

食餌性肥満モデルマウスにおける肝臓脂質蓄積および軽度炎症に及ぼす

ロイシンとバリンの効果

Effect of leucine and valine supplementation on liver lipid accumulation and proinflammation in diet-induced obese mice

工藤 陽香¹, 山中 千恵美¹, 青江 誠一郎²¹大妻女子大学大学院 人間文化研究科, ²大妻女子大学 家政学部Haruka Kudo¹, Chiemi Yamanaka¹, and Seiichiro Aoe²¹Graduate School of Studies in Human Culture, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

²Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

キーワード：分岐鎖アミノ酸，肝臓脂質，酵素活性

Key words : Branched-chain amino acids, Liver lipid accumulation, Enzyme activity

抄録

近年、肥満の増加に伴い、併発する頻度の高い非アルコール性脂肪肝(NAFLD)が着目されている。日本での NAFLD 有病率は約 30%と報告されており、今後さらに増加していくと予測されている。分岐鎖アミノ酸(BCAA)は以前より骨格筋合成促進作用があるとされサプリメント等で使用されてきたが、近年脂肪蓄積抑制作用があると報告されている。そこで、食餌性肥満モデルマウスにおける BCAA の肝臓脂質蓄積への影響について検討を行った。飼料は AIN-93G 組成を基本とし、20%カゼインをコントロール(CO 群)、BCAA(12%ロイシン、5%バリン)を強化した群(LV 群)とした。また、脂肪エネルギー比が 50%となるようラードを添加し、5 週齢雄の C57BL/6J マウスに 12 週間給餌した。その結果、肝臓トリグリセリド蓄積量がコントロールと比較して有意に低下した。肝臓の mRNA 発現を測定したところ、脂質合成系の転写調節因子であるステロール調節エレメント結合たんぱく質-1c(SREBP-1c)および脂肪酸合成酵素(FAS)、および脂質分解系の転写調節因子であるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 α (PPAR α)およびその下流のアシル CoA 酸化酵素(ACOX)、並びに炎症マーカーの発現に有意な差は見られなかった。しかし、酵素活性を測定した場合、CO 群と比べて LV 群で FAS 活性について有意差は見られなかったが、ACOX ではコントロールと比較して BCAA 添加で有意に高値を示した。以上の結果より、ロイシンとバリンの添加により ACOX を活性化させ β 酸化の活性を高めることで肝臓脂肪蓄積を抑制する可能性が示された。

1. 序論

2008 年 4 月より、メタボリックシンドロームに着目した特定健診・特定保健指導が実施され、それに伴い、メタボリックシンドロームにおいて併発する頻度の高い非アルコール性脂肪肝(NAFLD)が着目され始めた。日本での NAFLD 患者数は約 1000 万人とされており、今後さらに増加していくと予測されている。肝細胞にトリグリセリドが蓄積し、そこに酸化ストレスなどが曝露すると炎症を起こし、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)となり、

進行すると不可逆性の肝硬変、肝細胞ガンへと発展する。つまり、肝臓の脂質蓄積、炎症を抑制することが NASH 抑制に対して有効である。

分岐鎖アミノ酸(BCAA)とは、必須アミノ酸であるバリン、ロイシン、イソロイシンを指す。BCAA は以前より骨格筋合成促進効果が知られ^[1]、今日では BCAA サプリメントとしても販売されているが、近年では肥満マウスにおける体重減少や脂質代謝にも影響を及ぼすことが報告されている^{[2][3][4]}。Zhang ら^[2]は、マウスに高脂肪食とロイシ

