

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09336

研究課題名(和文) 門脈血代謝産物一斉解析による非アルコール性脂肪性肝炎と肝小胞体ストレスの関係解明

研究課題名(英文) Elucidation of the association between non alcoholic steatohepatitis and endoplasmic reticulum stress by metabolomics of portal blood

研究代表者

嘉数 英二 (KAKAZU, EIJI)

東北大学・東北大学病院・助教

研究者番号：20509377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスと脂肪肝モデルマウスの門脈血メタボローム解析結果から、それぞれの門脈血の遊離アミノ酸濃度に一致した無血清培地を作製した。この培地を用いて肝細胞脂肪変性に関与する遊離アミノ酸の同定を行った。7種類の遊離アミノ酸の低下、特にメチオニンとチロシンの低下により有意に肝細胞脂肪変性をきたすことが明らかとなった。更に、これらのアミノ酸の低下が肝細胞に小胞体ストレスを与え中性脂肪の放出が低下することが明らかになった。動物実験でも、食事中的メチオニンとチロシンを除去することで、非アルコール性脂肪性肝炎に極めて近い肝病理像が得られることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の環境要因として過剰な糖質、脂質の関与は多くの研究で証明されてきたが、本研究で一部の遊離アミノ酸の不均衡も肝細胞脂肪変性を悪化させNASHの要因となる可能性が示唆された。また、本研究で開発した門脈血類似灌流培養は生体内の環境に近い培養法で、肝細胞の代謝研究を行う上で従来の培養法よりもはるかに優れていると考える。今後、更に研究を発展させることで候補アミノ酸の代謝を促進することでNASHの治療・予防につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the association between the imbalance of free amino acids (FAAs) in portal blood (PB) and the pathogenesis of hepatic steatosis in NAFLD. We measured metabolites in PB of fasting WT mice and NAFLD model mice. Then, we made two media that were consistent with the levels of FAAs in the PB of wt or NAFLD model mice. We found that the decrease of 7 FAAs, especially Met and Tyr, in the media induced TG accumulation and ER stress via the suppression of lipid secretion from hepatocytes. The high fat, L-methionine (Met) / L-tyrosine (Tyr) -deficient diet (HF-MTD) induced steatosis and ballooning pathologically in the liver of C57BL/6 mice, but the HF diet did not.

研究分野：肝臓

キーワード：遊離アミノ酸 非アルコール性脂肪性肝炎 非アルコール性脂肪性肝疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食生活の西欧化に伴いメタボリックシンドロームが増加しており、その肝臓での表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患・肝炎 (NAFLD/NASH) も増加傾向である。NASH の発生機序は不明であり肝硬変・肝がんに行進することから、その病態解明・治療薬の創出が急務である。

2. 研究の目的

本研究では通常のマウスと脂肪肝モデルマウスの門脈血代謝産物をメタボロミクスの技術により一斉に解析し、肝脂肪変性・肝障害・脂肪肝関連遺伝子発現等に関係する候補代謝産物を同定しその代謝産物の肝細胞に与える影響を解析し NASH の病態解明・治療薬開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

通常のマウスと脂肪肝モデルマウス (ob/ob, kkAy) の門脈血のメタボローム解析を行い、脂肪肝モデルマウスで有意に増加・低下している門脈血中代謝産物を明らかにする。門脈血の遊離アミノ酸濃度に一致したアミノ酸組成を持つ培地を用いて同定された候補代謝産物に関して *in vitro* でオレイン酸、パルミチン酸による肝脂肪変性、アポトーシスの抑制効果を解析する。更に小胞体ストレスを介したメカニズムの解析をおこなう。NASH 病態の改善を期待できる代謝産物に関して、食餌誘導性・遺伝子改変脂肪肝モデルマウスを用いた介入試験を行う。更に、実際の NASH 患者の末梢血および肝組織において候補代謝産物を測定し、臨床検査との比較を行う。

4. 研究成果

(1). 空腹時の脂肪肝モデルマウスの門脈血では7種類の遊離アミノ酸が低下していた。

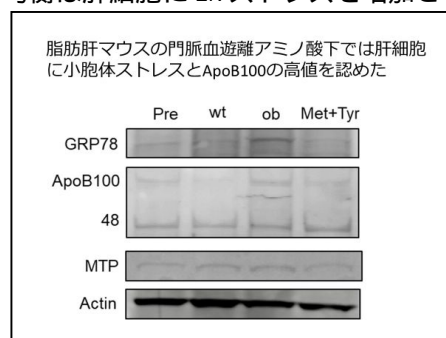
6週齢の雄 C57BL/6JhamSlc-ob/ob (+/+)、C57BL/6JhamSlc-ob/ob(ob/ob)、KK-Ay/TaJcl の空腹時の門脈血を CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。6週齢の時点では ob/ob のみが脂肪肝を呈していた。200種類以上の代謝産物が同定され、遊離アミノ酸に注目すると7種類の遊離アミノ酸、L-Glycine (Gly)、L-Serine (Ser)、L-Lysine (Lys)、L-Threonine (Thr)、L-Methionine (Met)、L-Tyrosine (Tyr)、L-Arginine (Arg) が有意に低下していた。

(2). 7種類のアミノ酸の中で Met および Tyr に脂肪滴減少効果を認めた。

メタボローム解析データを元に WT マウスおよび ob/ob マウスの門脈血中アミノ酸・グルコース濃度に類似させた培地 (PBM-wt, PBM-ob) を作成しこの培地下で SV40 C57BL/6 不死化肝細胞を用いてオレイン酸で誘導した脂肪滴の退縮を比較したところ、PBM-ob で残存脂肪滴は有意に高値となり、PBM-ob で低下した7種類のアミノ酸を加えた培地 (PBM-ob+AAs) を用いることで残存脂肪滴は有意に減少した。更に7種類のアミノ酸の中で Met および Tyr に有意な脂肪滴減少効果を認めた。

