

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580188

研究課題名(和文)酸化ストレス制御転写因子を標的とした脂肪肝の発症機構の解明と食品成分による予防

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of onset of steatohepatitis and prevention of pathogenesis with the food ingredients by targeting Nrf2

研究代表者

田中 裕滋 (TANAKA, Yuji)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00465650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝の発症機序の一因として酸化ストレス防御遺伝子群制御転写因子Nrf2に着目し、Nrf2欠損型マウスの解析からNrf2と脂肪肝の発症との関連性が示唆された。ワサビの成分でNrf2のアクチベーターである6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネートを投与したところ野生型マウスで脂肪肝の改善を認め、欠損型マウスで改善を認めなかったことよりNrf2を標的とした脂肪肝の予防や治療の可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress has been implicated in the transition from simple hepatic steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH). The Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) transcription factor serves as a cellular sensor for oxidative and electrophilic stress. Nrf2 deletion dysregulates hepatic mRNA expression of lipid and iron metabolism related genes and tends to increase hepatic triglycerides and iron, suggesting that Nrf2 may play a role in the pathogenesis of NASH. Wasabi derivative 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate, a potent Nrf2 activator, prevented the fatty liver produced by a high-fat diet in mice. These data indicated that Nrf2 could prevent the onset and progression of steatohepatitis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：Nrf2 酸化ストレス 脂肪肝 食品機能

1. 研究開始当初の背景

肝におけるメタボリック症候群の表現型として脂肪肝は認識されていたが重篤な疾患ではなく軽視されてきた。1980年に Ludwigにより非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)という疾患概念が提唱され脂肪肝の中にも炎症や線維化を伴い肝硬変にまで進展する病態が報告された。NASHに対して種々の既存の肝炎治療が試みられているが確立した有効な予防法や治療法は存在しない。諸家の報告によると NASH 患者の血中チオレドキシニン値や尿中 8-isoprostane の有意な上昇が認められ、病態の進展には酸化ストレスの関連性が指摘されている。酸化ストレスの原因の一つとして肝組織への高度の鉄蓄積が確認されており NASH 患者で瀉血療法や鉄制限食によって肝障害の改善が認められた。

一方、生体には食物に含まれる親電子性物質や活性酸素種によりもたらされる酸化ストレスに対してグルタチオン合成酵素などの解毒や抗酸化作用を有する酵素群が防御システムを構築することが知られている。これらの酸化ストレスに対する応答システムは転写因子である NF-E2-related factor 2 (Nrf2)により制御されている。Nrf2のノックアウトマウス(KO)の解析から KO の色々な臓器で薬物、炎症、免疫異常に対する感受性の亢進や易発癌性が認められ、Nrf2の機能が酸化ストレス防御だけにとどまらないことが示唆された。

我々の Nrf2 の KO を用いたこれまでの研究では、鉄の影響をみるために KO に鉄ニトリロ三酢酸を腹腔内投与したところ KO で腎機能障害の悪化と腎の過酸化脂質の増加を認めた(Tanaka et al. Toxicol Appl Pharmacol 2008)。また KO に高脂肪食(HFD)を1ヶ月間与えたところ、肝臓内の遊離脂肪酸濃度及び過酸化脂質の指標であるマロンジアルデヒド(MDA)値が KO で有意な上昇を認めたことを報告した(Tanaka Y et al. J Pharm Exp Ther 2008)。さらに KO にメチオニンコリン欠乏食(NASH 誘発食)を与えた結果、HFDの際と同様に KO では肝内脂肪滴と MDA の増加を認めたことを報告した(Zhang, Tanaka et al. Toxicol Appl Pharmacol 2010)。これらの研究成果より Nrf2 と脂質代謝との関連性および Nrf2 を標的とした脂肪肝炎の改善の可能性が示唆された。

Nrf2 を標的とした治療の観点から我々はアルファナフチルイソチオシアネート(alpha-naphthylisothiocyanate; ANIT) 誘発胆汁鬱滞型肝障害モデルにおいて、Nrf2 のアクチベーターである oltipraz(薬剤)投与によって野生型マウス(WT)で肝障害が改善し KO で改善を認めない結果を得た(Tanaka et al. Toxicol Sci 2009)。近年、抗酸化作用を有する幾つかのフィトケミカルのうち Nrf2 アクチベーターとしてプロッコリーやワサビの成分で癌の化学予防物質であるス

