

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790762

研究課題名（和文）肝硬変で出現する L-シスチン・L-グルタミン酸不均衡が抗原提示細胞に与える影響

研究課題名（英文）The plasma L-Cystine / L-Glutamate imbalance in cirrhosis influences the function of antigen-presenting cell.

研究代表者

嘉数 英二（KAKAZU EIJI）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：20509377

研究成果の概要（和文）：

腎機能は非代償性肝硬変患者の予後を決定する最重要要素である。非代償性肝硬変患者の腎機能低下時に出現する血漿中の L-Cys の増加と L-Glu の低下は輸送体 xCT を介して単球に酸化ストレスを与え、TNF- $\alpha$  をはじめとした炎症性サイトカイン産生を増加させた。本研究結果は肝硬変非代償期の腎機能低下と感染症の病態に関与している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated for the first time that an L-Cys/L-Glu imbalance, especially high levels of L-Cys, increases pro-inflammatory cytokines, especially TNF- $\alpha$  from peripheral CD14+ monocytes under the amino acid condition of advanced cirrhosis in vitro, and these results are consistent with the relationships among plasma L-Cys and TNF- $\alpha$  in patients with advanced cirrhosis. This study may provide a new approach for future studies to ameliorate the immune dysfunction in patients with advanced cirrhosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：血漿アミノ酸不均衡、非代償性肝硬変、単球、腎機能障害、L-シスチン

## 1. 研究開始当初の背景

肝硬変では血漿アミノ酸不均衡が出現する。これまで、その血漿アミノ酸不均衡が免疫細胞、特に樹状細胞の成熟化を抑制する事を明らかにしてきた。（Kakazu E et al : J.Immunol.2007 / Hepatology 2009）しかし、非代償性肝硬変となり腎機能障害が出現した際の血漿中のアミノ酸不均衡についてはこれまで知られておらず、特にその不均衡が免疫細胞に与える影響は知られていない。

## 2. 研究の目的

非代償性肝硬変患者の腎機能と血漿アミノ酸濃度の関係を明らかにするとともに、その不均衡が CD14+（単球）機能に与える影響

を解析した。

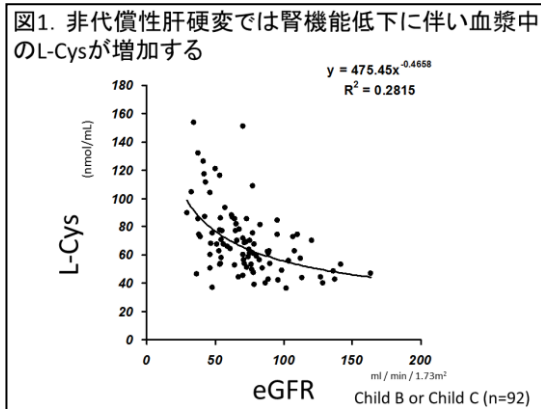
## 3. 研究の方法

肝硬変患者（n=130）の空腹時血漿アミノ酸濃度と血清クレアチニン濃度より算出した eGFR を比較統計した。In vitro の実験として、我々が独自に開発した非代償性肝硬変患者の血漿中アミノ酸濃度に一致した無血清培地（ACM）下で eGFR に関与するアミノ酸に濃度勾配をつけ CD14 陽性単球を LPS 刺激し各種機能を解析した。

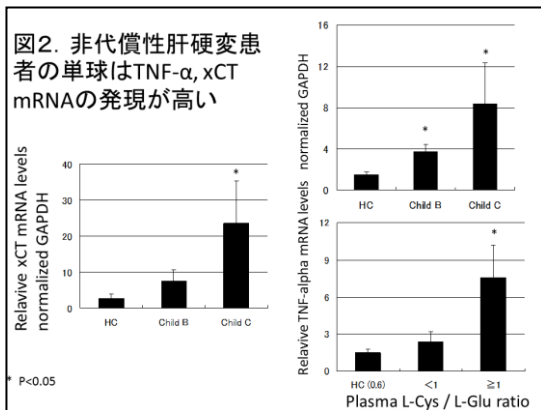
## 4. 研究成果

血漿 L-cystine（L-Cys）は慢性肝炎と比し非代償性肝硬変では有意に増加し、20 種類のア

ミノ酸の中で唯一 eGFR に負の相関を認めた (p=0.00001 / r=0.511) (図1)。また、L-Cys は末梢血単球数 (p=0.000009 / r=0.523)、血漿 TNF- $\alpha$  (p=0.012 / r=0.442) とも有意な正の相関を認めた。末梢血リンパ球には相関を認めなかった。

