

かき肉エキスは非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスにおける脂肪蓄積を低減する

福田 卓, 春松 慎, 松井博之, 松田芳和
(日本クリニック(株)・中央研究所*)

Oyster Extract Ameliorates Steatosis in Mice Model with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

Suguru FUKUDA, Shin HARUMATSU, Hiroyuki MATSUI and Yoshikazu MATSUDA
Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.

Summary

We studied whether oyster extract protected a model mouse of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) against steatosis and inflammation. Male C57BL/6JJmsSLC mice were randomly divided into 3 groups that were fed different diets for 6 weeks: the negative control group received a standard diet (AIN-93G), the positive control group were fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDAHFD; to induce NASH) plus methionine and choline (at equivalent levels to those found in the oyster extract), and the oyster extract group were given the CDAHFD plus oyster extract. The serum biomarker levels of the mice were used as markers of liver failure. The histopathology of the liver and hepatic fibrosis (i.e., the *mRNA* levels of fibrosis-related genes such as *Col1a1*, *Col3a1*, *Col4a1*, and *Ctgf*) were examined in order to assess hepatic steatosis and inflammation, respectively. The mice fed the CDAHFD plus methionine and choline developed enlarged fatty livers and inflammation. However, treatment with oyster extract ameliorated the hepatic steatosis and inflammation induced by the CDAHFD. Moreover, a smaller CDAHFD-induced increase in fibrosis-related gene expression was seen in the livers of the mice fed oyster extract. These findings suggest that oyster extract suppresses non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting steatosis.

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) とは飲酒量がエタノール換算で、1日20g以下で脂肪肝を呈する疾患である。NAFLDは単純性脂肪肝および非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) の2つの疾患概念に分けられる。特に、NASHは肝硬変や肝がんに行進する可能性があり、臨床的に重要な意味を持つ。近年、世界的な工業化に伴い、運動不足や摂取カロリーの増加などを原因としたメタボリックシンドロームが問題となっている。2030年には欧米において、ほとんどの慢性肝疾患の病態がメタボリックシンドロームに起因すると予測されている¹⁻³⁾。また、日本における前向き研究で、メタボリックシンドローム該当者のNAFLD有病率は研究開始時に18%であった⁴⁾。その後、平均13.8ヶ月の調査期間中に未発症者の約10%が新たにNAFLDを発症したと報告されている⁴⁾。日本では成人の約1%がNASHであると推計されており⁵⁾、食生活の欧米化やライフスタイルの変化に伴い、今後さらに増加す

ることが予想される。

現在、NASH発症のメカニズムは解明されていないが、2ヒットセオリーが一般的に提唱されている⁶⁾。まず、遊離脂肪酸流入の増加、インスリン抵抗性などを原因とした肝臓への脂肪蓄積が起こる。次に、酸化ストレスや炎症性サイトカインなどを原因とした炎症が加わり、NASHに行進する。Fig. 1に示すように、6つのNAFLD/NASHモデル動物が考案されている⁷⁾。本研究で用いたモデルは、VLDL分泌抑制モデル (Fig. 1. IV) である。VLDLは肝臓から末梢にトリグリセリドを運ぶ役割を担っている。VLDL形成にはホスファチジルコリンが不可欠であり、その合成にはコリンとメチオニンが必要である。VLDL分泌抑制モデルではコリンとメチオニンを欠乏させることで肝臓への脂肪蓄積を惹起している。しかし、このモデルは、NASHとは異なり、体重が減少するという問題点がある⁸⁾。そこで本研究では、体重減少を抑えるため、メチオニンを完全欠乏させるのではなく、減量に留めた。そし

*所在地：京都市右京区太秦開日町10-1 (〒616-8555)

