

# 非アルコール性脂肪肝モデル SHRSP5/Dmcr ラットにおける L-シトルリンの体重増加および肝臓内脂肪蓄積抑制効果

武庫川女子大学薬学部 東洋医学研究室 高明、工藤麻耶

**1. 背景・目的** 近年の日本における食生活の欧米化進行に伴い、脂質や糖質の過剰摂取に加え、運動不足や飲酒、喫煙などによる生活習慣の乱れにより、体重増加が引き起こされる。体重が増加すると、脂質代謝異常症、高脂血症、高血圧、脂肪肝などの発症の原因となる。これらの疾患が現れた場合は薬物治療を行うが、長期間服用による人体への悪影響が懸念される。従って、天然植物を用いた、安全な治療法の確立が期待される。

SHRSP5/Dmcr ラットは、高脂肪・高コレステロール食を与えることで、短期間で非アルコール性脂肪肝を発症するモデル動物として開発された<sup>1),2)</sup>。L-シトルリン（以下L-Citと表記）はスイカから発見された遊離アミノ酸の一種である<sup>3)</sup>。我々は以前L-Citをモデル動物に投与し、摂食抑制を介した抗肥満作用に関する報告を行った<sup>4)</sup>。本稿ではSHRSP5/Dmcrラットを用いて、L-Citの体重増加および肝臓内脂肪蓄積抑制効果とその作用機序について検討を行ったので紹介する。

## 2. 研究結果・考察

### (1) SHRSP5/DmcrラットにおけるL-Cit投与の効果

7週齢雄性SHRSP5/Dmcrラットを高脂肪・高コレステロール食飼育下において、0.5 g/kg/dayのL-Citを9週間強制経口投与したところ、有意な体重増加抑制が認められた。しかし摂餌量および肝臓・脂肪重量に変化はなかった。また血液中のコレステロール値、中性脂肪値、遊離脂肪酸値もL-Cit投与による影響はなかった。しかし肝臓中のコレステロール値、中性脂肪値は対照群と比べ、L-Cit群で有意に減少した。さらに肝機能を示す指標である aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) もL-Cit群で低値を示した（表1）。

		対照群	L-Cit群
体重 (g)		270.5±2.19	257.6±3.37*
摂餌量 (g/day)		13.9±1.17	13.0±0.21
肝臓重量 (mg/g (体重))		125.5±9.68	132.2±7.87
脂肪重量 (mg/g (体重))		11.0±0.71	11.6±0.97
コレステロール値 (mg/dL)	血中	220.8±20.46	220.6±3.13
	肝臓中	100.8±3.26	79.9±6.38*
中性脂肪値 (mg/dL)	血中	45.5±2.14	53.0±2.24*
	肝臓中	256.2±20.8	171.6±26.6*
血中遊離脂肪酸値 (mEq/L)		0.58±0.03	0.59±0.03
血中AST値 (IU/L)		303.3±6.43	273.8±11.24*
血中ALT値 (IU/L)		36.3±5.49	17.0±3.01*

\*P<0.05 対照群との有意差

表1. SHRSP5/DmcrラットのL-Cit投与開始9週目におけるメタボリックパラメーターの比較

### (2) L-Cit投与による体重増加および肝臓内脂肪蓄積抑制効果の作用機序の検討

#### ① L-Citの体重増加抑制効果の作用機序の検討

L-Cit投与による体重増加抑制効果の作用機序を解析するため、SHRSP5/Dmcrラットの脂肪組織における脂質代謝経路関連因子の発現量の検討を行った。脂質代謝を司り、細胞内のエネルギーセンサーである<sup>1)</sup> AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化の割合は、対照群と比較しL-Cit群で有意に活性化された。AMPKの下流因子について、脂肪合成に参与する因子である acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化の割合、および fatty acid synthase (FAS) の発現量は二群間で変化はなかった。しかし

脂肪分解に参与する因子である hormone-sensitive lipase (HSL) のリン酸化の比率は、L-Cit群で有意に増加した。また、AMPKの上流に位置する因子についても検討を行った。AMPKの上流因子である

