



Acid-treated high-amylose corn starch suppresses high-fat diet-induced steatosis

吉田，竜太郎

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8397号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477823>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Acid-treated high-amylase corn starch suppresses
high-fat diet-induced steatosis

酸処理したハイアミロースコーンスターは
高脂肪食による脂肪肝を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
消化器内科学

(指導教員： 児玉 裕三 教授)

吉田 竜太郎

背景と目的

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は肥満に関連した肝疾患であり、NAFLDは肝硬変や肝細胞癌と強く関連していることから、世界的に脂肪肝の発症や進展を抑制する取り組みがなされている。肥満やNAFLDの患者では健常者と比べて腸内細菌叢が変化していることが報告されており、この腸内細菌叢の変化は、様々な肥満関連疾患の原因となるとともに脂肪肝を悪化させる要因ともされている。

食物繊維の摂取量が少ないと肥満の割合が高くなる一方で、食物繊維摂取量が増えると腸内細菌叢が変化し、肥満が改善する。食物繊維は腸内細菌叢によって分解され、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸が生成される。これら短鎖脂肪酸を経口摂取することにより、高脂肪食による肥満や脂肪肝が抑制されるとしている。

レジスタンントスター（RS）は、小腸で消化・吸収されにくい澱粉の総称である。RSは澱粉であり食物繊維ではないが、消化酵素によって消化・吸収されずに、食物繊維と同様に腸内細菌叢によって短鎖脂肪酸に分解されて吸収可能となる。RSは、その化学的性質から4つのタイプ（RS1～4）に分類される。アミロース含量の高いハイアミロースコーンスターなど、澱粉粒子自体が消化抵抗性を示す2型レジスタンントスター（RS2）が、脂肪肝を抑制するという報告は散見される。しかし、化学試薬を用いて生成された加工澱粉である4型レジスタンントスター（RS4）は、RS2よりもさらに小腸で消化・吸収されにくく、よりRSとしての特性が強いが、このRS4を用いた脂肪肝抑制に関する研究は非常に少ない。このため、本研究では脂肪肝モデルマウスを用いて、RS4の脂肪肝に対する抑制効果を調べた。

対象と方法

雄の C57BL/6J マウスを同体重の 3 群にグループ分けした。7 週齢から 22 週齢まで各群のマウス（n=10、1 ケージあたり 2 匹または 3 匹）

に、高脂肪食 (HFD)、RS4 を添加した高脂肪食 (HFD+RS4)、または通常食 (AIN93G) を与えた。RS4 には、アミロース含有量が高いトウモロコシ澱粉に酸処理を加えて作成したアミロファイバーSH (J オイルミルズ社) を用いた。マウスの体重は毎週測定した。21 週齢の 3 日間にわたり、食物摂取量および便の重量を測定した。22 週齢で、体重、白色脂肪組織重量、肝臓重量を測定し、血液検査、肝臓組織、肝脂肪蓄積に関する遺伝子の発現レベル、盲腸便検体中の短鎖脂肪酸含量、腸内細菌叢を分析した。

血液検査は、血漿中の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)、総コレステロール (TC)、低密度リポタンパク質コレステロール (LDL-C)、高密度リポタンパク質コレステロール (HDL-C)、トリグリセリド (TG) 濃度を測定した。

肝組織はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、脂肪細胞が存在する肝細胞の割合を評価した。また、抗 PPAR γ 抗体を用いて肝組織の免疫染色も行った。

肝脂肪蓄積に関する遺伝子の発現レベルについては、肝組織から RNA を抽出、cDNA を合成し、リアルタイム PCR により脂肪酸合成関連遺伝子 (アセチル CoA カルボキシラーゼ : ACC、脂肪酸合成酵素 : FAS、ステロール調節エレメント結合タンパク質 1 : SREBP1)、脂肪蓄積関連遺伝子であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) を評価した。

盲腸便中の短鎖脂肪酸 (酪酸、酢酸、プロピオン酸) をガスクロマトグラフィーにより測定した。また、盲腸便から 16S rRNA シーケンス解析によって腸内細菌叢を解析した。

