

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460998

研究課題名(和文) NASHにおけるアミノ酸代謝と肝脂肪改善及び進展抑制のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of amino acid metabolism, alleviation and prevention of hepatic steatosis

研究代表者

本多 隆 (Takashi, Honda)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10378052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に対する治療は、現時点で確立された治療法がないのが現状である。分岐鎖アミノ酸(BCAA)は肝硬変患者の治療に使用されており、BCAAのNASHに対する効果を解明するため、NASHをおこすコリン欠乏高脂肪食投与マウスにおいてBCAAの効果を調べた。

BCAA投与により血清ALT値及び肝TG値が有意に低下した。脂肪酸合成の律速酵素であるFAS遺伝子の発現及び蛋白量はBCAA投与により有意に低下していた。このことからBCAA投与はFASの遺伝子発現と蛋白レベルを低下させてNASHに関連する肝脂肪と肝障害を改善する可能性があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：At present, there is no established treatment for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Branched-chain amino acids (BCAAs) have been used to treat patients with decompensated cirrhosis.

In order to elucidate the mechanisms responsible for the effects of BCAAs on hepatic steatosis and disease progression, we investigated the effects of BCAA supplementation in mice fed a choline-deficient high-fat diet (CDHF), which induces NASH.

Serum ALT levels and hepatic TG were significantly lower in CDHF-BCAA than in CDHF-control. Gene expression and protein level of fatty acid synthase (FAS), which catalyzes the final step in fatty acid biosynthesis, was significantly decreased in CDHF-BCAA than in CDHF-control. BCAA can alleviate hepatic steatosis and liver injury associated with NASH by suppressing FAS gene expression and protein levels.

研究分野：肝臓学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 分岐鎖アミノ酸 脂肪肝 コリン欠乏

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化に伴い日本でも肥満者が増加している。飲酒歴がなく、原因の明らかな肝疾患を除外した肝臓への脂肪沈着を認める肝疾患の総称を非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) と呼ぶ。糖尿病患者において脂肪肝のある場合にはそうでない場合と比較して脳、心血管障害のリスクが高まることが言われている (Targher et al. Diabetes Care 2007)。脂肪肝に高血圧、高脂血症、糖尿病、鉄過剰、エンドトキシンなどのマルチプルファクターが加わることで NASH に進展する。NASH の状態で肝障害が持続するとウイルス性肝炎のように肝硬変に進展し発癌する (Jonathan et al. Science 2011)。NASH に対する治療は原因となっている因子に対する治療が重要とされているが、他に確立された治療法がないのが現状である。

分岐鎖アミノ酸 (BCAA) は、mTOR キナーゼを活性化することによりタンパク質合成促進とその分解抑制によりタンパク質代謝を調節する作用を持つことが明らかにされた (Kimball et al. Am J Clin Nutr. 2006)。BCAA は肝硬変患者の低アルブミン血症治療薬として使用されているが、耐糖能の改善 (Kadota, Shimomura et al. JPEN. 2012) や肝臓等組織の脂質代謝改善 (Arakawa et al. Endocr J. 2011) 等の作用を持つことも報告されている。さらに肥満のある肝硬変患者の肝癌発症は BCAA 治療により有意に減少することも報告された (Muto et al. Hepatol Res. 2006)。

これらの事実より、BCAA 投与により NASH の病態が改善できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

マウス NASH モデルにおいて BCAA 代謝を中心に脂質、糖質の代謝など網羅的に解析し、

BCAA による NASH 進展抑制効果を検証すると同時にそのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1

8 週齢の C57BL/6J(B6) マウスを (1) コリンを補充したコリン補充高脂肪食 (HF) (HF-control)、(2) 高脂肪食と 2%BCAA の給水 (HF-BCAA)、(3) コリン欠乏高脂肪食 (CDHF-control)、(4) CDHF と 2%BCAA の給水 (CDHF-BCAA) の 4 群に分けて 8 週給餌した。肝組織、血液を採取し血清 ALT 値、血清 TG、肝組織中の TG 値、コレステロール、フリーコレステロール値などを測定した。肝組織中の脂肪滴の面積をイメージ解析ソフトにより定量化した。また肝臓における脂肪酸代謝に関する遺伝子発現について各群で比較検討した。関連のある遺伝子に関してウエスタンブロッティングにより蛋白定量をおこなった。

