

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 3 月 31 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790787

 研究課題名（和文）トリプトファンによる肝脂肪化・脂肪肝発症のメカニズムに関する研究
 研究課題名（英文）Role of L-Tryptophan on NAFLD and NASH

研究代表者

大澤 陽介 (OSAWA YOSUKE)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60447787

研究成果の概要(和文):脂肪肝は食事の欧米化、特に動物性脂肪の摂取により増加しているが、同時に摂取される動物性蛋白の与える影響についての研究は少ない。マウスに高脂肪食およびフルクトース含有水を与えることにより肝脂肪化が誘導されるが、トリプトファンを併せて投与したマウスでは肝脂肪化は増悪し、血清 ALT 値上昇、HNE 発現増加、肝線維化の増加が認められた。トリプトファンによる肝脂肪化の増悪はセロトニンへの代謝経路が関与しており、セロトニンによる mTOR 活性増加およびオートファジーの抑制が肝脂肪化増悪のメカニズムである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): Nonalcoholic fatty liver disease is one of the most common liver diseases. L-Tryptophan and its metabolite serotonin are involved in hepatic lipid metabolism and inflammation. However, it is unclear whether L-tryptophan promotes hepatic steatosis. To explore this issue, we examined the role of L-tryptophan in mouse hepatic steatosis by using a high-fat and high-fructose diet (HFHFD) model. L-Tryptophan treatment in combination with a HFHFD exacerbated hepatic steatosis, expression of HNE-modified proteins, hydroxyproline content, and serum ALT levels, whereas L-tryptophan alone did not result in these effects. We also found that L-Tryptophan treatment increases serum serotonin levels. The introduction of adenoviral aromatic amino acid decarboxylase (AADC), which stimulates the serotonin synthesis from L-tryptophan, aggravated hepatic steatosis induced by the HFHFD. The fatty acid-induced accumulation of lipid was further increased by serotonin treatment in cultured hepatocytes. These results suggest that L-tryptophan increases the sensitivity to hepatic steatosis through serotonin production. Furthermore, L-tryptophan treatment, adenoviral AADC introduction, and serotonin treatment induced phosphorylation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and a potent mTOR inhibitor rapamycin attenuated hepatocyte lipid accumulation induced by fatty acid with serotonin. These results suggest the importance of mTOR activation for the exacerbation of hepatic steatosis. In conclusion, L-tryptophan exacerbates hepatic steatosis induced by HFHFD through serotonin-mediated activation of mTOR.

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：脂肪肝、脂肪肝発症、トリプトファン、セロトニン、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

肥満は生活習慣病や悪性疾患などの危険

因子であり、特に内臓脂肪型肥満は高血圧や高血糖などと重積すると動脈硬化性疾患の

発症頻度を高める。非アルコール性脂肪肝は内臓脂肪型肥満の典型的な病態であるが、肝細胞での脂質代謝や糖代謝に異常をきたしインスリン抵抗性を介した全身のエネルギー代謝異常の原因となる。さらにコホート研究の結果、非アルコール性脂肪肝患者は死亡率が高いことが明らかになり (Gastroenterology 129. 113-2, 2005)、メタボリックシンドロームの病態の基盤として着目されている。

肝細胞に過剰の脂肪が蓄積すると脂肪酸の β 酸化により活性酸素の産生が増加し、ミトコンドリアの機能異常を介した肝細胞障害 (肝細胞アポトーシス) を引き起こす (2nd edition of Essentials of Apoptosis (Springer), 547-64, 2009)。肝細胞障害により炎症細胞が活性化されると、さらに肝障害が増悪する脂肪肝炎へ進展するが、これによる慢性肝炎により 15-50%の患者が肝硬変 (Hepatology 37. 1202-19, 2003) や肝細胞癌 (Obes Surg 15. 442-6, 2005) を発症すると報告されている。このため肝臓の脂肪化およびそれによる線維化については、世界的に多くの研究がなされるようになってきた。しかし肥満患者のなかには脂肪肝を伴わず生活習慣病にはなりにくい皮下脂肪型肥満のものも存在しており、栄養過多の状態で脂肪肝をひきおこすメカニズムについて一致した見解は得られていない。さらに非アルコール性脂肪肝患者の全てが脂肪肝炎に進展するわけではなく、どのような患者に炎症が惹起され危険な脂肪肝炎に進展するのか、また脂肪肝炎のうちどのような因子が線維化を伴う肝硬変への進展に関与するのかについても不明な点が多い。これらを明らかにすることができれば、治療法の開発に役立つと考えられる