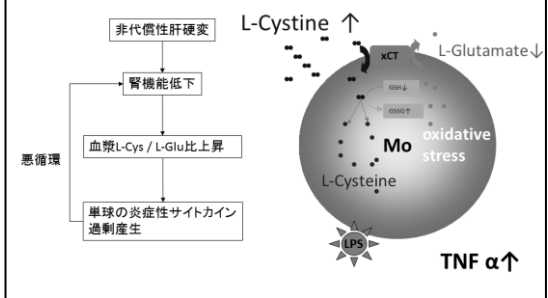


In vitro の結果として ACM 中の L-Cys は単球の増殖能には影響を与えないが濃度依存性に LPS 刺激に対する TNF- $\alpha$ , IL-10 の産生を増加させた。LPS 刺激後の単球は強く L-Cys / l-Glutamate (L-Glu) 交換輸送体 (xCT) を発現し L-Cys 添加 ACM では非添加 ACM と比較して有意に単球細胞内 L-Cys, 細胞外 L-Glu の増加を認めた。更に細胞内の還元型・酸化型グルタチオン比は L-Cys 添加 ACM 下で低下した。非代償性肝硬変に出現する血漿 L-Cys / L-Glu 不均衡は CD14+単球に酸化ストレスを与え TNF- $\alpha$  産生を過剰にした。非代償性肝硬変患者より採取した CD14+単球中の TNF- $\alpha$  および xCT mRNA 発現は有意に健常人よりも高かった。更に、L-Cys / L-Glu ひが高い群で有意に TNF- $\alpha$  mRNA の発現が高値であった (図2)。



これらの結果は非代償性肝硬変患者に出現する腎機能障害の病態を示している可能性がある。(図3)

**図3. 非代償性肝硬変に出現する血漿L-Cys / L-Glu 不均衡はLPS刺激時のCD14+単球からのTNF-alpha産生を過剰にする**



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Kondo, Y., Iwata, T., Haga, T., Kimura, O., Ninomiya, M., Kakazu, E., Kogure, T., Morosawa, T., Aiba, S., and Shimosegawa, T. (2013). Eradication of hepatitis C virus could improve immunological status and pyoderma gangrenosum-like lesions. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. doi: 10.1111/hepr.12102. 査読あり
2. Kondo, Y., Ninomiya, M., Kakazu, E., Kimura, O., and Shimosegawa, T. (2013). Hepatitis B surface antigen could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *ISRN gastroenterology* 2013, 935295. doi: 10.1155/2013/935295. 査読あり
3. Kakazu, E., Kondo, Y., and Shimosegawa, T. (2012). The Relationship between Renal Dysfunction and Abnormalities of the Immune System in Patients with Decompensated Cirrhosis. *ISRN gastroenterology* 2012, 123826. doi: 10.5402/2012/123826. 査読あり
4. Inoue, J., Ueno, Y., Kawamura, K.,