実験 2

8 週齢の C57BL/6J(B6) マウスに (1) コリンを補充したコリン補充高脂肪食を 8 週投与 (HF8)、(2) コリン欠乏高脂肪食を 4 週投与 (CDHF4)、(3) コリン欠乏高脂肪食を 8 週投与 (CDHF8) (4) CDHF と 2%BCAA の給水を 8 週投与 (CDHF8-BCAA) した。

肝組織、血液を採取し血糖値、血清 BCAA 濃度、肝組織を用いメタボローム解析により各種代謝産物を測定した。

4. 研究成果

実験 1

CDHF-control 群では HF-control 群と比較して肝 TG 値、血清 AST、ALT と血清 TG の有意な上昇が見られた。肝組織では CDHF-control 群では HF-control 群と比較し

て炎症細胞浸潤、肝細胞周囲の線維化がみられ NAFLD activity score は 5.8 ± 0.2 、Fibrosis staging は 2 と NASH の所見を呈していた (図 1)。

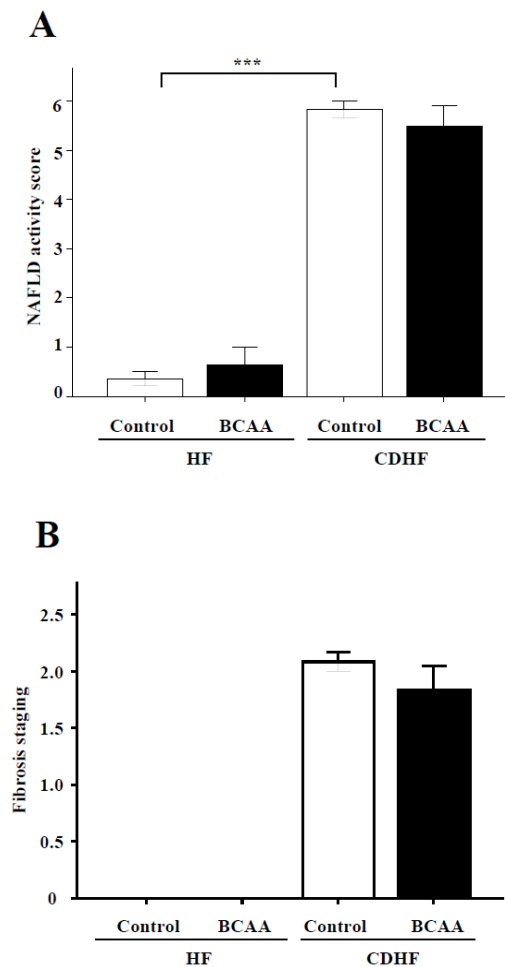


図 1. 各群における NAFLD activity score と Fibrosis staging

CDHF-control 群では HF-control 群と比較して有意に肝 TG が有意に上昇し、脂肪滴の面積も有意に上昇した。BCAA を投与した CDHF-BCAA 群では CDHF-control 群と比較して肝 TG 値が有意に低下し、脂肪滴の面積も有意に低下していた (図 2)。