ルフォラファン(sulforaphane)やイソチオシアネート(isothiocyanates)が報告された。

以上の研究背景より、本研究計画では以前から言われている酸化ストレスが NASH の発症機構に関連しているかどうかを Nrf2 の KO を用いて解明する。さらに Nrf2 を標的として食品成分の Nrf2 アクチベーターを高脂肪食や鉄添加高脂肪食を摂取したマウスに投与することで脂肪肝炎を予防できるかどうかも明らかにする。

2. 研究の目的

NASH は本邦でも食事の欧米化に伴って増加傾向にあり病態の解明および予防法や治療法の確立が必要である。本研究は NASH の発症機序の一般的な理論として考えられている脂肪肝(first hit)をベースとしたうえで酸化ストレスやサイトカインが修飾して発症するという説(two hit theory)に基づいている。Second hit の一因として NASH 患者において肝内の鉄の過剰蓄積に由来する酸化ストレスの関連性が指摘されている。一方、酸化ストレスに対する防御遺伝子群を制御する転写因子 Nrf2 が近年注目されている。我々はこの Nrf2 に着目して、本研究計画では KO(酸化ストレスに対して脆弱なマウス)に高脂肪食及び NASH 患者肝内に高頻度で蓄積する鉄を添加した食餌を与えて NASH 発症機序と Nrf2 の関連性及び鉄代謝と Nrf2 の関連性を明らかにする。さらに本研究では Nrf2 と脂質代謝や鉄代謝との関連性に関する結果を踏まえて、食品機能という観点から Nrf2 のアクチベーターと考えられる食品成分を高脂肪食や鉄添加高脂肪食を摂取したマウスに投与し、治療法の確立していない NASH に対して Nrf2 を標的とした予防や治療が可能かどうか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NASH 病態解明のため Nrf2 と NASH 及び鉄代謝との関連性に関する研究

コントロール食、高脂肪食及び鉄添加高脂肪食を WT と KO 計 8 グループ (; 7 週齢; 1 グループ 6 匹)に摂取させ 12 週間後に血液及び肝臓を摘出し解析に用いる。以下に 4 種類の食餌を示す。

コントロール食: 4%大豆油食を 12 週間摂取

を 8 週間摂取した後、4%大豆油+0.5%カルボニル鉄食を 4 週間摂取

4%大豆油+16%ラード食を 12 週間摂取

を 8 週間摂取した後、4%大豆油+16%ラード+0.5%カルボニル鉄食を 4 週間摂取

は AIN-93M 準拠食で必須脂肪酸を含む大豆油を含有しコントロール食として用いる。

は過去の報告よりカルボニル鉄摂取にて肝組織所見にて鉄蓄積が確認されヘモクロマトーシス様の変化が認められる。我々は以前に 10%ラードを含有した食餌を 12 週間与えると脂肪肝が形成される事を確認している

ことより必須脂肪酸を含む大豆油と 16%ラードを加え油脂含有量を合計 20%とし高脂肪食として用いる。鉄含有高脂肪食として調整する。

分析内容与方法

肝内脂質レベルおよび血中肝胆道系酵素や脂質の解析

肝臓からの脂質はクロロホルム-メタノール混合液にて抽出する。脂質測定項目は、中性脂肪、コレステロールを市販酵素法測定キットを用いて測定する。また脂肪肝や肝炎の程度は血中肝胆道系酵素 (ALT, AST, ALP) の測定値から評価する。さらに血中のコレステロールや中性脂肪も高脂血症の程度を評価するために測定する。

肝肉眼所見および組織所見の評価

肉眼所見および組織所見にて脂肪肝のみならず、炎症所見や線維化の所見がないか明らかにする。H&E 染色で肝臓内脂肪滴や炎症の程度を評価する。また van Gieson 染色を行うことで肝線維化の有無と程度を評価する。

肝臓内の鉄量や酸化ストレスの解析

肝内鉄量を測定することで鉄吸収代謝動態における Nrf2 の機能を明らかにする。また肝内酸化ストレスを定量することで Nrf2 の脂肪肝における酸化ストレス防御能を評価する。鉄は強酸下で肝を分解し比色法にて肝内鉄量を測定する。また脂質酸化損傷のマーカとして肝臓のマロンジアルデヒド (MDA) を比色法による市販測定キットを用いて測定する。

肝臓における遺伝子発現量の解析

種々の遺伝子 (Nrf2 標的遺伝子、脂質代謝関連遺伝子、鉄代謝関連遺伝子、炎症や線維化関連遺伝子) の発現量を測定する。肝臓より RNA を抽出し cDNA を合成し 7900HT Fast Real Time PCR Systems を用いて mRNA 発現量を定量する。

