

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15776

研究課題名(和文) アミノ酸に着目した非アルコール性脂肪性肝疾患の予防と予測技術の開発

研究課題名(英文) The study on prevention and prediction of non-alcoholic fatty liver disease focusing on the amino acid.

研究代表者

三浦 徳 (MIURA, Atsushi)

日本大学・生物資源科学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号：90826281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まずCDAHFD誘導NASHモデルマウスを用いて、NASH病態の経時的変化を解析した。CDAHFD給餌は、急激な肝臓への脂質蓄積と免疫細胞浸潤、そして線維化シグナルの活性化を誘導した。続いて、トランスクリプトーム解析とメタボローム解析を用いて、これらの表現型と代謝的变化との関連性を評価した。その結果、ペントースリン酸経路などの炭水化物代謝、グルタチオンなどの酸化還元状態の異常が線維形成と関連する可能性が明らかとなった。以上のことから、アミノ酸代謝の変化が炭水化物などの他の代謝経路の異常と関連することで、NAFLD/NASH病態の悪化の一端を担う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

NAFLD/NASHは、悪化の指標となるバイオマーカーや効果的な治療法が乏しいことから、それらの確立が急務となっている。本研究では、アミノ酸代謝がNAFLD/NASHの病態進行において担う役割や、病態予測において有用である可能性を明らかにすることができた。本研究の成果は、肝臓における代謝破綻と病態形成の関連性を明らかにするのみならず、アミノ酸の機能性やその分子機序の理解へと繋がる重要な知見となる。今後は、NASH発症のトリガーとなる代謝経路の特定と詳細な分子メカニズムの解明を通じて、NAFLD/NASHを克服する社会の実現に向けて努力してゆきたい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to reveal the mechanisms of the onset of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), using a choline-deficient l-amino acid-defined high-fat diet (CDAHFD)-induced NASH mouse model. The CDAHFD induced marked steatosis, macrophage recruitment, and fibrogenic activation in the liver within a short period. We also clarified that abnormality in the carbohydrate metabolism (such as pentose phosphate pathway), and the redox state (liver glutathione and cysteine levels) were associated with the fibrogenic activation in the CDAHFD-fed mouse liver. Taken together, these results suggest that metabolic abnormality in the amino acid and carbohydrate metabolism are linked to the onset of NAFLD/NASH.

研究分野：栄養生理化学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 脂肪肝 肝線維化 アミノ酸 メタボロミクス トランスクリプトミクス

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は肥満や糖尿病など生活習慣病を背景とする肝疾患であり、世界の有病率は約 25% へと増加している (Hepatology, 64 (1):73-84, 2016)。NAFLD では、脂肪が過剰に蓄積した脂肪肝が、コラーゲン線維の異常蓄積や過度な炎症が伴う脂肪肝炎 (NASH) へと悪化し、最終的に肝硬変や肝がんとなる。(1) 脂肪肝を NASH へと悪化させる決定的要因が不明であること、(2) NASH の疑いが全くない人の肝臓を分析し「単なる脂肪肝」か「今後 NASH へと悪化する脂肪肝」かを判別・評価することは難しいことなどから、NAFLD 悪化の予測バイオマーカーや予防技術は未だ確立されていない (日本消化器病学会, NAFLD/NASH 診療ガイドライン, 2014)。

古くからアミノ酸は肝硬変や肝がんにおいて、肝臓が機能しているかを評価する指標であり、一種類のアミノ酸の血中濃度変化だけでなく、複数のアミノ酸組成比の変化もバイオマーカーとして用いられている (Hepatology, 34 (3):170-7, 2006)。また、アミノ酸は肝機能を維持する生理機能を持っており、実際に分岐鎖アミノ酸は肝硬変の栄養療法に利用される (World J. Gastroenterol., 19 (43):7620-7629, 2013)。我々は、薬物による急性肝障害モデルマウスの肝機能の変化について詳細に研究する過程で、肝障害によって肝臓のアミノ酸代謝が低下すること、アミノ酸代謝の回復が肝臓の再生を反映する指標となることを既に見出していた。これらの知見から、申請者は、アミノ酸を肝疾患に伴う肝機能異常の予測指標として用いることが可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、以下 2 つを検討することを目的に研究を実施した。