ンを同時投与すると、食餌誘発性肥満、高血糖、血清コレステロール濃度の上昇を抑制したと報告しており、これは、骨格筋中脱共役たんぱく質(UCP)の発現増加による安静時エネルギー消費量の増加に伴う体脂肪量の減少が関係していると推察している。また、Nairiziら^[3]は、ロイシンを含有させた水を摂取させることにより、高脂肪食による体重増加を抑制すると報告している。さらに、Macotelaら^[4]は、高脂肪食におけるロイシン添加は、脂肪酸合成酵素(FAS)やアセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)の発現を抑制することにより、肝臓脂質の蓄積を抑制したことを報告している。イソロイシンにおいては耐糖能を改善する作用が多く報告されている。そのメカニズムとして、骨格筋においてインスリンが関与していない状態においてもPI-3キナーゼを刺激し、グルコーストランスporter-4(GLUT4)を細胞膜へ移行させ、インスリン非依存的なグルコースの取り込みを促進することが提唱されている。近年では、イソロイシンは筋肉および肝臓においてペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 α (PPAR α)およびUCPの発現を増加させることで脂質蓄積を抑制するという報告もある^[5]。バリンについては、脂質蓄積抑制およびNAFLDに伴う慢性炎症への影響に関する報告は少ない。

NAFLDになり肝臓にトリグリセリドが蓄積すると、活性酸素による酸化ストレスによって炎症マーカーの発現が促進され、炎症が惹起されることが知られている。BCAAと炎症については、BCAAは四塩化炭素によって肝硬変を誘導したラットにおいて、抗酸化作用を有するタンパク質の発現増加および活性酸素の減少により、酸化ストレスを軽減させ寿命も延長させたという報告がある^[6]。また、脂質が蓄積されることで活性酸素が発生し、酸化ストレスが増大することで炎症マーカーが増加し、軽度炎症が誘導される。

著者はこれまでの研究により、アミノ酸混合物を摂取させたラットの門脈中にバリンとロイシンがコントロール飼料摂取群と比べて多く検出されたことを確認している(未発表データ)。そこで本研究では、バリン、およびロイシンの添加が食餌性肥満モデルマウスの肝臓脂質蓄積および、軽度炎症に及ぼす効果について検討した。

2. 方法

2.1 実験動物

5週齢雄のC57BL/6Jマウス(日本チャールス・リバー株式会社)を20匹用いた。固形飼料(NMF;オリエンタル酵母工業株式会社)を用い、1週間の予備飼育後、体重が均一になるように1群10匹ずつ2群(CO群, LV群)に群分けし、12週間飼育した。飼育期間中、飼料と水は自由摂取とした。マウスは、室温22±1℃、湿度50±5℃、12時間明暗サイクル(昼7:00~19:00)で飼育した。

2.2 実験飼料

飼料組成をTable 1に示す。

コントロール(CO)群の飼料はAIN-93G組成を基本とし、脂質エネルギー比が50%となるよう、ラードを添加し高脂肪食とした。コントロール群(CO群)のたんぱく質源はカゼイン20%とし、ロイシンおよびバリン群(LV群)は12%ロイシンおよび5%バリンを添加しカゼインと置換した。各群のたんぱく質、脂質量が等しくなるように、たんぱく質はカゼイン、脂質量は大豆油、ラードで調整した。大豆油、重酒石酸コリン、*t*-ブチルヒドロキノン、L-ロイシン、L-バリンは和光純薬工業株式会社、ラードは植田製油株式会社より購入した。

Table 1. 飼料組成(g/kg)

	CO群	LV群
カゼイン	200.0	187.9
ロイシン	-	12.08
バリン	-	5.05
L-シスチン	3.0	3.0
コーンスターチ	55.5	50.4
α コーンスターチ	26.4	26.4
ショ糖	100	100
大豆油	70	70
ラード	200.0	200.0
セルロース	50.0	50.0
AIN-93G特殊ミネラル混合*	35	35
CaCO ₃	10.0	10.00
AIN-93Gビタミン混合	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5
<i>t</i> -ブチルヒドロキノン	0.014	0.014
飼料中ロイシン	16.8	27.8
バリン	12.0	16.7

