

令和元年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00849

研究課題名(和文) 食事中タンパク質のNAFLD予防・治療作用とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Dietary protein reduces hepatic steatosis and prevents non-alcoholic fatty liver disease

研究代表者

渡邊 一史 (Watanabe, Hitoshi)

金沢大学・新学術創成研究機構・特任助教

研究者番号：50721495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓脂肪蓄積を特徴とする非アルコール脂肪性肝疾患(NAFLD)が増加している。NAFLDの予防・治療に食事療法が不可欠だが、タンパク質摂取が食事療法において果たす役割は解明されていない。本研究では、マウスへの緑豆タンパク質給餌による脂肪肝・NAFLD抑制作用を検討した。緑豆タンパク質は、マウス肝臓における脂肪酸合成を抑制し、中性脂肪量を低下させた。また、緑豆タンパク質は、高脂肪高コレステロール飼料給餌によるNAFLDの進行を抑制した。本研究より、緑豆タンパク質がNAFLDの食事療法の一つになる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満・インスリン抵抗性の増加に伴い、NAFL・NASHともに罹患率が増加している。一方で、NAFLDの予防・治療は、食事療法以外には確立されていない。本研究において、食品中タンパク質が肝臓脂肪蓄積量とNAFLDの予防・治療に有用であるかを解明することは、摂取タンパク質の「質」に依存した新規食事療法を生み出すことであり、食事療法のメカニズムの解明や抗NAFLD食事療法の効率化に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of NAFLD has increased with the increased prevalence of obesity and metabolic syndrome. Recent studies indicate that NAFLD onset and progression may be influenced by the nutrients in food as well as the total calories ingested. However, it isn't revealed whether protein in food prevents NAFLD progression. In this study, we evaluated the potential of mung bean protein isolate (MPI) to prevent NAFLD progression. MPI decreased the hepatic triglyceride concentration by inhibition of fatty acid synthesis. Additionally, NAFLD progression by atherogenic diet was prevented by MPI intake. These results indicate that MPI reduced hepatic triglyceride accumulation and may be a food to prevent NAFLD progression.

研究分野：代謝学

キーワード：脂肪肝 NAFLD 食品

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥満の増加に伴い、非アルコール脂肪性肝疾患 (NAFLD) が増加している。NAFLD は、非アルコール性の肝臓脂肪蓄積を特徴とし、単純性脂肪肝 (NAFL) から脂肪肝炎 (NASH)・肝硬変へと進展する疾患である。健康診断で 4 人に 1 人は NAFL と診断され、そのなかで約 1% が NASH へと進展する。NAFLD は、インスリン抵抗性に伴う肝臓脂肪蓄積と、それに伴う細胞障害に起因することが知られているが、食事療法によるインスリン抵抗性の改善以外には決定的な予防・治療法は明らかにされていない。

NAFLD の食事療法として、摂取エネルギーの適正化という「量」の管理とともに、「質」の管理の重要性が指摘されている。実際に、脂質の摂取に関しては、脂質摂取量の制限とともに、

-3 脂肪酸摂取の NAFLD 予防・改善作用の可能性が指摘されている。一方で、三大栄養素であるタンパク質、特に食事時のタンパク質の「質」については、NAFLD の食事療法における重要性は明らかにされていない。大豆タンパク質など特定のタンパク質摂取が、肝臓脂肪蓄積を減少させることが報告され<sup>(1)</sup>、摂取するタンパク質の種類によって NAFLD 食事療法の予防・改善効果が異なる可能性が示唆される。しかし、大豆タンパク質においても、その肝臓脂肪蓄積改善作用のメカニズムは十分に解明されていない。