- (1) アミノ酸代謝と NAFLD や NASH 病態進行の関連性を解明する。
- (2) NAFLD の悪化を反映するアミノ酸関連バイオマーカーを明らかにする。

3. 研究の方法

(コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食誘導 NASH モデルマウスの経時的な病態解析)

コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD) を C57BL/6J マウスに 12 週間給餌し、単純性脂肪肝から NAFLD/NASH へと至る病態形成過程について、脂肪蓄積および炎症細胞動員、線維形成に着目し解析を実施した。

(RNA-seq を用いた CDAHFD 誘導 NASH モデルマウスの肝トランスクリプトームの特徴付け)

CDAHFD 給餌マウスの肝臓を用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施し、主成分分析やパスウェイ解析により CDAHFD 給餌によって生じる生物学的プロセスの変化を特徴付けた。

(メタボローム解析を用いた NAFLD/NASH 悪化と関連する代謝変化の探索)

NASH 誘導過程で肝臓において生じる代謝的变化を捉える目的で、CDAHFD 給餌マウスの肝臓を用いてガスクロマトグラフィー質量分析法によるノンターゲットメタボロミクス解析、液体クロマトグラフィー質量分析法によるターゲット代謝物分析を実施した。

4. 研究成果

(コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食誘導 NASH モデルマウスの経時的な病態解析)

CDAHFD は Matsumoto らが確立した、コリンの欠乏とメチオニンの低減により実験的 NASH を誘導する試験食である (Int. J. Exp. Pathol., 94(2):93-103, 2013)。比較的短期で NASH 病態が形成されること、アミノ酸組成変化の影響を再現性よく評価できることから、CDAHFD 誘導 NASH モデルを用いて NASH 病態の経時的な解析を実施した。実験的 NAFLD/NASH モデルマウスの初期における表現型の一つに肝臓への脂肪蓄積がある。そこで、まず組織学的解析によって CDAHFD を給餌した C57BL/6J マウスが著しい脂肪肝を呈することを確認した。予想に反して、脂肪滴の形成は CDAHFD 給餌後わずか 1 週間で生じた。肝臓における中性脂肪含量を測定したところ、CDAHFD 給餌 1 週目から顕著な中性脂肪蓄積が認められた (図 1 上段左)。また、肝障害の誘導が確認された (図 1 上段右)。続いて、シリウスレッド染色およびマッソントリクローム染色を用いて肝臓における繊維形成を評価した。その結果、CDAHFD 給餌後 4 週目から顕著な膠原線維沈着が観察された。これと一致して、肝臓 hydroxyproline 含量は CDAHFD 給餌 4 週目から増加した (図 1 中段左)。肝線維化促進分子 transforming growth factor beta1 (Tgfb1) の遺伝子発現を測定した結果、Tgfb1 発現は CDAHFD 給餌 1 週目から増加することが示された。

(図1中段右)。肝臓への免疫細胞の動員についてケモカイン Ccl2 の遺伝子発現を測定したところ、CDAHFD 給餌 1 週目から発現が増加することが示された(図1下段)。これと一致して、pan-macrophage マーカーである CD68 を免疫組織学的に解析したところ、CD68 陽性細胞は CDAHFD 給餌 1 週目から増加し、CDAHFD 給餌 12 週まで増加した。以上のことから、CDAHFD 誘導 NASH モデルでは、試験食給餌直後から急速な脂質蓄積による脂肪肝形成、線維化シグナルと免疫細胞動員の活性化が生じることが明らかとなった。これらの表現型変化が予想よりも早期に生じていた点に着目し、続いてこれらと関係する代謝変化を捉えることを試みた。