*CaCO₃を含まない

CO:コントロール, LV:ロイシン+バリン

2.3 動物解剖とサンプル採取

解剖当日、イソフルラン/CO₂ガス深麻酔下で開腹し、心臓より採血した後、肝臓、後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織および腸間膜脂肪組織を摘出し、重量を測定した。血液は38×100g、4℃で15分間遠心分離し、血清を-80℃で保存した。肝臓は-20℃で保存した。本実験は大妻女子大学家政学部動物実験において定められた「実験動物施設の整備および管理の方法ならびに具体的な実験方法を定めた規則」に則り、倫理審査委員会の承認を得て行った。

2.4 分析方法

(1)血清生化学値

血清は、トリグリセリド、遊離脂肪酸、総コレステロール濃度は酵素法にて分析した。トリグリセリドの定量には「トリグリセライドE-ワコー」、遊離脂肪酸(NEFA)の定量には「NEFA C-テストワコー」、総コレステロール濃度の定量には「コレステロールE-ワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社)を使用した。血清インスリン濃度は、「レビスインスリン-ラット(Hタイプ)」(株式会社シバヤギ)を用い、ELISA法にて分析した。

血中グルコース濃度測定は、6時間の絶食後、無麻酔下で尾静脈から採血し、「小型血糖測定器グルテストエースR」(株式会社三和科学研究所)を用い電極法にて測定した。

(2)肝臓脂質およびmRNA発現

肝臓脂質の分析は、肝臓を凍結乾燥後、粉碎し、クロロホルム:メタノール(2:1)溶液を用いたFolch法により抽出、水洗、乾固後、ドラフト内で窒素気流下によって溶媒を除去(60℃)し、10%TritonX-100を含むイソプロパノールを加えて溶解し、トリグリセリド、総コレステロール濃度を酵素法にて分析した。トリグリセリドの定量および総コレステロールの定量は、前出の血清生化学値法と同じである。

肝臓のmRNA発現量の測定は、RNeasy Mini kit(株式会社Qiagen)を用いて総RNA量をプロトコールに準じて抽出し、総RNA量を260nmの吸光度から求めた。抽出したRNAを用いて逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行い、mRNA発現量の測定に用いた。mRNAの発現量は7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて、SYBR Green法にて行い、内部標準として用いた36B4と

の相対比により求めた。測定項目とプライマー配列をTable 2に示す。

Table 2. プライマー配列

	Forward	Reverse
SREBP-1c	5'-GGCACTAAGTGCCCTCAACCT-3'	5'-GCCACATAGATCTCTGCCAGTGT-3'
FAS	5'-CCTGGATAGCATCCGAACCT-3'	5'-AGCACATCTCGAAGGCTACACA-3'
PPAR α	5'-AGGAAGCCGTTCTGTGACAT-3'	5'-AATCCCTCCTGCAACTTCT-3'
ACOX	5'-CAGCGTTACGAGGTGGCTGTTA-3'	5'-TGCCCAAGTGAAGGTCAAAAG-3'
mtGPAT	5'-ACAGTTGGCACAATAGACGTTT-3'	5'-CCTTCCATTTCAAGTTGTCAGA-3'
TNF- α	5'-ACCCTCACACTCAGATCATCTTC-3'	5'-TGGTGGTTTGCTACGACGT-3'
p40 ^{phox}	5'-CAGCCAACATCGCTGACATC-3'	5'-CAAAGTGGCTGGTGAAGCCT-3'
p47 ^{phox}	5'-ACTCTCACTGAATACTTCAACG-3'	5'-TCATCAGGCCGCACTTT-3'
p67 ^{phox}	5'-AAGCAAAAAGAGCCCAAGGAA-3'	5'-CATGTAAGGCATAGGCACGCT-3'
36B4	5'-GGCCCTGCACTCTCGCTTTC-3'	5'-TGCCAGGACGCGCTGTG-3'

(3)肝臓の脂肪合成系酵素(FAS)・分解系酵素(ACOX)の比活性の測定

肝臓約0.5gに0.25M Sucrose, 1mM EDTA, 3mM トリス塩酸(pH7.2)を加えホモジナイズ後、5×100gで10分間、4℃で遠心分離した。上清(ACOXの測定で使用)を採取し、さらに7,500×gで10分間、4℃で遠心分離することにより、ミトコンドリア画分を沈殿させ、上清(FASの測定で使用)を採取した。セル内のたんぱく質濃度は、プロテインアッセイキットII(日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社)を用いてBradford法により測定した。