2. 研究の目的

3 大栄養素のうち炭水化物と脂質はエネルギー源であり、肥満および脂肪肝の原因となる。蛋白質はアミノ酸に分解・吸収され、再度蛋白質に合成され体の構成成分として大部分が利用されるが、一部は生理活性を持った機能性アミノ酸として働く。欧米型の食事は肉類や乳製品の摂取量が多く、動物性脂肪だけでなく動物性蛋白質も多く摂取しているが、トリプトファンは動物性蛋白質に多く含まれているアミノ酸であり、過剰摂取が肝脂肪化の原因になるとの報告が散見される (J. Nurt. 116. 1109-15, 1986 ほか)。本研究の目的は高脂肪・高炭水化物摂食によって誘導される肝細胞の脂肪化および障害・肝線維化におけるトリプトファンの増強効果とそのメカニズムを明らかにし、脂肪化抑制のための予防法と脂肪化改善のための治療法を開発することである。

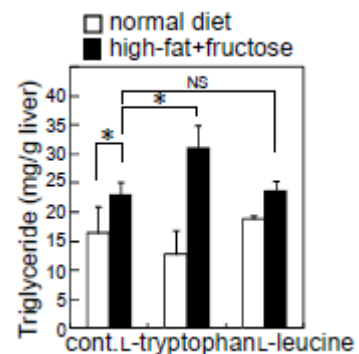
3. 研究の方法

マウスに8週間高脂肪食およびフルクトース含有水を与え、脂肪肝を誘導する。さらにトリプトファンを併せて投与し、以下の項目を検討することにより肝脂肪化にあたる影響を解析した。1. マウス: 体重、血糖測定 2. 代謝産物: トリプトファン、キヌレニン、セロトニン定量 3. 肝障害: 血清ALT値、HE染色 4. 肝脂肪化: Oil red O染色、肝組織中性脂肪測定 5. 肝線維化: sirius red 染色・TGF- β , hydroxyprolin定量 6. 活性酸素: 4-HNE染色と定量 7. 細胞内シグナル伝達: 脂質・糖代謝関連因子 (AKTなど) 8. オートファジー: LC3染色と定量。

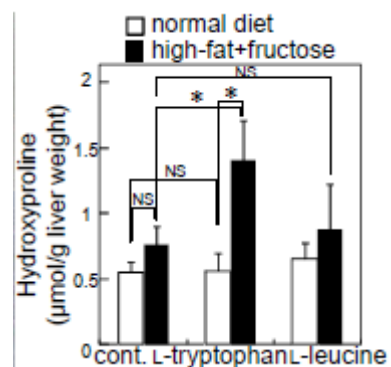
トリプトファンは大きく分けてキヌレニン代謝経路とセロトニン経路により代謝されるが、Indoleamin 2,3-deoxygenase (IDO) と Aromatic amino acid decarboxylase (AAAD) を発現させることにより、どちらの経路が脂肪化を増強するか検討した。

4. 研究成果

脂肪肝モデルにトリプトファンを併せて投与したマウスでは、対照群と比べ肝脂肪化は増悪した (右図)。さらに、肝障害 (血清ALT値上昇) も増悪し、肝組織中の活性酸素の上昇 (HNE発現増加) が認められた。

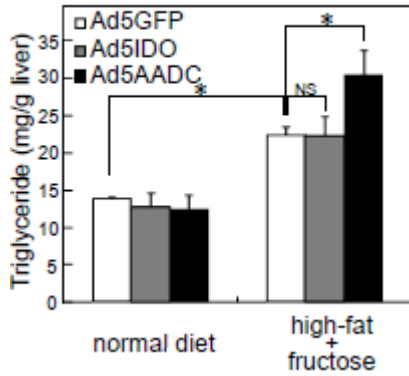


また、高脂肪食およびフルクトースのみでは肝臓に線維化は誘導されなかったが、トリプトファンを併用したマウスでは肝線維化 (ヒドロキシプロリン上昇) が認められた (上図)。

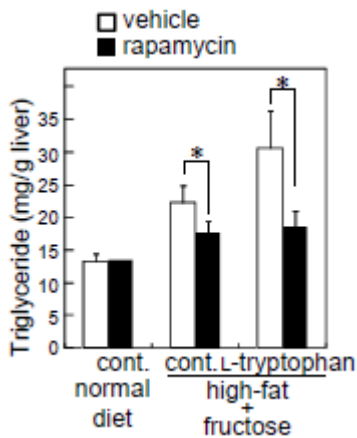


IDOおよびAADCの過剰発現 (アデノウイルスベクター使用) は、それぞれの代謝産物であるキヌレニンおよびセロトニンの血中濃度を上昇させたが、肝脂肪化の増悪効果はAADCの過剰発現にのみ認められた (次ページ図)。さらに、初代培養肝細胞に脂肪酸を添加して

誘導される細胞内中性脂肪の蓄積はセロトニンの併用により、さらに増加した。トリプトファン投与により、肝組織中の



mTORのリン酸化は増加した。また、セロトニン添加によりmTOR活性化が認められた。これらトリプトファン投与やセロトニン投与による肝組織(左図)あるいは肝細胞の



肝細胞のmTOR活性化および中性脂肪増加は、mTOR阻害剤であるラパマイシンにより抑制された。

マウスを絶食状態にすると、肝組織にLC3凝集が認められ、またp62の分解が認められた。このことから肝臓にオートファジーが誘導されていることが示唆される。トリプトファンは絶食によるLC3凝集とp62分解を抑制したが、その効果はラパマイシンにより減弱した。このことからトリプトファンは肝細胞のオートファジーをmTOR依存性に抑制し、オートファジーの抑制が肝脂肪化増悪のメカニズムである可能性が示唆された。

