摂取量増加による NASH の進行がより影響したことが考えられた。つまり、自由に食餌摂取が可能な状態で PTEN KO マウスに RE を投与しても、肝脂肪化の抑制にはつながらなかったことが明らかになった。

## 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 1 件)

Murata S, Ogawa K, Matsuzaka T, Chiba M, Nakayama K, Iwasaki K, Kurokawa T, Sano N, Tanoi T, Ohkohchi N. 1,8-Cineole Ameliorates Steatosis of Pten Liver Specific KO Mice via Akt Inactivation. *Int J Mol Sci.* 27;16(6):12051-63. 2015 (査読有)  
doi: 10.3390/ijms160612051.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 光一 (OGAWA, Koichi)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 20733637