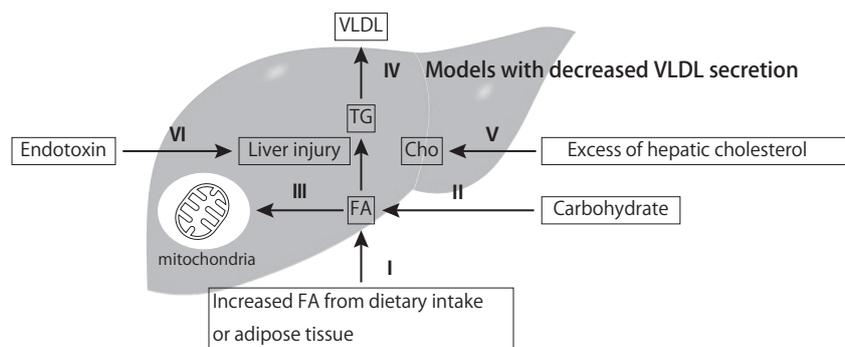


Fig. 1 Characteristics of the rodent NAFLD/NASH model

- (I) Increases in the supply of FA from dietary intake or adipose tissue cause fatty changes in the liver.
 - (II) Hepatic FA are synthesized from carbohydrates via pathways regulated by SREBP-1c and ChREBP.
 - (III) FA oxidation occurs in mitochondria, peroxisomes, and microsomes.
 - (IV) Hepatic TG are released from the liver as components of VLDL.
 - (V) Hepatic cholesterol accumulation leads to calcium depletion and ER stress, with the activation of the unfolded protein response and ER stress-induced apoptosis.
 - (VI) Low doses of endotoxins cause liver damage in HFD-induced steatosis.
- FA: fatty acids, SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c, ChREBP: carbohydrate response element-binding protein, TG: triglycerides, VLDL: very low density lipoproteins, ER : endoplasmic reticulum, HFD: high fat diet

て、脂肪蓄積の効果をより高めるため、飼料にラードを加えた。

薬物性肝障害モデル動物⁹⁾ および慢性肝疾患患者¹⁰⁾ に対して、かき肉エキスは肝臓保護効果を持つことが報告されている。また、培養細胞においてかき肉エキスは抗酸化作用¹¹⁾ を持つことも報告されている。そこで、我々はかき肉エキスが、上述した NAFLD/NASH モデル動物に対してどのように影響するかを検討した。

材料と方法

実験動物および実験飼料

体重 18~23 g の 5 週齢 C57BL/6JmsSLC 雄マウスを清水実験材料(株)より購入した。マウスは、24 ± 2℃、明暗 12 時間周期で飼育された。飼料、水道水は自由摂食とさせた。標準飼料 (Research Diets Inc) およびコリン欠乏高脂肪飼料 (CDAHFD) (Research Diets Inc)⁸⁾ を EPS 益新(株)より購入した。かき肉エキスパウダーは、日本クリ

ニック(株)製を用いた。1 週間の馴化飼育後、3 群 (n = 8) に分けた。その後、各群に Table 1 に示した飼料を 6 週間与えた。体重および摂食量を 1 週間おきに測定した。6 週間後、ジエチルエーテル麻酔下で血液を腹部大静脈より採取した。血液をセパラビッドマイクロチューブ S (有)フチガミ器械) に 30 分間静置後、3,000 g、10 分間、遠心分離した。上清を回収した後、血清サンプルを -80℃ に保存した。また、肝臓の遺伝子発現解析用サンプルを RNAlater[®] (Sigma-Aldrich Japan K.K.) で -20℃ に保存した。肝臓の病理組織学的検査用サンプルを 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬(株)) で 4℃ に保存した。その他の肝臓は液体窒素で凍結した後、-80℃ に保存した。動物試験は「実験動物の飼養及び保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号) を遵守して行った。

生化学分析

アラニンアミノ基転移酵素 (ALT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) の活性および総コレステロール (TC)、トリグリセリド (TG) の血清濃度測定は、(株)ファルコバイオシステムズに分析を委託した。Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) の血清濃度は、MCP-1 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kit (eBioscience, Inc) で測定した。肝中脂質は Folch法¹²⁾ で抽出した後、重量を測定した。肝中トリグリセリドは LabAssayTM Triglyceride (和光純薬(株)) で測定した。肝臓の TBARS は OxiSelectTM TBARS Assay Kit, MDA Quantitation (CELL BIOLABS, INC) で測定した。