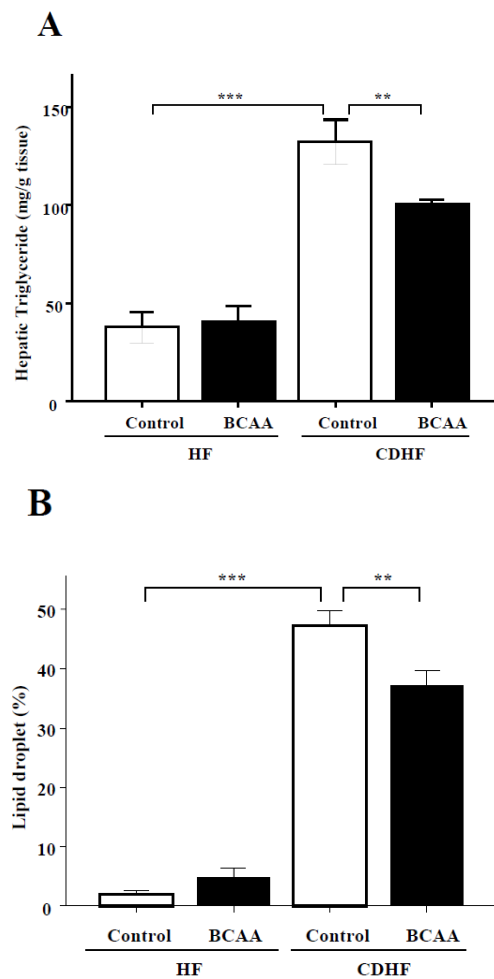


図 2. 各群における肝 TG と脂肪滴の面積

脂肪酸合成の律速酵素である FAS 遺伝子の発現は CDHF-control 群では HF-control 群と比較して有意に増加し、CDHF-BCAA 群では CDHF-control 群と比較して有意に低下していた。また FAS 蛋白は CDHF-BCAA 群で CDHF-control 群と比較して有意に低下した (図 3.)

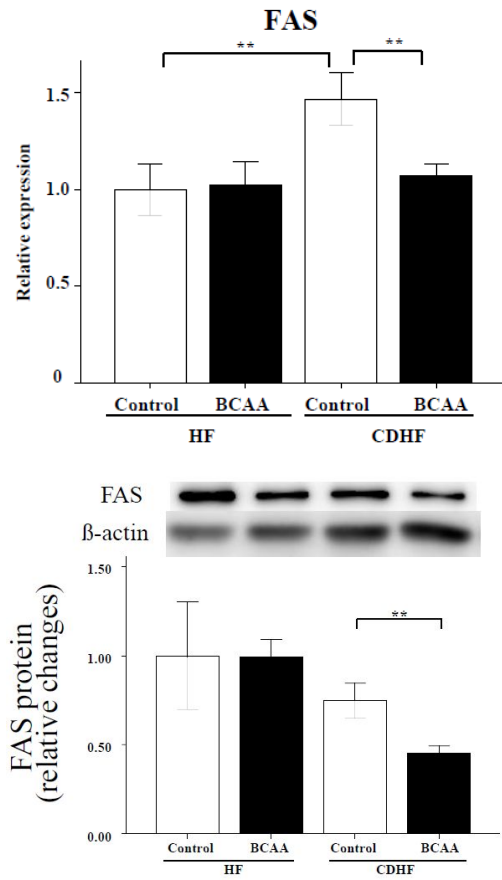


図3. 各群における FAS 遺伝子発現と FAS 蛋白

コレステロール合成の上流の Srebf2 遺伝子の発現は CDHF-BCAA 群で CDHF-control 群と比較して有意に低下していたことから、BCAA 投与は Srebf2 遺伝子発現に作用し、FAS 遺伝子と蛋白の抑制を介して肝 TG を減少させていると思われた (図4.)

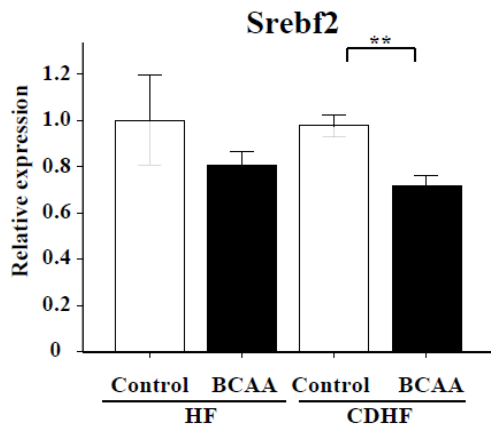


図4. 各群における Srebf2 遺伝子の発現

更に BCAA は肝コレステロール及び NASH の病因に起因していると報告されている肝フリーコレステロールを減らしていた (図5.)