代表者は、脂肪肝・NAFLD を抑制する新規タンパク質機能素材として 8S グロブリンを主成分とする緑豆タンパク質に着目した。8S グロブリンは、大豆タンパク質中の脂肪肝抑制作用を発揮する成分分画である 7S グロブリンに類似したタンパク質である。大豆タンパク質中の 7S グロブリン割合は約 2 割と低い含有量である一方で、緑豆タンパク質中の 8S グロブリン割合は約 9 割と高い含有量であり、緑豆タンパク質はより大きな肝臓脂肪蓄積改善作用を発揮できる可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、食事中タンパク質の NAFLD 予防・治療への有用性とそのメカニズムを検討する。具体的には、(1) 新規タンパク質機能素材である緑豆タンパク質の脂肪肝への作用解析、(2) 緑豆タンパク質の NAFLD への作用解析、(3) 緑豆タンパク質の作用メカニズムの解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 高脂肪飼料 (HF-Cas) 中に含まれるタンパク質であるカゼインをすべて緑豆タンパク質に置換した高脂肪食飼料 (HF-MPI) および大豆タンパク質に置換した高脂肪飼料 (HF-SPI) を作成した。これらの飼料をマウスへ給餌することによってこれらタンパク質の脂肪肝予防作用を検討した。4 週間の高脂肪食負荷後、マウスより肝臓をサンプリングし、中性脂肪量、遺伝子発現量解析を解析した。

(2) 高脂肪高コレステロール飼料 (AD-Cas) をマウスに給餌することによって、NAFLD を誘導することができる<sup>(2)</sup>。そこで、高脂肪高コレステロール飼料中に含まれるタンパク質であるカゼインをすべて緑豆タンパク質に置換した高脂肪食飼料 (AD-MPI) を作成し、マウスに 20 週間給餌した。20 週間給餌後にマウスより肝臓をサンプリングし、中性脂肪量、肝臓炎症マーカーである血中 AST 濃度と血中 ALT 濃度、遺伝子発現量解析および組織染色により NAFLD の進展を評価した。

(2) 緑豆タンパク質は、摂取後消化吸収される過程において、アミノ酸やジペプチド、トリペプチドとなり脂肪肝抑制効果を発揮すると考えられる。緑豆タンパク質が肝臓に直接作用することを想定し、初代培養肝細胞をアミノ酸もしくは緑豆タンパク質を消化酵素処理した緑豆タンパク質消化処理物による刺激実験を行った。初代培養肝細胞における脂肪合成に与える影響を遺伝子発現解析により検討した。

### 4. 研究成果

(1) 緑豆タンパク質の肝臓における脂肪肝、NAFLD への作用解析

肝臓中性脂肪量は、HF-MPI 区、HF-SPI 区ともに HF-Cas 区と比して減少した (図 1)。HF-MPI 区では、HF-SPI 区よりもさらに肝臓中性脂肪量が低下した。一方、体重、血糖値、血中インスリン濃度、血中中性脂肪量、糖負荷試験においてはこれらの区間に有意な差はみられなかった。肝臓中性脂肪量と密接に関係する脂肪酸合成関連遺伝子発現、脂肪酸取り込み関連遺伝子発現および脂肪酸酸化関連遺伝子発現を定量的 PCR により検討した。脂肪酸取り込み関連遺伝子および脂肪酸酸化関連遺伝子発現は、HF-MPI 区、HF-SPI 区ともに HF-Cas 区とは有意な差は認められなかった。脂肪酸合成関連遺伝子である脂肪酸合成酵素 Fasn、脂肪酸合成時に必要な NADPH を産生する G6pd2 と G6pdx の発現が、HF-MPI 区、HF-SPI 区ともに HF-Cas 区と比べて有意に低下した。さらに、HF-MPI

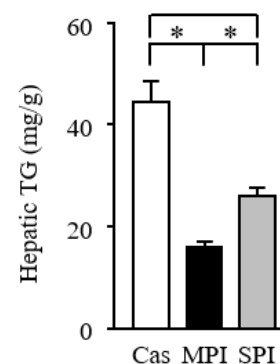


図1. 緑豆タンパク質による脂肪肝改善作用

区では、脂肪酸不飽和化酵素 Scd1、Fasn および Scd1 の転写因子である Srebf1 の発現が HF-Cas 区と比べて減少した。これらのことから、緑豆タンパク質は、肝臓における脂肪酸合成を抑制することで脂肪肝を抑制しており、大豆タンパク質よりも作用が強い傾向があることが示唆された。