データは平均値土平均値の標準誤差 (SEM) で示し、2 群間の差異を評価するために一元配置分散分析に続いて Tukey の検定で評価した。 $p < 0.05$ を統計的に有意であるとみなした。

結果

HFD 群と HFD+RS4 群の間で、餌の摂取量と排便量にはいずれも有意差が認められなかった。22 週齢時での 7 週齢時に対する体重比は、HFD+RS4 群 ($148.8 \pm 5.66\%$) では HFD 群 ($167.2 \pm 3.87\%$) に比べて有意に抑制された ($p=0.0076$)。また、22 週齢時の肝重量も HFD+RS4 群 ($1.37 \pm 0.047\text{g}$) は HFD 群 ($1.62 \pm 0.053\text{g}$) より低く ($p=0.0112$)、白色脂肪組織の重量も、HFD+RS4 群 ($1.06 \pm 0.11\text{g}$) は HFD 群 ($1.73 \pm 0.14\text{g}$) より低かった ($p=0.0003$)。

肝組織の組織所見では、HFD 群の約半数に脂肪肝を認めたが、HFD+RS4 群およびコントロール群では脂肪肝は認めず、RS4 が高脂肪食によるマウスの脂肪肝の発生を抑制する可能性を示した。

血液検査では、HFD+RS4 群と HFD 群を比較すると、AST 値に有意差は見られなかつたが、ALT 値 (12.0 ± 0.69 vs. $19.1 \pm 2.46\text{ IU/L}$, $p=0.0115$)、総コレステロール値 (99.9 ± 7.88 vs. $165.5 \pm 9.45\text{ mg/dL}$, $p<0.0001$)、LDL-C 値 (6.5 ± 0.93 vs. $10.2 \pm 0.96\text{ mg/dL}$, $p<0.0001$)、HDL-C 値 (58.0 ± 2.81 vs. $76.4 \pm 2.15\text{ mg/dL}$, $p<0.0001$)、TG 値 (29.1 ± 5.27 vs. $61.0 \pm 8.80\text{ mg/dL}$, $p=0.0303$) は、いずれも HFD+RS4 群では HFD 群に比べて有意に低かった。

リアルタイム PCR による肝組織を用いた脂肪蓄積に関する遺伝子の発現レベルについては、ACC、FAS、SREBP1 にはいずれも 3 群間に有意差は認められなかつた。PPAR γ に関しては、リアルタイム PCR で HFD+RS4 群と HFD 群で有意差はないが、差がある傾向が見られた (0.73 ± 0.069 vs. 0.99 ± 0.087 , $p=0.1915$)。しかし免疫染色では PPAR γ の発現は 3 群間で同程度であり、HFD+RS4 群と HFD 群で違いは認められなかつた。

16S rRNA シーケンスによって腸内細菌叢を解析すると、 α diversity (Chao 1 index, Shannon index) に関しては 3 群間で有意差はなかつたが、 β diversity は 3 群でそれぞれ異なる傾向が見られた。また、HFD+RS4 群は HFD 群と比較して、短鎖脂肪酸を产生する *Bifidobacterium* ($17.99 \pm 1.94\%$ vs. $3.59 \pm 0.69\%$, $p=0.0019$) および *Lactobacillus* ($14.79 \pm 3.44\%$ vs. $0.72 \pm 0.23\%$, $p=0.0045$) の割合が有意に増加していた。

盲腸便中の短鎖脂肪酸に関して、HFD+RS4 群では HFD 群と比較して、酢酸 (18.83 ± 1.10 vs. $13.28 \pm 1.20 \mu\text{mol/g}$, $p=0.0027$) およびプロピオン酸 (3.50 ± 0.45 vs. $1.77 \pm 0.16 \mu\text{mol/g}$, $p=0.0159$) が有意に多かった。酪酸では、有意差は認められないものの HFD+RS4 群では HFD 群と比較して、多い傾向は見られた (4.00 ± 0.60 vs. $2.98 \pm 0.31 \mu\text{mol/g}$, $p=0.5978$)。