遺伝子発現解析

Total RNA は NucleoSpin[®] RNA (タカラバイオ(株)) で抽出した。cDNA は PrimeScript[™] RT reagent Kit with

Table 1 Composition of experimental diets (g/100 g diet)

| Component / Group | NC | PC | OE |
|--------------------|-------|---------|-------|
| | | g/100 g | |
| CDAHFD | 49.17 | 67.56 | 64.21 |
| Corn Starch | 48.30 | — | — |
| Lard | 1.92 | 32.39 | 30.79 |
| Oyster Extract | — | — | 5.0 |
| Choline Bitartrate | 0.192 | 0.03 * | — |
| L-Methionine | 0.414 | 0.09 * | — |
| kcal | 378 | 519 | 510 |

Negative control group (NC), Positive control group (PC), Oyster extract group (OE)

*Contained in 5 g oyster extract.

Table 2 Primers used for RT-qPCR

| mRNA | Forward primer | Reverse primer |
|---------------|--------------------------------------|---|
| <i>Tnf</i> | 5'-ctg tag ccc acg tcg tag c-3' | 5'-ttg aga tcc atg ccg ttg-3' |
| <i>Tgfb1</i> | 5'-tgg agc aac atg tgg aac tc-3' | 5'-gtc agc agc cgg tta cca-3' |
| <i>Smad3</i> | 5'-tcc gta tga gct tcg tca aa-3' | 5'-ggg gct gct cac ttg ctg tc-3' |
| <i>Smad7</i> | 5'-ccc aat gga tttt ctc aaa cc-3' | 5'-ggg cca gat aat tcg ttc c-3' |
| <i>Acta2</i> | 5'-gga gaa gcc cag cca gtc-3' | 5'-agc atc atc acc agc gaa g-3' |
| <i>Col1a1</i> | 5'-cat gtt cag ctt tgt gga cct-3' | 5'-gca gct gac ttc agg gat gt-3' |
| <i>Col3a1</i> | 5'-tcc cct gga atc tgt gaa tc-3' | 5'-tga gtc gaa ttg ggg aga at-3' |
| <i>Col4a1</i> | 5'-tta aag gac tcc agg gac cac-3' | 5'-ccc act gag cct gtc aca c-3' |
| <i>Ctgf</i> | 5'-tga cct gga gga aaa cat taa ga-3' | 5'-agc cct gta tgt ctt cac act g-3' |
| <i>Timp1</i> | 5'-gca aag agc ttt ctc aaa gac c-3' | 5'-agg gat aga taa aca ggg aaa cac t-3' |
| <i>Gapdh</i> | 5'-agc ttg tca tca acg gga ag-3' | 5'-ttt gat gtt agt ggg gtc tcg-3' |

gDNA Eraser (タカラバイオ株) を用いて合成した。遺伝子発現解析は LightCycler[®] Nano system (Roche, Inc) および FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Inc) を用いて逆転写定量的 PCR (RT-qPCR) で行った。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (*Gapdh*) を内部標準遺伝子とした。各遺伝子プライマー (Table 2) は Universal ProbeLibrary center (Roche, Inc) で設計した。各遺伝子発現量は相対検量線法で計算した。

病理組織学的評価

肝臓の病理組織学的検査は(株)ケー・エー・シーに解析を委託した。常法によりパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を行った。また、各群の代表例 (2 個体) について凍結切片を作成した後、Oil red O 染色を行った。肝臓への脂肪蓄積は 5 段階で評価した。また、炎症に関しては、炎症性細胞の浸潤を 3 段階で評価した。

統計学的分析

データは、平均 ± 標準偏差で示した。統計解析は、Tukey-Kramer 法を用いて、3 群間で比較した (危険率 < 0.05)。統計解析には StatView-J 5.0 (HULINKS, Inc) を用いた。