### (2) 緑豆タンパク質の NAFLD への作用解析

緑豆タンパク質が脂肪肝を抑制したことから、高脂肪高コレステロール食給餌による NAFLD 誘導モデルを用いて、緑豆タンパク質の NAFLD 抑制作用を検討した。AD-Cas 区では、通常飼料区に比べて、肝臓中性脂肪量、血中 AST 濃度と血中 ALT 濃度、肝臓の炎症および線維化の増加が認められた。AD-MPI 区では、AD-Cas 区に比べて肝臓中性脂肪量の減少が認められた。また、肝障害のマーカーである血中 AST 濃度と血中 ALT 濃度も AD-MPI 区では、AD-Cas 区に比し低下を示した。肝臓遺伝子発現解析では、AD-MPI 区で肝臓炎症関連遺伝子である Ccl2、Tnf、Il6 の発現および線維化マーカーである Acta2、Tgfb1、Col1a1 の発現が有意に低下した。組織染色においても AD-MPI 区では、コラーゲンタンパク質を染色するシリウスレッド染色において顕著な染色性の低下が観察された。一方で、AD-MPI 区と AD-Cas 区では体重に変化はなかった。これらのことから、緑豆タンパク質は脂肪肝を抑制することにより NAFLD の進展に抑制的に作用することが示唆された。

### (3) 緑豆タンパク質の作用メカニズムの解析

緑豆タンパク質による脂肪肝抑制作用のメカニズムを検討するために、まず緑豆タンパク質を構成するアミノ酸と同じ割合でアミノ酸を配合した高脂肪飼料 (HF-MPI-AA) を作成し、マウスに給餌し、肝臓の中性脂肪量および肝臓脂肪酸合成関連遺伝子発現を解析した。HF-MPI 区では HF-Cas 区と比べて肝臓中性脂肪量が低下したが、HF-MPI-AA 区では HF-Cas と同様の値を示し、脂肪肝抑制作用は認められなかった (図2)。また、脂肪酸合成関連遺伝子である Fasn、Scd1、Srebf1 においても HF-MPI-AA 区では、HF-Cas と比して変化はなかった。これらのことから、緑豆タンパク質はアミノ酸レベルまで分解すると脂肪肝抑制作用を失うことが示唆された。

次に、初代培養肝細胞を用いて緑豆タンパク質の消化酵素処理物の添加実験を行った。初代培養肝細胞では、緑豆タンパク質の消化酵素処理物を添加すると脂肪酸合成関連遺伝子である Fasn、Scd1、Srebf1 遺伝子発現が低下した。一方で、緑豆タンパク質のアミノ酸組成と同様の割合で作成したアミノ酸を添加すると、マウス個体への給餌実験と同様に Fasn、Scd1、Srebf1 の遺伝子発現には影響を与えなかった。

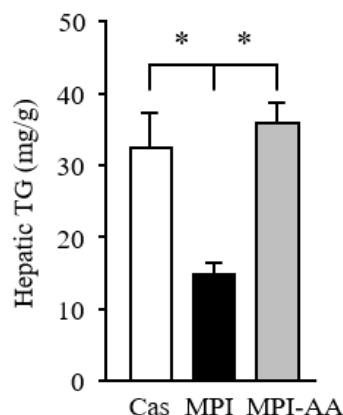


図2. 緑豆タンパク質アミノ酸では脂肪肝改善作用が喪失

### <引用文献>

- 1) Schwarz J, Tomé D, Baars A, Hooiveld GJ, Müller M. Dietary protein affects gene expression and prevents lipid accumulation in the liver in mice. *PLoS One*. 2012;7(10):e47303.
- 2) Matsuzawa N1, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007;46(5):1392-403.