脂肪酸合成酵素(FAS)の比活性測定は、サイトソル画分を用いてKellyら^[7]の方法で測定を行った。アシルCoAオキシダーゼ(ACOX)の比活性測定は総ホモジネートを用いてHashimotoら^[8]の方法で測定を行った。

2.5 統計解析

すべての測定結果は平均値±標準偏差で示した。Shapiro-Wilkの正規性の確認とBartlettの等分散検定を行い、等分散性が確認できた場合はt検定を行った。不等分散の場合の多重比較は、Wilcoxonの検定を用いた。統計解析はJMP Pro 12 (SAS Institute社)を用いた。有意水準は両側5%未満とした。

3. 結果

終体重、体重増加量、飼料摂取量、飼料効率、肝臓重量および各脂肪組織重量において、CO群とLV群の間に有意差は見られなかった(Table 3)。

Table 3. 成長結果および臓器重量

	CO群	LV群
終体重(g)	41.0±4.0	37.8±4.0
体重増加量(g/day)	0.26±0.05	0.22±0.05
飼料摂取量(g/day)	2.2±0.2	2.4±0.2
飼料効率(%)	11.7±1.5	9.9±1.7
肝臓重量(g)	1.2±0.2	1.1±0.2
後腹壁脂肪組織重量(g)	1.1±0.4	0.9±0.2
副睾丸周辺脂肪組織重量(g)	2.5±0.5	2.2±0.5
腸間膜脂肪組織重量(g)	0.8±0.4	0.6±0.2

数値は平均値±SDで表した。

CO; コントロール, LV; ロイシン+バリン

血清トリグリセリド濃度, 血清総コレステロール濃度, 血清遊離脂肪酸濃度, インスリン濃度についてCO群とLV群の間に有意差は見られなかった(Table 4).

Table 4. 血清生化学値およびインスリン濃度, 血糖値

	CO群	LV群
トリグリセリド(mg/dl)	82.2±16.1	87.9±18.7
総コレステロール(mg/dl)	155.1±37.5	146.6±42.3
遊離脂肪酸(mEq/l)	0.47±0.10	0.51±0.09
インスリン(ng/ml)	36.8±12.1	43.2±10.6
グルコース(mg/dl)	177.1±27.3	179.6±26.6

数値は平均値±SDで表した。

CO; コントロール, LV; ロイシン+バリン

肝臓トリグリセリド蓄積量はCO群と比べてLV群で有意に低下したが, 総コレステロール蓄積量に有意差は見られなかった(Table 5).

Table 5. 肝臓脂質蓄積量(mg)

	CO群	LV群
トリグリセリド(肝臓1g当たり)	58.3±21.0	39.6±7.9*
トリグリセリド(肝臓全体)	67.8±27.9	44.0±12.3*
コレステロール(肝臓1g当たり)	6.3±1.5	6.8±1.7
コレステロール(肝臓全体)	7.2±1.5	7.5±2.8

数値は平均値±SDで表した。

*CO群と比べて有意差あり(p<0.05)

CO; コントロール, LV; ロイシン+バリン

肝臓の mRNA 発現は, 炎症マーカーである腫瘍壊死因子- α (TNF- α), および NADPH オキシダーゼのサブユニットである p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, 脂質代謝関連酵素の転写因子であるステロール調節エレメント結合たんぱく質 1c (SREBP-1c), ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 α (PPAR α), 脂質代謝関連酵素である FAS, アシル CoA オキシダーゼ(ACOX), ミトコンドリアグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ(mtGPAD)においてCO群とLV群の間に有意差は見られなかった(Table 6).