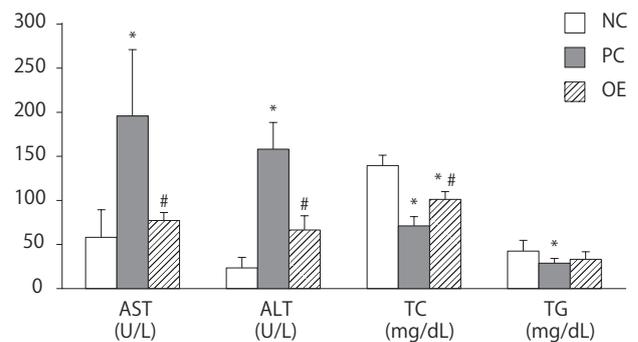
結果

Table 3 に体重、肝臓重量および摂食量の結果を示した。体重は CDAHFD を与えた陽性対照群で減少した。メチオニン・コリン欠乏食を与えた場合のように飼育開始時の体重を下回ることにはなかった。かき肉エキス食群の体重は、陰性対照群とほとんど変わらなかった。次に、体重あたりの肝臓重量は、陰性対照群に比べ、陽性対照群で有意に増加した。かき肉エキス食群の体重は陰性対照群のそれと変わらなかった。一日当たりの摂食量および摂取カロリーが陽性対照群で減少したが、かき肉エキス食群ではやや回復

Table 3 Physiological characteristics of each group

| | Groups | | |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | NC | PC | OE |
| Body weight (g) | | | |
| Initial | 21.6 ± 1.0 | 21.7 ± 1.0 | 21.5 ± 0.8 |
| Final | 26.7 ± 1.0 ^b | 22.6 ± 1.2 ^a | 27.5 ± 2.2 ^b |
| Liver/body weight (%) | 3.32 ± 0.16 ^a | 4.88 ± 0.38 ^b | 3.51 ± 0.24 ^a |
| Food intake (g/day) | 3.42 ± 0.28 ^b | 1.95 ± 0.15 ^a | 2.24 ± 0.20 ^a |
| (kcal/day) | 12.9 ± 1.1 ^c | 9.4 ± 0.8 ^a | 11.4 ± 1.0 ^b |

Data are shown as mean ± SD values. (n = 8) Means not sharing a common superscript differ significantly. (P < 0.05)

**Fig. 2** Serum biomarker levels of each group

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, TC: total cholesterol, TG: triglycerides. Data are shown as mean ± SD values. (n = 8) * P < 0.05 vs. NC, # P < 0.05 vs. PC.

した。

Fig. 2 に血清の生化学分析の結果を示した。AST および ALT とともに陰性対照群に比べ、陽性対照群で有意に上昇した。しかし、その上昇は、かき肉エキス摂取により有意に抑制された。血清中の脂質については、陽性対照群において総コレステロールおよびトリグリセリドが有意に減少した。

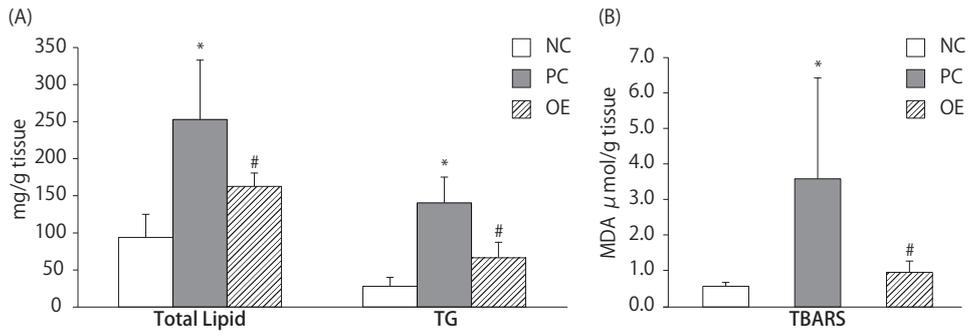


Fig. 3 Steatosis and oxidative stress in the livers of mice fed the SD, CDAHFD, or CDAHFD plus OE (A) Total Lipid, TG: triglycerides, (B) TBARS : thiobarbituric acid-reactive substances. MDA : malondialdehyde. Data are shown as mean \pm SD values. (n = 8) * P < 0.05 vs. NC, # P < 0.05 vs. PC.