(2) Nrf2 アクチベーターである食品成分の投与による NASH の予防効果に関する研究

コントロール食、高脂肪食及び鉄含有高脂肪食を WT、Heterozygote (Hetero)、及び K0 の 15 グループ (; 7 週齢; 1 グループ 6 匹) に計 12 週間摂取させ、Nrf2 のアクチベーター (ワサビの成分: 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-MSITC); 10mg/Kg/day) を最終 4 週間に週 4 回腹腔内投与することで脂肪肝を予防できるかどうか肝組織、血液検査、肝内脂質レベルや鉄量、酸化ストレスのマーカなど前述の実験 (1) と同様の方法で評価する。以下に 5 種類の食餌を示す。

コントロール食: 4%大豆油食を 12 週間摂取

4%大豆油+31%ラード食を 12 週間摂取

を 12 週間摂取+最終 4 週 6-MSITC を週 4 回腹腔内投与

を 6 週間摂取した後、4%大豆油+31%ラード+1%カルボニル鉄食を 6 週間摂取

と同様に 12 週間摂取+最終 4 週 6-MSITC を週 4 回腹腔内投与

4. 研究成果

(1) NASH 病態解明のため Nrf2 と NASH 及び鉄代謝との関連性に関する検討

非アルコール性脂肪肝 (NASH) の病態発症機序には脂肪肝患者において鉄の過剰蓄積などに由来する酸化ストレスとの関連性が指摘されている。一方、酸化ストレスに対する防御遺伝子群を制御する転写因子 Nrf2 が近年注目されている。我々は、肝臓における鉄代謝と脂質代謝が Nrf2 により如何なる制御をうけているか解明するために前述の方法の如く、7 週齢雄性の WT および Nrf2 KO に 4 種類の食餌を摂取させ、血液生化学検査と肝内脂質及び鉄濃度測定、肝組織学的検討、及び肝臓の脂質代謝や鉄代謝関連遺伝子の発現測定を行った。血中コレステロールは高脂肪食群間で KO に比較して WT で増加していた。肝内脂質に関しては、WT 内群間でコントロール食群に比較して鉄添加高脂肪食群で総コレステロールの増加を認め、高脂肪食群及び鉄添加高脂肪食群で中性脂肪の増加を認めた。またコントロール食群間で WT に比較して KO で中性脂肪の増加傾向を認めたが KO 内群間で変化を認めなかった。このことより、Nrf2 と脂質代謝との関連性と Nrf2 が脂肪肝を抑制する可能性が示された。また KO の全食餌群で 6 匹中 1~2 匹血中ビリルビンの上昇を認め、組織学的検討では van Gieson 染色で一部の KO において肝線維化を認めた。このことより一部の KO ではあるが、線維化に至る要因の存在が示唆された。そこで NASH 発症機序の定説である two hit theory の second hit の一つとして考えられる肝内鉄値を測定したところ、肝内鉄値は高脂肪食群間で WT に比較して KO で増加傾向を認めた。次に肝内酸化ストレスの程度を評価するために肝内 MDA (酸化ストレスマーカ) を測定したところ、MDA は WT 群間で他群に比較して鉄添加高脂肪食群で増加傾向を認めた。KO 群間でコントロール群に比較して鉄添加群、高脂肪食群、鉄添加高脂肪食群で増加を認めた。また高脂肪食群間で WT に比較して KO で増加を認めた。このことより Nrf2 は鉄代謝に関連して肝内鉄レベルに影響を及ぼしている可能性が示唆された。以上の結果を踏まえて、脂質代謝及び鉄代謝関連遺伝子発現量を測定したところ、WT 群では鉄添加高脂肪食群で

酸化関連遺伝子、小腸からの鉄吸収調節遺伝子である hepcidin、及び肝から血中への鉄排泄を担う ferroportin1 の相加的な発現の増強を認めたが、KO 群では WT 群で認められた発現の増加は認めなかった。KO 群において脂質代謝及び鉄代謝関連遺伝子の発現調節不全が認められ、おそらくこのことが肝内脂質及び鉄レベルの増加傾向を引き起こし、更には一部のマウスに線維化が認められた一要因になっている可能性が考えられた。実験

(1)から、Nrf2 は脂質代謝や鉄代謝に関連する遺伝子の発現調節に関与しており、Nrf2 が欠損すると肝内脂肪や鉄値の増加を招き、延いては線維化を引き起こすことがあることが証明された。本研究では Nrf2 の脂質代謝及び鉄代謝における役割を解明したことで NASH の発症機序と考えられている two hit theory の一部解明に寄与したと考えられる。