- Yamamoto, T., Mano, Y., Miura, M., Kobayashi, T., Niitsuma, H., Kondo, Y., Kakazu, E., Ninomiya, M., Kimura, O., Obara, N., Kawagishi, N., Kinouchi, Y., and Shimosegawa, T. (2012). Association between S21 substitution in the core protein of hepatitis B virus and fulminant hepatitis. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 55, 147-152. doi: 10.1016/j.jcv.2012.06.011. 査読あり
5. Ninomiya, M., Ueno, Y., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Kondo, Y., Inoue, J., Kakazu, E., Kimura, O., Nakayama, K., and Shimosegawa, T. (2012). Use of illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. *Journal of clinical microbiology* 50, 857-866. doi: 10.1128/JCM.05715-11. 査読あり
  6. Tamai, K., Shiina, M., Tanaka, N., Nakano, T., Yamamoto, A., Kondo, Y., Kakazu, E., Inoue, J., Fukushima, K., Sano, K., Ueno, Y., Shimosegawa, T., and Sugamura, K. (2012). Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology* 422, 377-385. doi: 10.1016/j.virol.2011.11.009. 査読あり
  7. Kondo, Y., Ueno, Y., Ninomiya, M., Tamai, K., Tanaka, Y., Inoue, J., Kakazu, E., Kobayashi, K., Kimura, O., Miura, M., Yamamoto, T., Kobayashi, T., Igarashi, T., and Shimosegawa, T. (2012). Sequential immunological analysis of HBV/HCV co-infected patients during Peg-IFN/RBV therapy. *Journal of gastroenterology* 47, 1323-1335. doi: 10.1007/s00535-012-0596-x. 査読あり
  8. 嘉数英二、近藤泰輝、二宮匡史、木村修、下瀬川徹 非代償性肝硬変における腎機能低下の要因 *消化器内科* 54(3):380-385, 2012 査読なし
  9. Fukushima, K., Ueno, Y., Kawagishi, N., Kondo, Y., Inoue, J., Kakazu, E., Ninomiya, M., Wakui, Y., Saito, N., Satomi, S., and Shimosegawa, T. (2011). The nutritional index 'CONUT' is useful for predicting long-term prognosis of patients with end-stage liver diseases. *The Tohoku journal of experimental medicine* 224, 215-219. doi: 10.1620/tjem.224.215. 査読あり
  10. Inoue, J., Ueno, Y., Wakui, Y., Fukushima, K., Kondo, Y., Kakazu, E., Ninomiya, M., Niitsuma, H., and Shimosegawa, T. (2011). Enhanced replication of hepatitis B virus with frameshift in the precore region found in fulminant hepatitis patients. *The Journal of infectious diseases* 204, 1017-1025. doi: 10.1093/infdis/jir485. 査読あり
  11. Kakazu, E., Ueno, Y., Kondo, Y., Inoue, J., Ninomiya, M., Kimura, O., Wakui, Y., Fukushima, K., Tamai, K., and Shimosegawa, T. (2011). Plasma L-cystine/L-glutamate imbalance increases tumor necrosis factor-alpha from CD14+ circulating monocytes in patients with advanced cirrhosis. *PLoS one* 6, e23402. doi: 10.1371/journal.pone.0023402. 査読あり

- り
12. Kondo, Y., Ueno, Y., Wakui, Y., Ninomiya, M., Kakazu, E., Inoue, J., Kobayashi, K., Obara, N., and Shimosegawa, T. (2011). Rapid reduction of hepatitis C virus-Core protein in the peripheral blood improve the immunological response in chronic hepatitis C patients. Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology 41, 1153-1168. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00878.x. 査読あり

[学会発表] (計4件)

1. EIJI KAKAZU, YOSHIYUKI UENO, YASUTERU KONDO, JUN INOUE, MASASHI NINOMIYA, OSAMU KIMURA, TOORU SHIMOSEGAWA Plasma L-Cystine / L-Glutamate imbalance increases tumor necrosis factor-alpha from circulating monocytes via system Xc- (4F2hc+xCT) in patients with advanced cirrhosis. AASLD 2011/11/7 San Francisco, USA
2. 嘉数英二 上野義之 近藤泰輝 福島耕治 井上 淳 二宮匡史 木村 修 岩崎隆雄 下瀬川徹 非代償性肝硬変に出現する血漿 L-Cystine / L-Glutamate 不均衡は CD14+単球内の還元型グルタチオンを低下させ炎症性サイトカインを増加させる JDDW 2011/10/20 福岡
3. 嘉数英二 上野義之 近藤泰輝 福島耕治 井上淳 二宮匡史 木村修 小原範之 涌井祐太 岩崎隆雄 下瀬川徹 非代償性肝硬変に出現する血漿中 L-Cystine / L-Glutamate 不均衡は交換輸送体 xCT を介して CD14+単球からの炎症性サイトカイン産生を増加させる。第47回日本肝臓学会総会 2011/6/3 東京
4. 嘉数英二 上野義之 近藤泰輝 福島耕治 井上淳 二宮匡史 涌井祐太 岩崎隆雄 下瀬川徹 非代償性肝硬変で出現する L-Cystine / L-Glutamic acid 不均衡は LPS 刺激時の単球からの

TNF- $\alpha$ 産生を高め、腎機能低下に関与する 第97回日本消化器病学会総会 2011/5/15 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
特になし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
嘉数 英二 (KAKAZU EIJI)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：20509377

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：