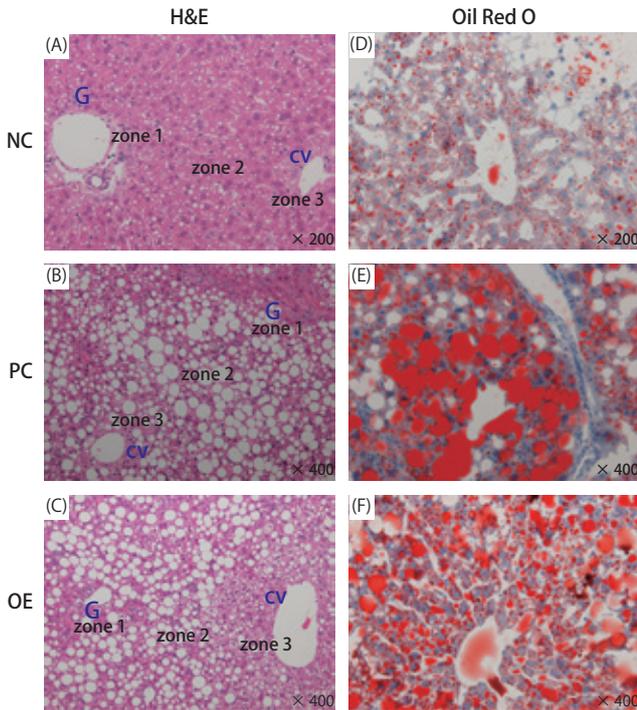


Fig. 4 Representative histopathological liver findings of each group (A), (B), (C) Hematoxylin and eosin (H&E), (D), (E), (F) Oil Red O. The lens magnification is shown on the lower right of the photo. G : Glisson's capsule cv : central vein Zone 1: lobule, peripheral zone Zone 2: lobule, intermediate zone Zone 3: lobule, central zone

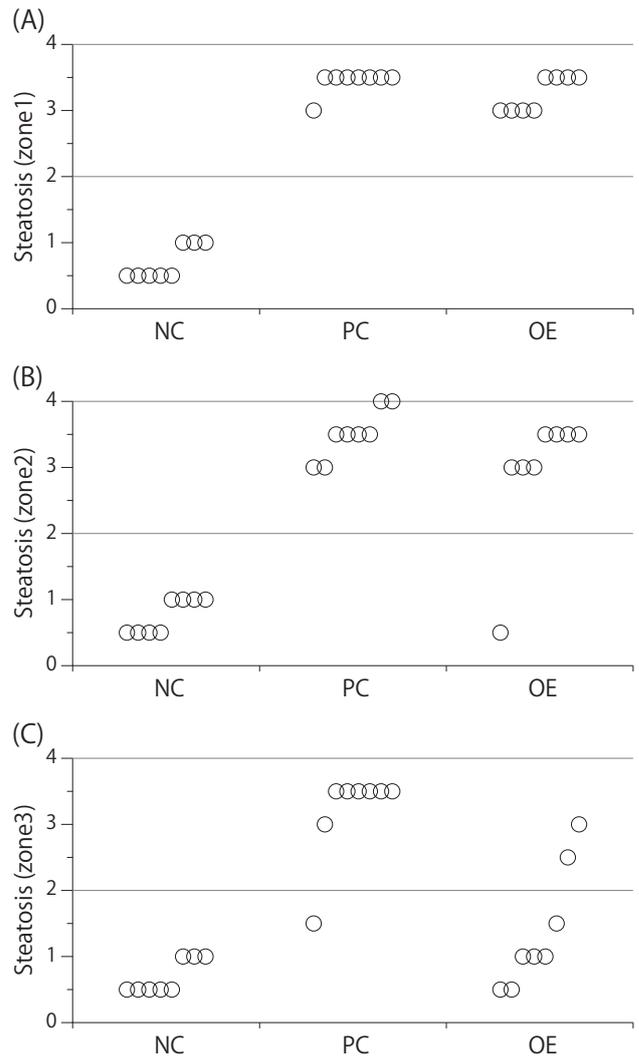


Fig. 5 Histopathological evaluation of steatohepatitis in each group (A) Zone 1: lobule, peripheral zone, (B) Zone 2: lobule, intermediate zone, (C) Zone 3: lobule, central zone. The histopathological scores were based on the criteria outlined in the Materials and Methods section. (n = 8)

に直接的に関係しているコラーゲンの遺伝子発現は劇的に抑制された。

考 察

本研究で用いた CDAHFD を与えた陽性対照群は、メチオニン・コリン欠乏食とは異なり、飼育開始時の体重を下回ることはなかった。これはメチオニンを欠乏させるのではなく、減量に留めたためだと考えられる⁸⁾。NASH 患者は過体重になることが多い。その点において、CDAHFD 誘導型 NADLD/NASH モデル動物は、メチオニン・コリン欠乏食より NASH 様態に近いと考えられる。また、CDAHFD 給餌により NASH で観察される肝臓の脂肪蓄積、炎症および酸化ストレスが誘導された。そして、それらに続いて起こる肝臓の線維化に関しても、遺伝子発現が誘導されていることが確認された。しかし、本研究において、我々は明確な NASH 診断基準を用いて NASH 様態を評価していない。このため、CDAHFD を与えた陽性対照群を NASH モデル動物と断言することはできない。今後は、肝細胞の風船様膨化¹³⁾ を重視した Matteoni の分類¹⁴⁾ による評価もしくは、NAFLD Activity Score (NAS)¹⁵⁾ による評価を行わなければならない。

かき肉エキスは CDAHFD 給餌による脂肪蓄積および AST、ALT 活性の上昇を有意に抑制した。そして、肝臓における酸化ストレスおよび炎症もかき肉エキス投与により有意に抑制された。特に、NASH における脂肪蓄積の特徴である大脂肪滴性脂肪変性^{16, 17)} は、かき肉エキスにより抑制された。また、炎症性細胞の浸潤¹⁷⁾ もかき肉エキス投与により抑えられた。これは、かき肉エキスがファーストヒットである脂肪蓄積を抑制したため、セカンドヒットである酸化ストレスや炎症性サイトカインの上昇を抑えた可能性が高い。本研究の NAFLD モデル動物において、かき肉エキスが直接的な酸化ストレスの抑制、抗炎症および抗線維化作用を持つかは不明である。しかし、かき肉エキスは、*in vitro* 試験において抗酸化作用があることが示されている。NASH モデル動物においても抗酸化作用を示す可能性はあると考えられる。

本研究で、かき肉エキスは肝臓への脂肪蓄積を抑制することで NAFLD に予防的に働くことが示唆された。これは、かき肉エキスに含まれる微量栄養素による効果だと推察される。たとえば、胃粘膜保護をもつ亜鉛製剤として開発された L-カルノシン亜鉛錯体（ポラプレジンク）は、メチオニン・コリン欠乏食より NASH モデル動物において、抗線維化作用を示すことが報告されている¹⁸⁾。また、タウリンは、高スクロース食もしくはツニカマイシンによる NAFLD モデル動物および *in vitro* モデルにおいて小胞体ストレスおよび脂肪蓄積を軽減することで酸化ストレス抑制および抗炎症作用を示すことが報告されている¹⁹⁾。かき肉エキスは亜鉛やタウリンの含有量が多いので、脂肪蓄積抑制効果だけでなく、NASH 発症抑制も期待できるか

もしれない。しかし、かき肉エキス食群の飼料中の（100 g あたり）亜鉛量は、10.3 mg、タウリン量は、150 mg であり、上述の報告における摂取量よりもはるかに少ない。すなわち、亜鉛およびタウリン以外にも脂肪蓄積を抑制する有効成分が含まれている可能性がある。そして、それらが相加的もしくは相乗的に作用しているのかもしれない。今後は、その他の有効成分の探索についても検討する価値があると考えられる。

本研究で用いた NAFLD モデル動物は、NASH で観察される血中遊離脂肪酸量の増加およびインスリン抵抗性を引き起こさない。つまり、本研究ではこれらに対するかき肉エキスの効果は不明である。しかし、かき肉エキスは、糖尿病モデル動物²⁰⁾ および糖尿病患者^{10, 21)} に効果的であることが報告されている。よって、かき肉エキスのインスリン抵抗性に対する影響を検討する価値はあると考えられる。

本研究においてかき肉エキスは NAFLD モデル動物の脂肪蓄積を抑制した。そして、かき肉エキスは、脂肪蓄積の抑制により酸化ストレス、炎症を抑制した。これらのデータからかき肉エキスが NAFLD などの脂肪肝の予防に有効であることが示唆された。

参考文献

- 1) Kim WR, Brown RS Jr, Terrault NA, El-Serag H. (2002) Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 36: 227-242.
- 2) Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. (2013) The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 58: 593-608.
- 3) Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. (2010) Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 28: 155-161.
- 4) Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. (2005) The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 143: 722-728.
- 5) Fujinaga H, Koike K. (2011) Nonalcoholic Steatohepatitis. *The Medical Frontline* 832: 732-741
- 6) Day CP, James OF. (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114: 842-845.
- 7) Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Maeda S, Sumida Y, Hyogo H, Eguchi Y, Wada K, Nakajima A. (2013) Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci* 14: 21833-21857
- 8) Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga

- T, Tanaka C, Ito T, Katsume A, Sudoh M. (2013) An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 94: 93-103.
- 9) 久保道徳, 松田秀秋, 田村崇子, 高津政雄. (1980) バランスター [カキ *Crassostrea gigas* (THUNBERG) の肉エキス] の実験的肝障害に対する予防および肝機能改善作用. *基礎と臨床* 14: 1437-1442
- 10) 松田芳和, 出田祐久, 藤田忠義, 太田隆男, 中塚正博, 吉野昌孝, 柴田幸雄. (1994) 糖尿病・肝臓病患者に対するかき肉エキスの影響. *微量栄養素研究* 12: 91-97
- 11) Yoshikawa T, Naito Y, Masui K, Fujii T, Boku Y, Nakagawa S, Yoshida N, Kondo M. (1997) Free radical-scavenging activity of *Crassostrea gigas* extract (JCOE). *J Biol Biomed Pharmacother* 51: 328-332.
- 12) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- 13) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. (2005) Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41: 1313-1321.
- 14) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116: 1413-1419
- 15) Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. (1999) Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94: 2467-2474
- 16) 石井公道, 苅部ひとみ, 新井重紀, 國分茂博, 山田伸夫, 柴田久雄, 岡部治弥, 奥平雅彦, 佐々木憲一. (1987) ラットにおけるコリン欠乏食脂肪肝の経過とエストロゲン剤による抑制並びに修復効果. *肝臓* 28: 884-890
- 17) Larter CZ, Yeh MM. (2008) Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 1635-1648.
- 18) Sugino H, Kumagai N, Watanabe S, Toda K, Takeuchi O, Tsunematsu S, Morinaga S, Tsuchimoto K. (2008) Polaprezinc attenuates liver fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 1909-1916.
- 19) Gentile CL, Nivala AM, Gonzales JC, Pfaffenbach KT, Wang D, Wei Y, Jiang H, Orlicky DJ, Petersen DR, Pagliassotti MJ, Maclean KN. (2011) Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: 1710-1722.
- 20) 太田隆男, 中塚正博, 坂田元記, 柴田幸雄, 田中達郎, 古武彌三, 沖中靖, 仲佐輝子, 石津弘視. (1990) カキ (*Crassostrea gigas*) 中の血小板凝集抑制物質. *微量栄養素研究* 7: 29-35
- 21) 松田芳和, 出田祐久, 藤田忠義, 村田道代, 土井悦四郎, 太田隆男, 中塚正博, 石津弘視, 坪内凉子, 柴田幸雄. (1992) 糖尿病患者における血小板凝集能と, 血中ミネラル, 核酸関連物質の変動におよぼすかき肉エキスの影響. *微量栄養素研究* 9: 67-73