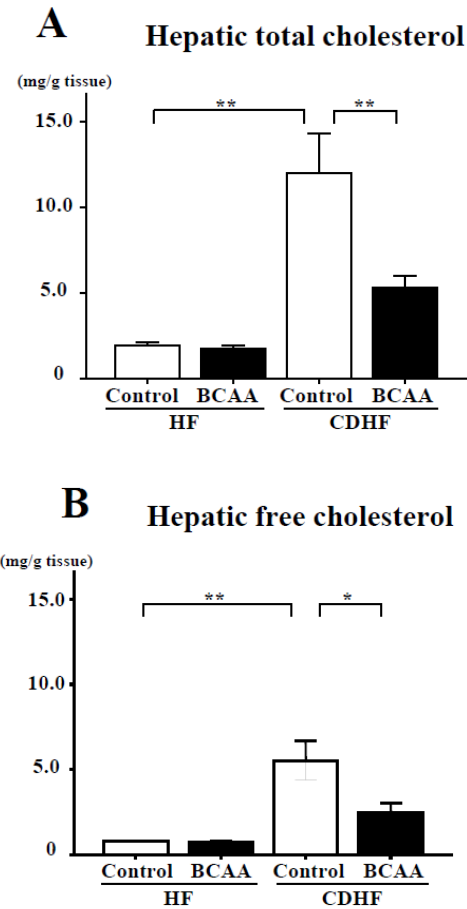


図5. 各群における肝コレステロールと肝フリーコレステロール

このことから経口 BCAA の投与は FAS の遺伝子発現と蛋白レベルを低下させて NASH に関連する肝脂肪と肝障害を改善する可能性があり、特に高脂肪を摂取する場合には NASH の治療として有用である可能性があると思われた。

実験 2

CDHF4 群及び 8 群で HF8 群と比較して血糖は有意に低値で、PDK4 の遺伝子発現は有意に高値であった。メタボローム解析で CDHF8 群は HF8 群及び CDHF4 群と比較して 3-Phosphoglyceric acid, Phosphoenolpyruvic acid, Acetyl CoA にお

いて低値であったが、CDHF8+BCAA 群で上昇していた。すなわち CDHF4 群、8 群では解糖/糖新生系代謝は低下していたが、BCAA 投与により増加しており、NASH において解糖/糖新生系代謝は低下し、BCAA 投与により改善することが推察された。

血清 BCAA 濃度において Leucine 濃度は CDHF8 群で HF8 群より高い傾向がみられた。

BCAA 代謝の律速酵素である BCKDH の遺伝子発現は CDHF8 群で HF8 群より有意に低値であり、その kinase である BCKDHkinase は高い傾向があった。すなわち CDHF4 群、8 群では BCAA 代謝は低下しており、NASH において BCAA の代謝は低下していることが推察された。

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3件)

Honda T, Ishigami M, Luo F, Lingyun M, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K, Nakano I, Ishikawa T, Feng GG, Katano Y, Kohama T, Kitaura Y, Shimomura Y, Goto H, Hirooka Y, *Metabolism*, 査読有, 69, 2017, 177-187

DOI:10.1016/j.metabol.2016.12.013.

Achiwa K, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Hirooka Y, Katano Y, Goto H.

DSS colitis promotes tumorigenesis and fibrogenesis in a choline-deficient high-fat diet-induced NASH mouse model, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 470(1), 2016, 15-21

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.12.012.

Luo F, Ishigami M, Achiwa K, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Ishikawa T, Katano Y, Goto H. Raloxifene Ameliorates Liver Fibrosis of Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by Choline-Deficient High-Fat Diet in

Ovariectomized Mice, *Dig Dis Sci*, 査読有, 60(9), 2015, 2730-2739

DOI: 10.1007/s10620-015-3660-6.

