

論文の内容の要旨

氏名：府川 明佳

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの肝疾患抑制効果に関する研究

緒論

肝臓は生体内最大の臓器であり、タンパクの合成、有害物質の解毒、胆汁の合成など多岐に渡る機能を有している。本国ではウイルス性肝炎から肝硬変へ進行する患者が多いが、近年、生活習慣病に伴う脂肪肝から進行する非アルコール性脂肪性肝炎も患者数が増加傾向にあり問題視されている。急性肝炎、慢性肝炎の一部は肝線維化が生じ肝硬変、肝癌へと進行して死に至ることもある。したがって肝疾患を進展させる炎症や肝線維化を制御することは肝硬変や肝癌に対する防御にもつながるため重要である。

本研究では牛乳中のタンパク質に約 4%含まれる α -ラクトアルブミンの機能性に着目して肝疾患に及ぼす影響を検討した。 α -ラクトアルブミンは未分解の状態では吸収されて生体内で生理機能を発揮すると考えられているユニークなタンパク質であり、抗炎症作用を持つことが報告されている。これより、肝疾患に対しても機能性を発揮する可能性があると考え、 α -ラクトアルブミンの急性肝炎、慢性肝炎、肝線維化、腸肝軸の関係性に及ぼす影響について検討した。

第 1 章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの急性肝炎に対する影響

α -ラクトアルブミンは実験動物を用いた病態モデルとして、カラゲニン足浮腫モデル、アジュバン関節炎モデル、小腸虚血再灌流モデルにおいて抗炎症作用を示すことが報告されている。しかし、肝障害に対する抑制作用についての報告はこれまでにない。また、肝障害においてマクロファージは、免疫エフェクターとしてサイトカインを産生することにより、組織の恒常性の維持、適応免疫反応の形成、炎症反応などにおいて重要な役割を果たしている。したがって、マクロファージにおける α -ラクトアルブミンの評価は、動物における肝炎抑制効果のメカニズムを解析する上で意義があると考えられる。

本章では α -ラクトアルブミンが D-ガラクトサミン (GalN) およびリポ多糖 (LPS) をラット腹腔内に投与することにより惹起した急性肝炎に与える影響について検討した。 α -ラクトアルブミン含有飼料は対照飼料 (AIN-93M) に比較して、GalN/LPS 投与後の血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、肝インターロイキン (IL) -6、腫瘍壊死因子 (TNF) - α の上昇を有意に抑制した。この結果より、 α -ラクトアルブミン含有飼料摂取群は炎症を抑制することによって GalN/LPS 惹起急性肝炎を抑制することが示唆された。さらに α -ラクトアルブミンの抗炎症作用メカニズムについて検討するために、 α -ラクトアルブミン処理がマウスマクロファージ細胞である RAW 264.7 に及ぼす影響を網羅的遺伝子解析により検討した。まず α -ラクトアルブミンは LPS による TNF- α 、IL-6 産生量増加を有意に低減することを確認した。次に DNA マイクロアレイを実施した結果、 α -ラクトアルブミン処置群と対照群を比較すると、合計 84 個の遺伝子に発現差が見られた。LPS に対する炎症反応の低減に関与すると報告のある *Abca1* および *Atp6v0d2*、M2 マクロファージへの極性を亢進すると報告されている *Egr2* の発現が α -ラクトアルブミンにより増加していた。また Gene ontology (GO) 解析の結果、GO terms として“LPS に対する応答”、“白血球分化の調節”が検出された。以上より、 α -ラクトアルブミン混餌投与が GalN/LPS 誘発肝炎を抑制するメカニズムとして、肝臓マクロファージの LPS に対する応答性やマクロファージの分化能の変化が関

与する可能性が示唆された。

第2章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの慢性肝炎および肝線維化に対する影響

慢性肝炎によってみられる肝線維化は進行すると肝硬変、最終的には肝細胞癌へと移行する。肝線維化の進行に伴い細胞外マトリックスタンパク質の蓄積が認められ、肝細胞壊死、炎症が生じることがわかっている。また、肝細胞と類同内皮細胞の間隙に存在する肝臓構成細胞の一つである肝星細胞が活性化されるとコラーゲン沈着や線維化の進展が引き起こされるとともに類洞内皮細胞の収縮により肝臓中の血流が阻害される。一方で血管弛緩性物質である一酸化窒素 (NO) の産生を誘導することは、肝星細胞活性化の抑制、肝線維化の抑制につながると報告されている。 α -ラクトアルブミンは小腸虚血再灌流したラットにおいて NO 産生誘導により炎症性サイトカインの分泌を抑制したことが示されていることから、NO 産生誘導機構により肝線維化を抑制する可能性があると考えられる。