結論：トリプトファンは肝脂肪化を増悪する。

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 8 件)

1. Osawa Y, Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Seishima M, Kozawa O.: Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer. *J Clin Invest.* 123, 834-843, 2013. 査読あり
2. Mizutani N, Ito H, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Nishida Y, Takagi A,

Kojima T, Suzuki M, Osawa Y, Ohnishi K, Daibata M, Murate T.: Involvement of KRAS G12A mutation in the IL-2-independent growth of a human T-LGL leukemia cell line, PLT-2. *Nagoya J Med Sci.* 74, 261-271, 2012. 査読あり

3. Hoshi M, Matsumoto K, Ito H, Ohtaki H, Arioka Y, Osawa Y, Yamamoto Y, Matsunami H, Hara A, Seishima M, Saito K.: L-Tryptophan-kynurenine pathway metabolites regulate type I IFNs of acute viral myocarditis in mice. *J Immunol.* 188, 3980-3987, 2012. 査読あり
 4. Ohtaki H, Ito H, Hoshi M, Osawa Y, Takamatsu M, Hara A, Ishikawa T, Moriwaki H, Saito K, Seishima M.: High susceptibility to lipopolysaccharide-induced lethal shock in encephalomyocarditis virus-infected mice. *Sci Rep.* 2, 367, 2012. 査読あり
 5. Suetsugu A, Hassanein MK, Reynoso J, Osawa Y, Nagaki M, Moriwaki H, Saji S, Bouvet M, Hoffman RM.: The cyan fluorescent protein nude mouse as a host for multicolor-coded imaging models of primary and metastatic tumor microenvironments. *Anticancer Res.* 32, 31-38, 2012. 査読あり
 6. Osawa Y, Kanamori H, Seki E, Hoshi M, Ohtaki H, Yasuda Y, Ito H, Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, Saito K, Seishima M.: L-Tryptophan-mediated enhancement of susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease is dependent on the mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem.* 286, 34800-34808, 2011. 査読あり
 7. Osawa Y, Seki E, Kodama Y, Suetsugu A, Miura K, Adachi M, Ito H, Shiratori Y, Banno Y, Olefsky JM, Nagaki M, Moriwaki H, Brenner DA, Seishima M.: Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. *FASEB J.* 25, 1133-1144, 2011. 査読あり
 8. Suetsugu A, Osawa Y, Nagaki M, Saji S, Moriwaki H, Bouvet M, Hoffman RM.: Imaging the recruitment of cancer-associated fibroblasts by liver-metastatic colon cancer. *J Cell Biochem.* 112, 949-953, 2011. 査読あり
- [学会発表] (計 14 件)
1. Osawa Y, Yasuda Y, Suetsugu A, Moriwaki H, Kozawa O.: L-Tryptophan-mediated enhancement of susceptibility to NAFLD in dependent on the mTOR. *Asian Pacific Digestive Week (APDW2012).* Bangkok

- Thailand, 2012.12.7
2. 大澤陽介 森脇久隆: ワークショップ「病態栄養からみた肝・胆・膵疾患—治療への応用—」非アルコール性肝脂肪化におけるトリプトファンの影響. 第16回日本肝臓学会大会, 神戸, 2012.10.10
 3. 大澤陽介 森脇久隆 清島満: ワークショップ 8「NASH/NAFLD から進展する肝硬変・肝癌の現状と対応」非アルコール性肝脂肪化におけるトリプトファンの影響. 第48回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012.6.7
 4. Osawa Y: Symposium“Liver Fibrosis, Mechanism and Non-invasive Diagnosis” Kupffer cells and fibrosis in cholestatic liver injury in mice. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2012. Taipei. Taiwan, 2012.2.18
 5. 大澤陽介 森脇久隆 清島満: シンポジウム「代謝性・遺伝性肝疾患研究の進歩」肝臓の糖・脂質代謝における酸性スフィンゴリエリナーゼの役割. 第15回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011.10.21
 6. 大澤陽介 末次淳 永木正仁 森脇久隆 清島満: 肝糖・脂質代謝における酸性スフィンゴリエリナーゼの役割. 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011. 6.1
 7. Osawa Y, Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, Seishima M: Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes. Digestive Disease Week (DDW) 2011.Chicago USA, 2011.5.10
 8. Osawa Y, Nagaki M, Yasuda Y, Moriwaki H, Seishima M: Roles of acid sphingomyelinase on glucose and lipid metabolism in hepatocytes. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2011. Bangkok. Thailand, 2011.2.19

〔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

6. 研究組織
 (1)研究代表者
 大澤 陽介 (OSAWA YOSUKE)
 岐阜大学・医学系研究科・講師
 研究者番号: 60447787

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号: