

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08585

研究課題名（和文）NAFLDおよび耐糖能異常における肝血管内皮細胞由来分枝アミノ酸の意義

研究課題名（英文）The roles of branched chain amino acids released from liver endothelial cells in NAFLD and glucose intolerance.

研究代表者

宮崎 章（MIYAZAKI, AKIRA）

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70253721

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）：過食によって発症する非アルコール性脂肪性肝障害（NAFLD）は肝硬変や肝がんの誘因となる重要な疾患であるが、生活習慣の改善以外に有効な治療法が確立されていない。本研究は、肝細胞に隣接する肝血管内皮細胞に発現するタンパク分解酵素、カルパインのはたらきにより、分枝アミノ酸が遊離して肝細胞に取り込まれ、脂肪蓄積を促進することを明らかにした。この新知見に基づき、カルパインやそれによって遊離する分枝アミノ酸に由来する一連のシグナルを標的とした新たなNAFLD治療戦略の構築が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝障害（NAFLD）は肝硬変や肝がんの誘因となる重要な疾患であるが、生活習慣の改善以外に有効な治療法が確立されていない。本研究は、肝細胞に隣接する肝血管内皮細胞に発現するタンパク分解酵素、カルパインのはたらきにより、分枝アミノ酸が遊離して肝細胞に取り込まれ、脂肪蓄積を促進することを明らかにした。この新知見に基づき、カルパインやそれによって遊離する分枝アミノ酸に由来する一連のシグナルを標的とした新たな薬剤の開発を目指すNAFLD治療戦略の構築が可能になった。

研究成果の概要（英文）：Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by over eating is an important disease that leads to liver cirrhosis and liver cancer. However, efficient treatment except lifestyle improvement has been established. The current study elucidated that branched chain amino acids released from liver endothelial cells neighboring hepatocytes by the action of calpain protease expressed in liver endothelial cells are taken up by hepatocytes and accelerate lipid accumulation in liver. Base on this novel finding, we propose a novel therapeutic strategy for treatment of NAFLD by targeting calpain and/or a series of signal transduction induced by released branched chain amino acids by calpain action.

研究分野：生化学

キーワード：カルパイン NAFLD 分枝アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝障害(Non-alcoholic fatty liver diseases; NAFLD)は肥満、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病にしばしば合併する。NAFLDは、肝臓の脂肪蓄積に始まり(脂肪肝)一部の症例では非アルコール性脂肪肝炎、肝硬変、肝がんと病態が進展し、命を脅かす病態となる。NAFLDに対する一般的な治療としては、食事療法や運動療法が推奨されるが、未だに発症・進展の鍵を握る特定の分子を標的とした治療法は確立されていない。その背景には、脂肪肝から肝がんに至るNAFLD病態進展の分子機構が明らかになっていないことが挙げられる。NAFLD対策の第一段階として、肝臓における脂肪蓄積の分子機構がさらに解明され、その関連分子を標的とした新たな特異的治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

カルパインはカルシウム依存性の細胞内タンパク質分解酵素であり、物理的ストレス、サイトカイン、成長因子、低酸素などによって活性化される。我々は、動脈硬化病変の血管内皮細胞に発現するカルパインに注目し、酸化LDLやその主要構成リン脂質であるリゾホスファチジルコリンによってカルパインが活性化され、血管内皮細胞間を結合するカドヘリンを部分分解することによって、血管内皮細胞間の乖離を招き、血管の透過性を促進することを明らかにした。(Miyazaki T, *et al. Circulation* 2011;124:2522) また我々は、血管新生におけるカルパインの役割に着目し、カルパインは血管内皮細胞の内因性キナーゼインヒビターである suppressor of cytokine signaling 3 の分解を促進することにより、腫瘍血管や酸素誘発性網膜症の病的血管新生を促進することを明らかにした(Miyazaki T, *et al. Circulation Research* 2015;116:1170)。

カルパインは基質となるタンパク質を1個のアミノ酸まで分解する活性は持たず、より小さなペプチドに限定分解する役割を持つ。この限定分解によって生じたペプチドは、プロテアソームなどの細胞内の他のタンパク質分解システムによって、最終的に遊離アミノ酸まで分解されると考えられる。カルパイン活性化の結果として、遊離アミノ酸が増加する。

糖尿病や肥満の患者では血中の分枝アミノ酸(Branched chain amino acid; BCCA)が増加しているとの報告があるが、その病態生理学的意義は明らかでない。本研究では肝血管内皮細胞に発現するカルパインに注目し、そのタンパク質分解作用によって遊離する、ロイシンやイソロイシンなどの分枝アミノ酸の肝脂肪蓄積に対する効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた in vitro での検討

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)を高グルコースで培養し、カルパインの活性化と培養液中に遊離するアミノ酸を分析した。HUVECをカルシウム不含培地で培養した培養上清を用いてヒト肝細胞癌株であるHepG2細胞をインスリン存在下に培養し、HepG2細胞におけるオレイン酸負荷に伴う脂肪蓄積ならびに脂肪蓄積促進因子であるS6キナーゼのリン酸化に対する効果を検討した。HepG2細胞を、mTORC1(Mammalian target of rapamycin complex 1)の阻害剤ラパマイシンやL型アミノ酸トランスポーター1(LAT1)阻害剤JPH203で処理して、脂肪蓄積に対する効果を検討した。