考 察

RS4 による脂肪肝の抑制には、いくつかのメカニズムが考えられる。今回の検討では、脂肪酸合成関連遺伝子 (ACC、Fads1、SREBP1) の発現量はいずれも 3 群間で有意差は認められなかった。また、脂肪蓄積関連遺伝子 (PPAR γ) は、リアルタイム PCR で HFD+RS4 群と HFD 群で差がある傾向は見られたが、肝組織の免疫染色では 3 群いずれにおいても同程度に PPAR γ の発現が組織学的に確認され、HFD+RS4 群と HFD 群を比べて PPAR γ の発現に有意差はなかった。これらの結果から、RS4 は脂肪酸合成や TG 蓄積に関連する遺伝子に直接影響を与えないことが示唆された。

腸内細菌叢の改善は、RS4 が脂肪肝を抑制する重要なメカニズムであると考えられる。本研究では、便中の細菌組成において、HFD+RS4 群は HFD 群と比較して *Bifidobacterium* と *Lactobacillus* が有意に増加することが確認された。また、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* などの腸内細菌が生産する短鎖脂肪酸である酢酸と酪酸も有意に増加することが確認された。一般に、短鎖脂肪酸が作用するメカニズムには、GPR41 や GPR43 などの短鎖脂肪酸の受容体が関与しているといわれている。短鎖脂肪酸は交感神経節では GPR41 を介してエネルギー消費を増加させること、白色脂肪細胞では GPR43 を介して脂肪蓄積を抑制することが報告されている。また、短鎖脂肪酸の一つである酪酸は、GPR43 を介して肝グリコーゲン代謝を促進することが報告されている。これらの知見から、短鎖脂肪酸は白色脂肪細胞の GPR43、交感神経節の GPR41、肝臓の GPR43 を介して体重増加や脂肪肝を抑制している可能性があると思われ

る。

本研究にはいくつかの limitation がある。RS4 摂取による身体活動や代謝量の変化は調べていないこと、RS4 量による脂肪肝改善の違いは検討できていないこと、使用するコントロール食や宿主因によって RS4 の効果に違いがある可能性があること、RS4 を長期間投与した場合の効果は不明であることが挙げられる。RS4 の効果を解明し、これらの疑問に答えるためには、さらなる研究が必要である。

結 語

脂肪肝モデルマウスを用いた研究により、RS4 は腸内細菌叢を変化させ、腸内での短鎖脂肪酸の产生を促進し、脂肪肝の発症を抑制することが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第3188号	氏名	吉田竜太郎
論文題目 Title of Dissertation	酸処理したハイアミロースコーンスターは高脂肪食による脂肪肝を抑制する Acid-treated high-amylase corn starch suppresses high-fat diet-induced steatosis		
審査委員 Examiner	主査 小川 碩 副査 勝 太郎 副査 矢野 美子		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は肥満に関連した肝疾患であり、NAFLDは肝硬変や肝細胞癌と強く関連していることから、世界的に脂肪肝の発症や進展を抑制する取り組みがなされている。レジスタンストスター (RS) は小腸で消化・吸収されにくい澱粉の総称である。RSは、その化学的性質から4つのタイプ (RS1~4) に分類される。今回、申請者は化学試薬を用いて生成された加工澱粉である4型レジスタンストスター (RS4) の脂肪肝に対する抑制効果を検討した。