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計5件)

- Kimura K, Inaba Y, Watanabe H, Matsukawa T, Matsumoto M, Inoue H. Nicotinic alpha 7 acetylcholine receptor deficiency exacerbates hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Diabetes Investig*. 2019;10(3):659-666. doi: 10.1111/jdi.12964.
- Nakatani A, Li X, Miyamoto J, Igarashi J, Watanabe H, Sutou A, Watanabe K, Motoyama T, Tachibana N, Kohno M, Inoue H, Kimura I. Dietary mung bean protein reduces high-fat diet-induced weight gain by modulating host bile acid metabolism in a gut microbiota-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 ;501(4):955-961. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.090.
- Watanabe H, Inaba Y, Kimura K, Matsumoto M, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Sirt2 facilitates hepatic glucose uptake by deacetylating glucokinase regulatory protein. *Nat Commun*. 2018;9(1):30. doi: 10.1038/s41467-017-02537-6.
- Watanabe H, Inaba Y, Kimura K, Asahara SI, Kido Y, Matsumoto M, Motoyama T, Tachibana

N, Kaneko S, Kohno M, Inoue H. Dietary Mung Bean Protein Reduces Hepatic Steatosis, Fibrosis, and Inflammation in Male Mice with Diet-Induced, Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Nutr.* 2017;147(1):52-60. doi: 10.3945/jn.116.231662.  
Hondo T, Someya S, Nagasawa Y, Terada S, Watanabe H, Chen X, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Nochi T, Aso H. Cyclophilin A is a new M cell marker of bovine intestinal epithelium. *Cell Tissue Res.* 2016;364(3):585-97. doi: 10.1007/s00441-015-2342-1.

〔学会発表〕(計 11 件)

渡邊一史、稲葉有香、松本道宏、春日雅人、井上啓：第 39 回日本肥満学会 「SIRT2 はグルコキナーゼ調節タンパク質の脱アセチル化を介して肝臓糖取り込みを制御する」2018 年 10 月 8 日 (神戸国際会議場 神戸)

渡邊一史、稲葉有香、松本道宏、春日雅人、井上啓：第 23 回アディポサイエンス・シンポジウム「NAD+は肝糖取り込みを調節する」2018 年 8 月 18 日 (千里ライフサイエンスセンター 大阪)

渡邊一史、松本道宏、春日雅人、井上啓：第 91 回日本内分泌学会学術総会「SIRT2 による肝臓糖取り込み機構の解明」2018 年 4 月 26 日 (フェニックス・シーガイア・リゾート 宮崎)

渡邊一史、松本道宏、春日雅人、井上啓：第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会「肥満モデルにおける肝糖取り込み障害メカニズムの解明」2018 年 2 月 23 日 (ウインクあいち 名古屋)

稲葉有香、渡邊一史、木村久美、井上啓：第 38 回日本肥満学会 「脂肪肝再生障害における統合的ストレス応答による細胞死誘導のメカニズムの検討」2017 年 10 月 7 日 (大阪国際会議場 大阪)

井上啓、渡邊一史、稲葉有香、木村久美、橘伸彦、本山貴康、河野光登：第 38 回日本肥満学会 「非アルコール性脂肪性肝疾患の予防における緑豆タンパクの有用性」2017 年 10 月 7 日 (大阪国際会議場 大阪)

渡邊一史、春日雅人、井上啓：第 38 回日本肥満学会 「NAD+/SIRT2 作用の低下は肝糖取り込みを障害する」2017 年 10 月 7 日 (大阪国際会議場 大阪)

渡邊一史：自然科学研究機構生理学研究所研究会 「肥満・2 型糖尿病モデルにおける肝臓糖取り込み障害のメカニズム」2017 年 9 月 24 日 (生理学研究所 岡崎)

渡邊一史、稲葉有香、木村久美、松本道宏、金子周一、春日雅人、井上啓：第 35 回内分泌代謝学サマーセミナー「NAD+による肝糖取り込み調節機構の解析」2017 年 7 月 15 日 (水上館 群馬)

渡邊一史、松本道宏、春日雅人、井上啓：第 28 回分子糖尿病学シンポジウム「SIRT2 の肝臓糖取り込みにおける重要性」2016 年 12 月 3 日 (タワー111 富山)

稲葉有香、渡邊一史、木村久美、井上啓：第 34 回内分泌代謝学サマーセミナー「脂肪肝再生過程での肝細胞障害関連転写因子の役割」2016 年 7 月 16 日 (久山温泉ホテル夢家 福岡)

〔その他〕

ホームページ等

<http://inoue.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。