(2) カルパインノックアウトマウスを用いた in vivo での検討

calpain-s1は、calpain-1、calpain-2に共通の調節性サブユニットであり、calpain-s1をノックアウトすると、calpain-1、calpain-2ともにその活性が喪失する。野生型マウスとcalpain-s1ノックアウトマウスを用いて、高脂肪食負荷による肝臓脂肪蓄積を比較検討した。同時に肝臓に存在するBCAAの含有量を比較した。さらに肝臓の脂肪蓄積因子であるsterol regulatory element binding protein 1(SREBP1)ならびにSREBP1の活性化因子であるS6キナーゼの活性化の相違を検討した。L型アミノ酸トランスポーター1(LAT1)阻害剤JPH203の脂肪蓄積に対する効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた in vitro での検討

HUVECを高グルコースに曝露するとカルパインが活性化され、遊離アミノ酸が増加した。肝細胞内アミノ酸レベルはmTORC1によって検知されS6キナーゼをリン酸化して脂肪新生が促進される。HUVECをアミノ酸不含培地で培養し、カルシウムイオノフォアでカルパインを活性化しアミノ酸遊離を誘導し条件培地とした。条件培地で培養した肝細胞株HepG2細胞をインスリンで刺激したところS6キナーゼのリン酸化を認めたが、アミノ酸不含培地ではリン酸化を認めなかった。条件培地で培養したHepG2細胞にオレイン酸を負荷する

と脂肪滴が形成され、ラパマイシンや JPH203 により、S6 キナーゼのリン酸化や脂肪滴形成が抑制された。

(2) カルパインノックアウトマウスを用いた *in vivo* での検討

野生型マウスに高脂肪食を負荷すると、肝血管内皮細胞の calpain-s1 の発現が誘導され、肝臓の脂肪蓄積を誘導した。calpain-s1 をノックアウトマウスでは、野生型マウスに比し高脂肪食による肝臓の脂肪蓄積が抑制された。calpain-s1 ノックアウトマウスの肝臓の BCAA 含有量は野生型マウスに比し有意に低下していた。野生型マウス由来培養肝血管内皮細胞を高グルコースで刺激するとアミノ酸遊離が増加したが、calpain-s1 ノックアウトマウス由来細胞では全く増加しなかった。高脂肪食を負荷した野生型マウスに JPH203 を投与すると、肝臓の脂肪蓄積が抑制された。高脂肪食を負荷した野生型マウスでは肝臓の SREBP1 ならびに S6 キナーゼが活性化されたが、calpain-s1 ノックアウトマウスでは抑制された。

上記の培養細胞実験ならびにカルパインノックアウトマウスを用いた動物実験により、以下のような脂肪蓄積の分子機構が明らかとなった。高グルコースや脂肪食負荷により、肝血管内皮細胞のカルパインが活性化されて BCAA をはじめとするアミノ酸遊離が増加する。遊離アミノ酸はアミノ酸トランスポーターを介して肝血管内皮細胞に隣接する肝細胞に取り込まれ、肝細胞の mTOR、S6 キナーゼ、SREBP1 が順次活性化し、脂肪蓄積を促進する。

本研究の開始時点では NAFLD の名称が一般的であったが、NAFLD が肥満、糖尿病、脂質異常症などの代謝異常と密接に関連することから、Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) という名称に置換されつつある。MAFLD は、脂肪肝に肥満、2 型糖尿病、もしくは 2 種類以上の代謝異常が併存している場合に診断される。MAFLD の治療戦略としては、食事療法や運動療法などの非特異的なものが主体となっているが、今後本研究で得られた知見を基盤にした特異的な MAFLD の治療戦略が構築されることを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akasu R, Miyazaki T, Elhussiny MZ, Sugiura Y, Tomitsuka Y, Haraguchi S, Otsu K, Chowdhury VS, Miyazaki A.	4. 巻 298
2. 論文標題 Calpain-mediated proteolytic production of free amino acids in vascular endothelial cells augments obesity-induced hepatic steatosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101953	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 Miyazaki T, Taketomi Y, Higashi T, Ohtaki H, Takaki T, Ohnishi K, Hosonuma M, Kono N, Akasu R, Haraguchi S, Kim-Kaneyama JR, Otsu K, Arai H, Murakami M, Miyazaki A.	4. 巻 43
2. 論文標題 Hypercholesterolemic dysregulation of calpain in lymphatic endothelial cells interferes with regulatory T-cell stability and trafficking.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 e66-e82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.122.317781	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 Miyazaki T, Akasu R, Miyazaki A	4. 巻 27
2. 論文標題 Calpain-associated proteolytic regulation of the stromal microenvironment in cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Design	6. 最初と最後の頁 3128-3138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1381612827666210311143053.	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 Miyazaki T, Miyazaki A	4. 巻 8
2. 論文標題 Hypercholesterolemia and lymphatic defects: The chicken or the egg?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 701229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2021.701229.	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮崎拓郎, 赤須理沙子, 宮崎 章
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるcalpain依存的なアミノ酸産生が脂肪肝形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akira Miyazaki
2. 発表標題 Defective intracellular protease systems in atherosclerosis
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------