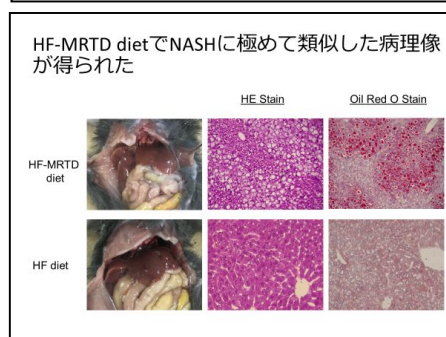
(3). 脂肪肝モデルマウスの門脈血中遊離アミノ酸不均衡は肝細胞に ER ストレスを増加させ Met と Tyr の添加で低下した。

これまでの過去の報告では脂肪肝モデルマウスでは肝臓に小胞体 (ER) ストレスが発生することが明らかになっているが、PBM-wt と比較して PBM-ob 下では肝細胞に ER ストレス (GRP78 の高発現) が発生することが明らかとなった (図)。つまり、脂肪肝モデルマウスの遊離アミノ酸不均衡が肝細胞に ER ストレスを発生させることが明らかとなった。



(4). 高脂肪・Met 制限 Tyr 欠損食餌 (HF-MRTD) で飼育したマウスは NASH に極めて類似した表現型を呈した

HF-MRTD 群では通常食群に比べ体重増加を認めた。病理学的に steatosis, ballooning が生じ NASH に極めて類似した病理像を呈した (図)、肝機能、肝内 TG 定量は高値を示した。更に肝組織の GRP78 レベルが上昇した。



(5). NAFLD/NASH 患者の肝内脂肪と Met と Tyr は有意な逆相関を認めた。

NAFLD/NASH 患者 80 例の血中遊離アミノ酸濃度と脂肪肝の指標とな CT 値 Liver/Spleen 比を比較したところ Met および Tyr に有意な相関関係を認めた。グルタミン等遊離アミノ酸には相関関係を認めなかった。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kakazu E, Sano A, Morosawa T, Inoue J, Ninomiya M, Iwata T, et al. Branched chain amino acids are associated with the heterogeneity of the area of lipid droplets in hepatocytes of patients with non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol. Res. 2019 in press
2. Fukushima M, Dasgupta D, Mauer AS, Kakazu E, Nakao K, Malhi H. StAR-related lipid transfer domain 11 (STARD11)-mediated ceramide transport mediates extracellular vesicle biogenesis. J. Biol. Chem. 2018; 293:15277-15289.
3. Honma M, Sawada S, Ueno Y, Murakami K, Yamada T, Gao J, Kodama S, Izumi T, Takahashi K, Tsukita S, Uno K, Imai J, Kakazu E, Kondo Y, Mizuno K, Kawagishi N, Shimosegawa T, Katagiri H. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. Int. J. Obes. 2018; Sep;42(9):1544-1555.
4. Sano A, Kakazu E, Morosawa T, Inoue J, Kogure T, Ninomiya M, et al. The profiling of plasma free amino acids and the relationship between serum albumin and plasma-branched chain amino acids in chronic liver disease: a single-center retrospective study. J. Gastroenterol. 2018; Aug;53(8):978-988.

[学会発表] (計 6 件)

嘉数英二、佐野晃俊、正宗淳 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の中心静脈周囲・肝細胞脂肪滴面積と血中栄養パラメーターの関係、第 42 回 日本肝臓学会東部会 2018
Eiji Kakazu, Akitoshi Sano, Tatsuki Morosawa, Jun Inoue, Masashi Ninomiya, Tomoaki Iwata, Satoshi Takai, Takuya Nakamura, Tooru Shimosegawa, Atsushi Masamune. Association between the area in hepatocytes with lipid droplets and plasma metabolic parameters in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). 米国肝臓学会 (AASLD) 年次集会 2018

嘉数英二 佐野晃俊 諸沢樹 井上淳 二宮匡史 岩野朋晃 梅津輝行 高井智 中村琢也 正宗 淳下瀬川徹 各種慢性肝疾患の肝予備能と血漿遊離アミノ酸プロファイル 第 104 回日本消化器病学会総会 : 2018

Eiji Kakazu, Akitoshi Sano, Tatsuki Morosawa, Jun Inoue, Takayuki Kogure, Masashi

Ninomiya, Tomoaki Iwata, Teruyuki Umetsu, Takuya Nakamura, Satoshi Takai, Tooru Shimosegawa. The relationship between the plasma free amino acids and the pathological features in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). 米国肝臓学会 (AASLD) 年次集会 2017

嘉数英二、佐野晃俊、井上 淳、小暮高之、二宮匡史、諸沢 樹、梅津輝行、高井 智、中村琢也、岩田朋晃、下瀬川徹 門脈血類似・三次元灌流培養による肝細胞に対する脂肪毒性と小胞体ストレスの評価 第53回日本肝臓学会総会 2017

Eiji Kakazu, Amy Mauer, Harmeet Malh. Lipotoxicity induces releasing ceramide-rich proinflammatory extracellular vesicles from hepatocytes in an IRE1alpha-dependent manner. アジア太平洋肝臓病学会 (APASL) 年次集会 2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1件)

名称：肝脂肪低減剤

発明者：嘉数英二、佐野晃俊

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2018-25413/JP, PCT/JP2019/005655

出願年：2018, 2019

国内外の別：国際出願

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。