Table 6. 肝臓 mRNA 発現量 の相対比較

Arbitrary unit (each mRNA/36B4)	CO群	LV群
SREBP-1c	1.00±0.22	0.78±0.34
FAS	1.00±0.12	0.75±0.28
PPAR α	1.00±0.20	0.76±0.08
ACOX	1.0±0.34	0.79±0.33
mtGPAD	1.00±0.13	0.88±0.23
TNF- α	1.00±0.56	0.89±0.45
p40 ^{phox}	1.00±0.54	0.91±0.28
p47 ^{phox}	1.00±0.15	0.82±0.69
p67 ^{phox}	1.00±0.15	1.06±0.25

数値は平均値±SDで表した。

CO; コントロール, LV; ロイシン+バリン

TNF- α : 腫瘍壊死因子- α

SREBP-1c: ステロール調節エレメント結合たんぱく質-1c

PPAR α : ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 α

FAS: 脂肪酸合成酵素

ACOX: アシルCoAオキシダーゼ(ACOX)

mtGPAD: ミトコンドリアグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ

肝臓の酵素活性は, FAS で有意差は見られなかったが, ACOX はCO群と比べてLV群で有意に高値を示した(Table 7).

Table 7. 肝臓 FAS, ACOX の比活性(n mol/min/mg protein)

	CO群	LV群
FAS	16.61±2.35	16.96±1.51
ACOX	2.26±0.77	3.60±0.86*

数値は平均値±SDで表した。

*CO群と比べて有意差あり(p<0.05)

CO; コントロール, LV; ロイシン+バリン

4. 考察

本研究は, 食餌性肥満モデルマウスにおけるBCAAの肝臓脂質蓄積および軽度炎症に及ぼす効果について検討を行うことを目的とした。

肝臓重量に有意差はなかったが, 肝臓トリグリセリド蓄積量はLV群で有意に蓄積が抑制された。最終体重および各脂肪組織重量に有意差は見られなかったことから, ロイシンおよびバリンは肝臓にのみ脂質の蓄積抑制作用を示す可能性がある。Nairizi ら^[2]は, BCAA やロイシンを含有させた水を摂取させることにより, 高脂肪食による体重増加を抑制すると報告している。本研究は飲料中ではなく飼料中に添加したため, Nairizi らとは異なる結果になったと考えられる。

さらに, 脂肪酸合成酵素であるFASおよび分解酵素であるACOXの酵素活性を測定すると, FASにおいて有意差は見られなかったが, ACOXではLV群がCO群に比べ有意に高値であった。ACOXはPPAR α によって調節され, アシルCoAを不飽和化するペルオキシソーム酵素である^[9]。一方,

肝臓 mRNA 発現量を測定した結果、脂質合成に関する SREBP-1c および FAS, β 酸化に関わる PPAR α および ACOX に有意差は見られなかった。また、ミトコンドリアでの β 酸化に関わる mtGPAD の発現も有意差は見られなかった。Arakawa ら^[10]は、高脂肪食を与えたマウスにおいて BCAA を飲料水に混ぜ、その影響を検討したところ、肝臓および筋肉において PPAR α および ACOX1 の発現が有意に増加したという報告をしており、我々の研究の結果と一致しない。しかしながら、mRNA と酵素活性の両方を測定した報告は少ない。また、絶食時間により脂肪酸合成酵素の mRNA 発現と酵素活性が一致しない場合もある。

また、炎症マーカーである TNF- α , NADPH オキシダーゼのサブユニットの mRNA 発現量に有意差は認められなかった。NAFLD は肝臓にトリグリセリドが蓄積し、活性酸素の発生などが要因となり TNF- α や IL-6 といった炎症性サイトカインが放出されることで炎症が惹起される^[11]。しかし、本研究では TNF- α 発現量に有意差は見られず、活性酸素を産生する NADPH オキシダーゼのサブユニット発現量にも変化が見られなかった。

BCAA について、Iwasa ら^[6]は、四塩化炭素によって肝硬変を誘導したラットにおいて、抗酸化作用を有するたんぱく質の発現増加および活性酸素の減少により、酸化ストレスを軽減させたと報告した。しかし、本研究では NADPH オキシダーゼのサブユニット発現量に変化はなかったことから活性酸素の産生量には影響しないと考えられたため、Iwasa らの報告と一致しない。そのため、ロイシンとバリンの強化によってトリグリセリドの蓄積は抑制できたが、BCAA では炎症の抑制には影響しなかったことが考えられた。