(2)Nrf2 アクチベーターである食品成分の投与による NASH の予防効果に関する検討

食品で Nrf2 アクチベーターと考えられているワサビの成分である 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート(6-MSITC)の脂肪肝及び鉄蓄積の改善効果について前述の方法の如く、7 週齢雄性の WT、Hetero、及び KO に 5 種類の食餌を摂取させ、血液生化学検査と肝内脂質及び鉄濃度測定、肝組織学的検討、及び肝臓の脂質代謝や鉄代謝関連遺伝子の発現測定を行った。血液検査では WT で血清 ALT がコントロール群に比較して高脂肪食群で上昇の傾向が認められたが、6-MSITC を投与することで改善傾向が認められた。一方、Hetero 及び KO では 6-MSITC を投与しても ALT の改善は認められなかった。肝内中性脂肪は WT でコントロール群に比較して高脂肪食群で増加が認められたが、6-MSITC を投与することで有意に抑制された。しかしながら、Hetero 及び KO では 6-MSITC を投与しても改善しなかった。肝組織学的検討では H&E 染色において WT でコントロール群に比較して高脂肪食群で著明な脂肪滴が認められるも、6-MSITC 投与で脂肪滴が抑制された。一方、Hetero 及び KO では 6-MSITC 投与にて脂肪滴の減少は認められなかった。以上の如く、WT、Hetero、及び KO に高脂肪食を 12 週間摂取させることで全 genotype で脂肪肝が形成されるが 6-MSITC の投与で脂肪肝の改善は WT のみ認められたことより、Nrf2 アクチベーターと考えられる 6-MSITC は Nrf2 依存性に脂肪肝を改善することが示された。肝臓の遺伝子発現を mRNA レベルで検討したところ、Nrf2 標的遺伝子である NQO-1, GCLC, Mrp4 が WT でコントロール群に比較して高脂肪食群で増加し、6-MSITC を投与することで高脂肪食による発現の増加は抑制された。しかしながら、Hetero 及び KO で遺伝子の発現の変化は認められなかった。脂肪酸代謝関連遺伝子に関しては、肝内への脂肪酸取り込みを担う遺伝子 CD36 とその転写因子 PPAR と脂肪酸合成酵素の転写因子である SREBP-1c も Nrf2 標的遺伝子の発現と同様の变化で、WT でコントロール群に比較して高脂肪食群で増加し 6-MSITC を投与することで高脂肪食による発現の増加は抑制傾向にあったが、Hetero 及び KO 群間では変化を認めなかった。このことより、これら脂肪酸代謝関連遺伝子の 6-MSITC による抑制効果が脂肪肝改善に寄与した可能性が考えられた。また炎症マーカーである TNF と MCP-1 の発現

も脂肪酸代謝関連遺伝子の発現と同様の变化で、6-MSITC による Nrf2 依存性の抗炎症作用が示唆された。次に鉄添加高脂肪食を摂取させたマウスに 6-MSITC を投与したところ、WT、Hetero、及び KO のどの genotype においても血清 ALT、血清鉄、肝内鉄量、及び鉄関連遺伝子である TfR1、Ferroportin1 の肝 mRNA 発現に有意な変化は認められなかった。

ワサビの成分である 6-MSITC の投与によって高脂肪食を摂取させた WT では脂肪肝改善と炎症性サイトカインの改善傾向が認められ、KO では改善が認められなかったことから 6-MSITC は Nrf2 依存性に肝への脂肪沈着とサイトカインを抑制する事が明らかとなった。以上のことより治療法の確立していない NASH に対して Nrf2 を標的とした食品成分による予防や治療の可能性が明らかとなった。

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)

Tanaka Y, Ikeda T, Yamamoto K, Ogawa H, Kamisako T. Dysregulated expression of fatty acid oxidation enzymes and iron-regulatory genes in livers of Nrf2-null mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2012;27:1711-1717. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07180.x.
査読有

[学会発表](計1件)

Yuji Tanaka, Wasabi derivative 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate, a potent Nrf2 activator, prevents the fatty liver produced by a high-fat diet but does not attenuate hepatic iron overload in mice, 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2013/11/2, Walter E. Washington Convention Center (アメリカ ワシントン DC)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 裕滋 (TANAKA, Yuji)
近畿大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00465650

(2)研究分担者

上裕 俊法 (KAMISAKO, Toshinori)
近畿大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：20233934

(3)研究協力者

小川 博 (OGAWA, Hiroshi)
帝塚山学院大学・人間科学部・教授
研究者番号：00133546