[学会発表](計10件)

本多 隆, 石上雅敏, 安田 諭, 伊藤隆徳, 野村 彩, 加藤幸一郎, 新家卓郎, 石津洋二, 葛谷貞二, 林 和彦, 廣岡芳樹, 後藤秀実, コリン欠乏高脂肪食による MASH マウスモデルにおける分岐鎖アミノ酸投与による糖質、アミノ酸代謝の変化、第3回肝臓と糖尿病・代謝研究会、2016-07-16、石川県立音楽堂邦楽ホール・交流ホール (石川県金沢市)

Achiwa K, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Hirooka Y, Goto H, DSS colitis has tumorigenesis and fibrogenesis in choline-deficiency and high-fat diet induced NASH mouse model, AASLD2015, 2015-11-15, San Francisco (USA)

本多 隆, 石上雅敏, 安田 諭, 川口 彩, 加藤幸一郎, 新家卓郎, 今井則博, 阿知波宏一, Luo Fangqiong, 山田恵一, 石津洋二, 葛谷貞二, 林 和彦, 中野 功, 石川哲也, 後藤秀実, コリン欠乏高脂肪食による NASH マウスモデルにおける高血糖を伴わない脂質、分岐鎖アミノ酸代謝の検討、第2回肝臓と糖尿病・代謝研究会、2015-05-23、シーモールパレス(山口県下関市)

Honda T, Ishigami M, Luo F, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K, Shimomura Y, Goto H, Oral supplementation of BCAA alleviates steatosis and liver injury associated with NASH, AASLD2014, 2014-11-09, Boston (USA)

Luo F, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Goto H, Effects of the Selective Estrogen Receptor Modulator, Raloxifene, on

Nonalcoholic Steatohepatitis,
AASLD2014, 2014-11-09, Boston (USA)
阿知波宏一、本多 隆、F.Luo、加藤幸一
郎、新家卓郎、今井則博、荒川恭宏、山
田恵一、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、
石上雅敏、石川哲也、後藤秀実、マウス
NASH モデルに対して DSS 投与による線維
化と発癌モデルの試み、第 18 回日本肝臓
学会大会 (JDDW2014)、2014-10-23、神戸
国際展示場(兵庫県神戸市中央区)
F.Luo、加藤幸一郎、新家卓郎、今井則博、
阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、石津
洋二、葛谷貞二、本多 隆、林 和彦、
石上雅敏、石川哲也、後藤秀実、コリン
欠乏と閉経及び Raloxifene による NASH
進展への影響、第 18 回日本肝臓学会大会
(JDDW2014)、2014-10-23、神戸国際展示
場(兵庫県神戸市)
Achiwa K, Ishigami M, Katoh K, Ninomi
T, Imai N, Luo F, Yamada K, Arakawa T,
Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K,
Hirooka Y, Goto H, Administration of
DSS induced tumorigenesis and fibrosis
in NASH mouse model, TAIWAN DIGESTIVE
DISEASE WEEK(TDDW), 2014-10-04,
Kaohsiung (Taiwan)
Fangqiong LUO、石上雅敏、新家卓郎、今
井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵
一、中野 聡、石津洋二、葛谷貞二、本多
隆、林 和彦、中野 功、石川哲也、後
藤秀実、卵巣提出 NASH マウスに対する
Raloxifene の効果、第 50 回肝臓学会総
会、2014-05-30、ホテルニューオータニ
(東京都千代田区)
本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則
博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、
中野 聡、石津洋二、葛谷貞二、林 和
彦、石川哲也、中野 功、後藤秀実、分
岐鎖アミノ酸による NASH マウスモデル
における肝脂肪抑制効果、第 100 回日本

消化器病学会総会、2014-04-26、東京国
際フォーラム(東京都千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 隆 (HONDA, Takashi)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10378052

(2) 研究分担者

後藤 秀実 (GOTO, Hidemi)
名古屋大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10215501

石上 雅敏 (ISHIGAMI, Masatoshi)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90378042

(3) 連携研究者

下村 吉治 (SHIMOMURA Yoshiharu)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：30162738

(4) 研究協力者

馮 国剛 (Feng, g.g)
愛知医科大学・薬理学・講師
研究者番号：70351111