以上の結果から、ロイシンおよびバリンは抗炎症作用について効果は認められなかったが、ACOX の酵素活性を高めることでペルオキシソームでの β 酸化を活性化させ、肝臓脂質の蓄積を抑制する可能性が示された。

今後は、バリンおよびロイシンの有効投与量や、単独投与でも酵素活性を高め脂質蓄積抑制作用を有するのか、また酵素量について影響は見られるのかを検討する予定である。

引用文献

- [1]Hong, S.O. et al. Effects of leucine on in vitro protein synthesis and degradation in rat skeletal muscle. *J. Nutr.* 1984, 114, p.1204-1212.
- [2]Zhang, Y. et al. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multiple mechanisms. *Diabetes.* 2007, 56(6), p.1647-1654.
- [3]Nairizi, A. et al. Leucine supplementation of drinking water does not alter susceptibility to diet-induced obesity in mice. *J.Nutr.* 2009, 139(4), p.715-719.
- [4]Macotela, Y. et al. Dietary leucine-an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLoS ONE.* 2011, 6(6), e21187.
- [5] Nishimura, J. et al. Isoleucine prevents the accumulation of tissue triglycerides and upregulates the expression of PPARalpha and uncoupling protein in diet-induced obese mice. 2010. *J Nutr.* 140(3), p.496-500.
- [6]Iwasa, M. et al. Branched-chain amino acid supplementation reduces oxidative stress and prolongs survival in rats with advanced liver cirrhosis. *PLOS ONE.* 2013, 8(7), e70309.
- [7]Kelley, D. S. et al. Biochemical effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.* 1986, 235, p.87-90.
- [8]Hashimoto, T. et al. alpha-Amanitin inhibits the oxidation of long chain fatty acids in mouse liver. *Biochem. J.* 1981, 90, p.415-421.
- [9]Lemieux, I. et al. 16-week fenofibrate treatment increases LDL particle size in type IIA dyslipidemic patients. *Atherosclerosis.* 2002, 162, p.363-371.
- [10]Arakawa, M. et al. The effects of branched-chain amino acid granules on the accumulation of tissue triglycerides and uncoupling proteins in diet-induced obese mice. *Endocrine J.* 2011, 58 (3), p.161-170.
- [11]Furukawa, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2004, 114(12), p.1752-1756.

Abstract

Recent interest was forced on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) related to the metabolic syndrome. The prevalence of NAFLD in Japan is increasing and estimated as about 30%. Branched chain amino acids (BCAA) has been reported to promote skeletal muscle synthesis, and suppressive effects of organ lipid accumulation has been also reported. The aim of this study is to estimate the effects of BCAA on the liver lipid accumulation and proinflammation in diet-induced obesity mice. Five-week old male C57BL/6J mice fed a high fat diet (50 energy % by lard) and test diet containing 20% casein (CO as control), 12% leucine and 5% valine mixture (LV) for 12 weeks. Liver triglyceride accumulation was significantly decreased in the LV group. Significant differences between CO and LV group were not observed in mRNA expression of TNF-alpha and a subunit of the NADPH oxidase enzyme, which is proinflammatory markers, and lipid metabolism-related enzymes were not observed. Acyl-CoA oxidase (ACOX) activity was significantly higher in the LV group compared with the CO group, whereas the activity of FAS was not significantly different. These results suggest that leucine and valine suppresses liver lipid accumulation through the activate in of the ACOX.

(受付日 : 2017 年 1 月 18 日, 受理日 : 2017 年 3 月 21 日)

工藤 陽香 (くどう はるか)

現職 : 大妻女子大学大学院人間文化研究科博士後期課程 3 年

大妻女子大学大学院人間文化研究科博士後期課程 3 年在学中.
専門は栄養生化学.