C57BL/6Jマウスに、高脂肪食 (HFD) 、RS4を添加した高脂肪食 (HFD+RS4) 、または通常食 (AIN93G) を与えた。RS4には、アミロース含有量が高いトウモロコシ澱粉に酸処理を加えて作成したアミロファイバーSH (J オイルミルズ社) を用いた。マウスの体重は毎週測定した。21週齢の3日間にわたり、食物摂取量および便の重量を測定した。22週齢で、体重、白色脂肪組織重量、肝臓重量を測定し、血液検査、肝臓組織、肝脂肪蓄積に関する遺伝子の発現レベル、盲腸便検体中の短鎖脂肪酸含量、腸内細菌叢を分析した。HFD群と HFD+RS4群の間で、餌の摂取量と排便量にはいずれも有意差が認められなかった。22週齢時の7週齢時に対する体重比は、HFD+RS4群 ($148.8 \pm 5.66\%$) では HFD群 ($167.2 \pm 3.87\%$) に比べて有意に抑制された ($p=0.0076$)。また、22週齢時の肝重量も HFD+RS4群 ($1.37 \pm 0.047\text{g}$) は HFD群 ($1.62 \pm 0.053\text{g}$) より低く ($p=0.0112$)、白色脂肪組織の重量も、HFD+RS4群 ($1.06 \pm 0.11\text{g}$) は HFD群 ($1.73 \pm 0.14\text{g}$) より低かった ($p=0.0003$)。肝組織の組織所見では、HFD群の約半数に脂肪肝を認めたが、HFD+RS4群およびコントロール群では脂肪肝は認めず、RS4が高脂肪食によるマウスの脂肪肝の発生を抑制する可能性を示した。血液検査では、HFD+RS4群と HFD群を比較すると、AST値に有意差は見られなかったが、ALT値 (12.0 ± 0.69 vs. $19.1 \pm 2.46\text{ IU/L}$, $p=0.0115$)、総コレステロール値 (99.9 ± 7.88 vs. $165.5 \pm 9.45\text{ mg/dL}$, $p<0.0001$)、LDL-C値 (6.5 ± 0.93 vs. $10.2 \pm 0.96\text{ mg/dL}$, $p<0.0001$)、HDL-C値 (58.0 ± 2.81 vs. $76.4 \pm 2.15\text{ mg/dL}$, $p<0.0001$)、TG値 (29.1 ± 5.27 vs. $61.0 \pm 8.80\text{ mg/dL}$, $p=0.0303$) は、いずれも HFD+RS4群では HFD群に比べて有意に低かった。リアルタイムPCRによる肝組織を用いた脂肪蓄積に関連する遺伝子の発現レベルについては、ACC、FAS、SREBP1にはいずれも3群間に有意差は認められなかつた。PPAR γ に関しては、リアルタイムPCRで HFD+RS4群と HFD群で有意差はないが、差がある傾向が見られた (0.73 ± 0.069 vs. 0.99 ± 0.087 , $p=0.1915$)。しかし免疫染色では PPAR γ の発現は3群間で同程度であり、HFD+RS4群と HFD群で違いは認められなかつた。16S rRNA シーケンスによって腸内細菌叢を解析すると、odiversity (Chao 1 index, Shannon index) に関しては3群間で有意差はなかつたが、 β diversity は3群でそれぞれ異なる傾向が見られた。また、HFD+RS4群は HFD群と比較して、短鎖脂肪酸を產生する *Bifidobacterium* ($17.99 \pm 1.94\%$ vs. $3.59 \pm 0.69\%$, $p=0.0019$) および *Lactobacillus* ($14.79 \pm 3.44\%$ vs. $0.72 \pm 0.23\%$, $p=0.0045$) の割合が有意に増加していた。盲腸便中の短鎖脂肪酸に関して、HFD+RS4群では HFD群と比較して、酢酸 (18.83 ± 1.10 vs. $13.28 \pm 1.20\text{ }\mu\text{mol/g}$, $p=0.0027$) およびプロピオン酸 (3.50 ± 0.45 vs. $1.77 \pm 0.16\text{ }\mu\text{mol/g}$, $p=0.0159$) が有意に多かつた。酪酸では、有意差は認められないものの HFD+RS4群では HFD群と比較して、多い傾向は見られた (4.00 ± 0.60 vs. $2.98 \pm 0.31\text{ }\mu\text{mol/g}$, $p=0.5978$)。すなわち、脂肪肝モデルマウスを用いた研究により、RS4は腸内細菌叢を変化させ、腸内での短鎖脂肪酸の產生を促進し、脂肪肝の発症を抑制することが示唆された。

本研究は RS4の脂肪肝抑制効果について検討し、従来ほとんど検討が行われていなかった RS4の脂肪肝抑制作用における腸内細菌や短鎖脂肪酸の関与を示したものとして価値ある業績であると認める。よつて本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。