(RNA-seq を用いた CDAHFD 誘導 NASH モデルマウスの肝トランスクリプトームの特徴付け)

肝臓におけるトランスクリプトーム解析の結果、CDAHFD 給餌 1 週目から炎症応答、細胞外マトリクスの再構築に関わるイベントが活性化した。一方、レチノール代謝やステロイドホルモン生成といった脂質代謝、トリプトファン代謝などのアミノ酸代謝、ペントース/グルクロン酸代謝やスターチ/スクロース代謝などの糖代謝に関わる経路がダウンレギュレーションを受けた。また、CDAHFD 給餌 12 週では、酸化リン酸化の経路が抑制されることが明らかとなった。また、主成分分析の結果、CDAHFD 給餌後早期から肝臓の遺伝子発現プロファイルはダイナミックに変化することが示された。以上のことから、CDAHFD 給餌による NASH 誘導過程では、炎症応答などの生物学的プロセスのみならず、糖やアミノ酸などの代謝経路も変動することが明らかとなった。

(メタボローム解析を用いた NAFLD/NASH 悪化と関連する代謝変化の探索)

遺伝子レベルでの変化を裏付ける目的で、メタボローム解析およびターゲット代謝物分析を実施した。肝臓メタボローム解析の結果、遺伝子における変化と一致して、スターチ/スクロース代謝やペントースリン酸経路といった炭水化物代謝、ピルビン酸代謝などのエネルギー代謝が CDAHFD 給餌の影響を受けることが示された(図2)。さらにターゲット代謝物分析を行った結果、肝臓におけるシステイン含量が経時的に増加する一方、血漿におけるシステインレベルが徐々に低下することを明らかにした(図3)。特に、肝臓におけるグルタチオンおよび S-adenosylmethionine 含量が経時的に増加したことから、これらは CDAHFD 給餌によって生じたメチオン代謝の破綻を反映しているものと考えられた。

(まとめ)

本研究の結果から、NASH 病態が悪化する過程ではアミノ酸代謝の破綻が脂質や炭水化物の代謝異常へと繋がること、グルタチオンやシステインによる酸化還元状態の異常が蓄積すること、そしてこれらの代謝変化が線維形成や免疫細胞浸潤と関連する可能性があることが明らかとなった。以上の成果は、学術論文として投稿中である。