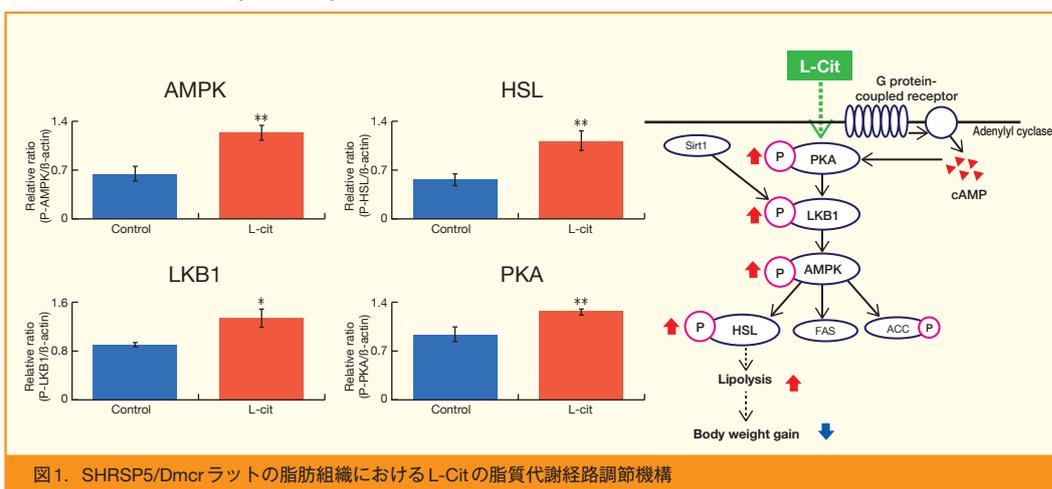


図1. SHRSP5/Dmcrラットの脂肪組織におけるL-Citの脂質代謝経路調節機構

sirtuin1 (Sirt1) の遺伝子発現量に影響はなかったが、別の上流因子である liver kinase B1 (LKB1) および、protein kinase A (PKA) のリン酸化の割合は、L-Cit群で顕著な増加が見られた。本結果から、L-Citの投与により SHRSP5/Dmcr ラットの脂肪組織において、脂質代謝経路の PKA-LKB1-AMPK-HSL シグナル活性化を介して、脂肪の分解を促進することで体重増加を抑制する可能性が示された (図1)。

## ② L-Citの肝臓内脂肪蓄積抑制効果の作用機序の検討

次にL-Cit投与による肝臓内脂肪蓄積抑制効果の作用機序を解析するため、SHRSP5/Dmcr ラットの肝臓における組織学的検討と、脂質代謝経路関連因子の発現量の検討を行った。はじめに肝臓内の脂肪滴蓄積量の検討を行うため、肝臓の組織切片を作成し、hematoxylin and eosin (HE) 染色を行ったところ、対照群と比べL-Cit群で脂肪滴の減少が認められた。また慢性的な脂肪肝により肝臓の線維化が惹起される<sup>5)</sup>と考えられており、肝臓の線維化について検討を行うためAZAN染色を行ったところ、L-Cit投与により線維化の進行が抑制されることが示された。さらに、L-Cit投与による肝臓内脂肪蓄積抑制効果の作用機序を解析するため、SHRSP5/Dmcr ラットの肝臓における、脂質代謝関連因子の発現量の検討を行った。脂質代謝経路の中心的酵素である AMPK のリン酸化の割合は、L-Cit投与により有意に増加した。AMPK の下流因子については、ACC のリン酸化の割合に差はなかったが、sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1C) および FAS の遺伝子発現量が著しく減少した。また AMPK の上流因子について検討を行ったところ、PKA の活性化は認められなかったが、LKB1 のリン酸化率の増加ならびに Sirt1 の発現量の増加が示された。