本章ではジメチルニトロソアミン (DMN) の投与により惹起した慢性肝炎および肝線維化に対して、 α -ラクトアルブミンが与える影響について検討した。ラットに DMN 投与 1 週間前から試験飼料を給餌し、DMN を週 3 日連続で 3 週間腹腔内に反復投与した。DMN 投与開始 28 日後における相対肝臓重量、相対脾臓重量、血漿中 ALT、AST、総ビリルビン、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) -2 の濃度を測定した。これらの値は肝炎、肝線維化に伴って増加することが知られている。その結果、 α -ラクトアルブミン含有飼料摂取群は対照群に比較して相対肝臓重量の低下を抑制し、相対脾臓重量の増加を低減した。また、血漿 ALT、AST、総ビリルビン、MMP-2 の上昇を抑制した。さらに肝組織像において α -ラクトアルブミンの摂取により肝線維化のグレードが有意に低減した。これらの結果から α -ラクトアルブミン摂取により慢性肝炎および肝線維化が抑制されることが示唆された。また、NO 合成阻害剤である N-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME) の飲水摂取により α -ラクトアルブミンの ALT、AST 上昇抑制作用、脾臓重量増加抑制作用が有意に減弱した。これらの結果により、 α -ラクトアルブミンは NO 産生を介して炎症を抑制し肝血流を改善することによって、慢性肝炎および肝線維化を抑制することが示唆された。

第3章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの腸肝軸を介した機能不全に対する影響

小腸と肝臓が連携して生体防御に関わる密接な関係を腸肝軸: gut-liver axis と呼ぶ。腸管バリアが障害を受け、透過性が増加すると、肝臓は小腸由来の炎症性物質、毒性因子や菌体に曝され、肝炎ひいては肝硬変の病態を引き起こす危険性があることが知られている。一方で肝疾患が進行すると TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインが産生され、これらの炎症性サイトカインは小腸透過性を亢進する。すなわち、小腸透過性が亢進しエンドトキシン血症が発症すると肝硬変が悪化し、炎症状態が亢進するとさらに小腸透過性が亢進するという悪循環が発生する。したがってこの悪循環を断ち切ることが腸管バリアの維持および肝疾患発症・進展の防止につながる。

本章では α -ラクトアルブミンがチオアセトアミド (TAA) の投与により惹起した腸肝軸機能不全に与える影響について検討した。TAA 投与によって肝硬変が生じると小腸バリア破壊が起こり、それによりバクテリアトランスロケーションが起こることが報告されている。TAA による肝炎誘導により産生された炎症性サイトカインが間接的に作用することによって腸管のタイトジャンクションのバリア機能が低下すると考えられている。ラットに TAA 投与 1 週間前から試験飼料を給餌し、TAA を週あたり 2 回、14 週間腹腔内に投与した。 α -ラクトアルブミン含有飼料は、TAA 投与による血漿中 ALT、AST、ヒアルロン酸の上昇を有意に抑制した。また、 α -ラクトアルブミン含有飼料群では対照群に比較して TAA 投与後の血漿中 LPS の値が有意に低く、腸管上皮細胞のタイトジャンクションを構成する膜貫通型タンパク質である Occludin の mRNA レベルが有意に高かった。組織像において TAA 投与により肝臓では線維化組織の増加および好中球の浸潤、小腸上皮組織では絨毛径の短縮化が認められ、腸管上皮層のバリア構造の損傷がみられたが、 α -ラクトアルブミン摂取によりこれら組織像の変化が抑制された。これらの結果より、 α -ラクトアルブミンは肝炎、肝線維化を抑制することにより、腸管バリア機能を維持することを示した。また α -ラクトアルブミンは腸管バリア機能の維持により血中エ

ンドトキシンレベルを低く保ち、肝臓の炎症抑制に寄与する可能性が示唆された。本結果より α -ラクトアルブミンが腸肝軸機能不全を改善することを明らかにした。

総括

本研究では、乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの肝障害抑制作用について検討した。

第1章では、 α -ラクトアルブミンが炎症性サイトカイン産生を抑制し、急性肝炎抑制作用を示すことをはじめて明らかにした。また、作用機序のひとつとして α -ラクトアルブミンは LPS への応答性およびマクロファージの分化能に関連する遺伝子発現に影響を及ぼすことによって肝炎抑制作用に関わる可能性が示唆された。

第2章では、 α -ラクトアルブミンが慢性肝炎および肝線維化を抑制することを明らかにした。この機序としては NO 産生を介した炎症抑制および肝血流改善が関連する可能性が示唆された。

第3章では、 α -ラクトアルブミンの投与は肝炎、肝線維化を抑制することにより、腸管バリア機能を維持することを示した。また α -ラクトアルブミンは腸管バリア機能の維持により血中エンドトキシンレベルを低く保ち、肝臓の炎症抑制に寄与する可能性が示唆された。本結果より α -ラクトアルブミンが腸肝軸機能不全を改善することをはじめて明らかにした。

本研究により、乳タンパク質 α -ラクトアルブミンを用いることにより急性肝炎、慢性肝炎、肝線維化、腸肝軸不全の発症・悪化を抑制することができることをはじめて示した。本研究は、 α -ラクトアルブミンの各ステージにおける肝疾患予防のための機能性食品開発における有益な知見を提供するものである。