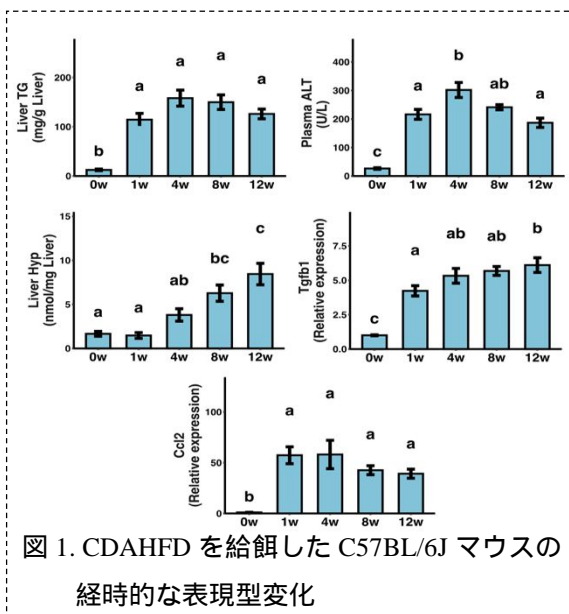


図1. CDAHFD を給餌した C57BL/6J マウスの経時的な表現型変化

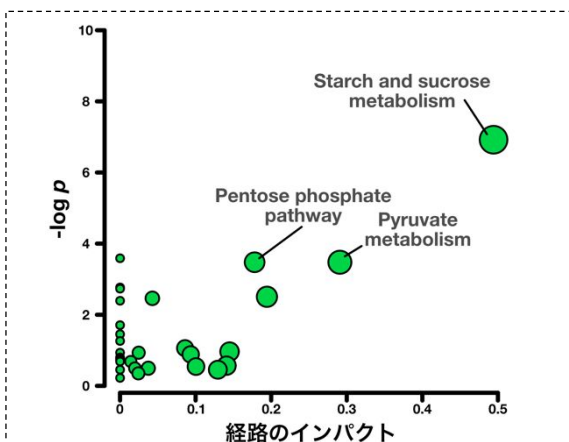


図2. CDAHFD を給餌した C57BL/6J マウスで変化した代謝経路

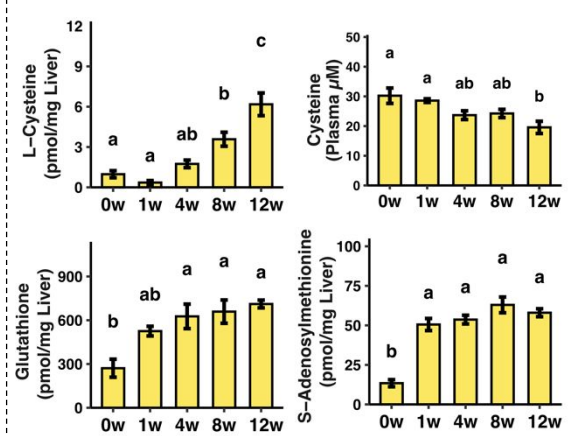


図3. CDAHFD を給餌した C57BL/6J マウスの経時的な代謝的变化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okue Sachiko, Ishikawa Eimi, Nakahara Ren, Ito Tsubasa, Okura Takumi, Sakae Mana, Miura Atsushi, Ozaki-Masuzawa Yori, Hosono Takashi, Seki Taiichiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Fish oil suppresses obesity more potently in lean mice than in diet-induced obese mice but ameliorates steatosis in such obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 421 ~ 429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Atsushi, Hosono Takashi, Seki Taiichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Macrophage potentiates the recovery of liver zonation and metabolic function after acute liver injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88989-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Miura, Ayana Ikeda, Marina Abe, Kiki Seo, Takahiro Watanabe, Yori Ozaki-Masuzawa, Takashi Hosono, Taiichiro Seki	4. 巻 -
2. 論文標題 Diallyl Trisulfide Prevents Obesity and Decreases miRNA-335 Expression in Adipose Tissue in a Diet-Induced Obesity Rat Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition & Food Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mnfr.202001199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 三浦 徳, 池田 志織, 増澤(尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 四塩化炭素誘導急性肝障害の再生過程におけるマクロファージ除去の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会（福岡）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 LI WEITONG, 三浦 徳, 北田 祐也, 石倉 菜奈, 増澤(尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎、急性肝障害モデルマウスにおける尿素回路関連酵素に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会 (福岡)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥江 紗知子, 矢口 真実, 三浦 徳, 増澤(尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 ガーリック由来有機硫黄化合物がtissue factorならびにプラーク形成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会 (福岡)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 瑛未, 奥江 紗知子, 河野 勇氣, 三浦 徳, 増澤 (尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 Fish Oilの肥満予防・改善に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会 (福岡)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細野 崇, 折原 陸, 三浦 徳, 増澤(尾崎) 依, 関 泰一郎
2. 発表標題 ガーリック由来diallyl trisulfide によるアセトアミノフェン誘導性肝障害抑制機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会 (福岡)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Watanabe, Ayana Ikeda, Kiki Seo, Atsushi Miura, Yori Ozaki-Masuzawa, Takashi Hosono, Taiichiro Seki
2. 発表標題 A novel antiobesity effect of garlic compound mediated through miRNA
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuya Kitada, Shiori Ikeda, Atsushi Miura, Yori Ozaki-Masuzawa, Takashi Hosono, Taiichiro Seki
2. 発表標題 Effects of spontaneous exercise on NASH pathology in the CDAHFD-fed mouse model
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Kosaka, Yori Ozaki-Masuzawa, Rino Abiru, Keigo Kawate, Yuki Kohno, Atsushi Miura, Morichika Konishi, Nobuyuki Itoh, Asako Takenaka, Takashi Hosono, Taiichiro Seki