さらにL-Cit投与による肝臓の線維化に関連する因子の発現量についても検討を行った。肝臓の線維化に関与する主要因子である transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1)<sup>6)</sup> の発現量は、対照群と比べL-Cit群で有意に減少した。さらに TGF- $\beta$ 1 の下流に位置する Smad2 (Ser465/467) /Smad3 (Ser423/425) (Smad2/3) のリン酸化の割合も、L-Cit群で低値を示した。以上の結果より、L-Citは SHRSP5/Dmcr ラットの肝臓において、脂質代謝経路の Sirt1-LKB1-AMPK-SREBP1C-FAS シグナル活性化を介して脂肪合成を抑制することで、肝臓内脂肪蓄積抑制効果を示し脂肪肝を改善することが明らかとなった。さらにL-Cit投与による脂肪肝の改善により、TGF- $\beta$ 1-Smad2/3 経路を抑制することで、肝臓の線維化促進を抑制する可能性が示唆された (図2)。

**3. 結論** 本研究において SHRSP5/Dmcr ラットへの9週間のL-Cit投与により、AMPKを介した体重増加抑制、肝臓内脂肪蓄積抑制、および線維化進行阻止作用を発揮することをはじめて明らかにした。本研究結果は、L-Citが体重増加抑制および脂肪肝改善効果に対して有用な機能性食品となり得る可能性を示した。

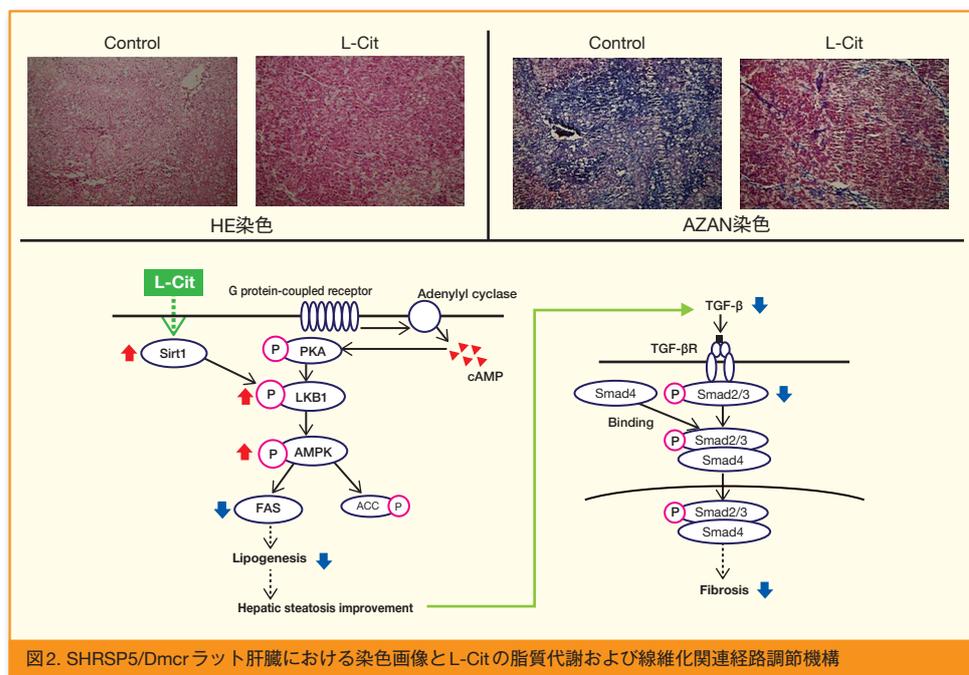


図2. SHRSP5/Dmcr ラット肝臓における染色画像とL-Citの脂質代謝および線維化関連経路調節機構

## 参 考 文 献

- 1) Liu et al. Nutrients. 2018, 10. 830.
- 2) Yamori et al. Japanese Circulation Journal. 1981, 45. 1068-1073.
- 3) Rimando & Perkins-Veazie. Journal of Chromatography. 2005, 05. 009.
- 4) Kudo et al. Biological Pharmaceutical Bulletin. 2017, 40. 524-530.
- 5) Yang et al, Journal of Natural Medicines. 2018, 72. 145-152.
- 6) Friedman et al. Gastroenterology. 2008, 134. 1655-1669.