2. 発表標題 The mechanism of FGF21-induced suppression of liver lipid accumulation during protein malnutrition
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺高大, 阿部真理奈, 三浦 徳, 増澤(尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 Diallyl trisulfideの抗肥満作用と脂質代謝関連遺伝子の発現について
3. 学会等名 第34回 日本香辛料研究会 学術講演会 (福岡)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥江 紗知子 , 榮 まな , 伊藤 翼 , 大倉 匠海 , 三浦 徳 , 増澤(尾崎) 依 , 細野 崇 , 関 泰一郎
2. 発表標題 魚油の抗肥満作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会 (静岡)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦 徳,池田 志織,河野 勇氣,渡辺 高大,澤,尾崎,依,細野 崇,関 泰一郎
2. 発表標題 メタボロミクスを用いた非アルコール性脂肪肝炎の発症機構の解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会 (仙台)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部 真理奈,渡辺 高大,三浦 徳,増澤,細野 崇,関 泰一郎
2. 発表標題 ガーリック由来香気成分の抗肥満作用と白色脂肪細胞の脂質代謝関連酵素に及ぼす影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会 (仙台)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 An Ni,森下 裕菜,三浦 徳,澤,尾崎,依,細野 崇,関 泰一郎
2. 発表標題 システイン残基の修飾に着目したガーリック由来香気成分の抗炎症メカニズムの解明
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会 (仙台)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細野 崇, 和田 健司, 三浦 徳, 増澤(尾崎) 依, 関 泰一郎
2. 発表標題 脂質の量や質がマウスの摂餌行動に及ぼす影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会 (仙台)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥江紗知子, 高橋 舞, 折原 陸, 齊藤貴志, 西道隆臣, 三浦 徳, 増澤(尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 魚油はアルツハイマー病モデルマウスの認知機能の低下を抑制する
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部 合同大会 (宮崎・オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 徳, 川手 啓吾, 増澤(尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食誘導NASHモデルマウスにおいて炭水化物代謝およびメチオニン代謝は肝線維化に関連する
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会 (仙台, オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 健之, AN Ni, 佐々木 翼, 松下 七海, 三浦 徳, 増澤(尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 マクロファージによる凝固・線溶系因子の発現と血小板凝集に及ぼすトリメチルアミン N-オキシド (TMAO) の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会 (仙台, オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中原 蓮,和田 健司,石川 瑛未,川手 啓吾,奥江 紗知子,三浦 徳,増澤(尾崎) 依,細野 崇,関 泰一郎
2. 発表標題 魚油の抗肥満作用メカニズムにおけるUCP1の役割について
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会 (仙台, オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川手 啓吾,小坂 浩輝,三浦 徳,増澤(尾崎) 依,細野 崇,関 泰一郎
2. 発表標題 メチオニン低減、コリンの欠乏が非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスのリボプロテインプロファイルに及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会 (仙台, オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒井 孝志,青木 勇樹,奥江 紗知子,三浦 徳,増澤(尾崎) 依,細野 崇,関 泰一郎
2. 発表標題 ターメリックオイルが高脂肪食給餌マウスの脂質代謝並びに肥満に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会 (仙台, オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西 菜々星,三浦 徳,奥江 紗知子,増澤(尾崎) 依,細野 崇,関 泰一郎
2. 発表標題 摂食時間制限が体重増加、脂質代謝、摂食パターンに及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会 (仙台, オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部 真理奈, 渡辺 高大, 三浦 徳, 増澤(尾崎) 依, 細野 崇, 関 泰一郎
2. 発表標題 ガーリック由来香気成分が高脂肪食給餌ラットの脂肪酸合成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会 (仙台, オンライン開催)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学 生物資源科学部 栄養生理化学研究室 ホームページ
<https://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eiyo/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------