

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00849

研究課題名(和文) 低栄養性脂肪肝の治療と予防を目的とした新しい血液マーカーの開発と臨床応用

研究課題名(英文) Serum metabolomics analysis of patients with fatty liver due to undernutrition

研究代表者

岩本 淳一 (Iwamoto, Junichi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10384950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低栄養性脂肪肝の病態生理を明らかにするために、LC-MS/MSを用いた患者血清のメタボローム解析方法を開発した。それを用いて、しばしば低栄養性脂肪肝を合併するクローン病とシトリン欠損症の患者血清を分析した。クローン病ではLXRの活性化とFXRの不活性化により脂肪酸の合成亢進と酸化抑制が認められ、シトリン欠損症ではクエン酸の過剰供給による脂肪酸合成の亢進が観察された。以上のように、原因不明の脂肪肝の病態解明には、血液中代謝物のメタボローム解析が有効であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To study the pathophysiology of fatty liver due to undernutrition, new LC-MS/MS methods were developed for metabolomics analysis of patients' serum. By use of the methods, we analyzed serum from Crohn's disease and citrin deficiency that are often accompanied by fatty liver due to undernutrition. Activation of LXR and deactivation of FXR were detected in Crohn's disease while stimulation of fatty acid biosynthesis by oversupply of citrate was observed in citrin deficiency. Thus, serum metabolomics analysis is a useful method to explore the mechanism of fatty liver due to unknown origin.

研究分野：消化器内科

キーワード：低栄養性脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、我が国でも肝硬変・肝癌の原因として、脂肪肝の重症型である非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の症例が予想外に多いことが明らかになった。また脂肪肝は、ウイルス性肝炎治療後の肝発癌の危険因子であることも明らかにされた。脂肪肝の3大原因は肥満、糖尿病、アルコールであるため、一般的に脂肪肝の予防と治療には、減量や禁酒が最も有効であると考えられている。

(2)ところが、脂肪肝の中に上記3大原因によらないものが存在する。その代表的なもの1つが低栄養による脂肪肝である。消耗性疾患に伴うもののほか、最近では極端な偏食ダイエットが原因の症例も増えつつある。また、脂肪肝のない低栄養患者に対する誤った栄養療法によって脂肪肝が発生してしまう例もしばしば認められる。このように脂肪肝の病態は複雑であり、低栄養性脂肪肝の場合には、一般的な脂肪肝で行われる減量と禁酒のような画一的な栄養指導では不十分である。

(3) 肥満、糖尿病、アルコールの3大原因によらない脂肪肝の予防や治療を適切に行うためには、まず症例ごとの病態を鑑別する必要がある。我々は、これまで行ってきた脂質の消化・吸収・代謝に関する基礎研究を通じて、従来の血液マーカーに新しい代謝マーカーを加えることにより、低栄養性脂肪肝の病態把握が可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は低栄養時の脂肪肝に着目し、病態把握のための新しい血液マーカーの開発と、それを用いた発症メカニズムの解明および臨床への応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝の栄養代謝に關与する血清マーカーの開発

表1 血清バイオマーカー候補の化合物とその測定意義

測定意義	血清マーカー化合物
蛋白合成	トランスサイレチン
蛋白異化	3-メチルヒスチジン
アミノ酸異化	3-ヒドロキシイソ酪酸
VLDL分泌	中性脂肪, VLDL
脂肪酸流入	遊離脂肪酸
脂肪酸合成	マロン酸
カルニチン欠乏	カルニチン
脂肪酸β酸化(肝臓)	3-ヒドロキシ酪酸
脂肪酸β酸化(筋肉)	アセチルカルニチン
コリン欠乏	コリン
リン脂質合成	フォスファチジルコリン
コレステロール合成	ラソステロール
コレステロール吸収	システロール
LXRα活性化	酸化ステロール
FXR活性化	7αヒドロキシ-4-エン-3-オン
リンゴ酸-クエン酸シャトル	リンゴ酸, クエン酸

肝の栄養代謝に關する血清マーカーとしては、表1に示すマーカー化合物を含む類似化合物を分析対象とした。既に分析方法が報告されているものは既報を参照し、報告のないものは、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー(LC-MS/MS)を用いて、分析方法の開発から行った(図1)。

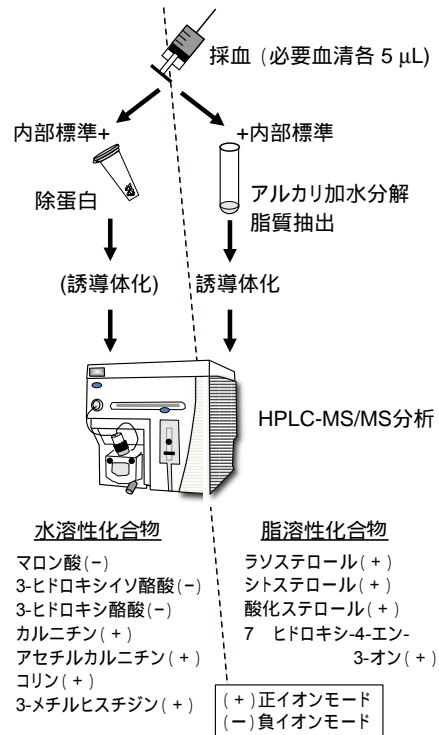


図1 代謝マーカー分析方法の開発

(2) 低栄養性脂肪肝患者の病態解析

消化吸収障害によって脂肪肝を引き起こすクローン病と、ミトコンドリアのエネルギー代謝障害によって脂肪肝を引き起こすシトリン欠損症の2疾患について、患者血清を収集し、肝の栄養代謝マーカーを分析・解析した。

(3) 脂肪肝モデル細胞の作成と治療の試み

マウスのAML12培養肝細胞に核内レセプターLiver X receptor (LXR)のリガンドを添加し、脂肪酸合成を亢進させることによって脂肪肝モデル肝細胞を作成した。また、このモデルを用いて、上記(2)で明らかになった病態の鍵となる化合物が脂肪蓄積に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝の栄養代謝に關与する血清マーカーの開発

まず最初に、アミノ酸(バリン)の異化マーカーである3-ヒドロキシイソ酪酸、同じくアミノ酸(ロイシン)の異化マーカーである3-ヒドロキシメチル酪酸、脂肪酸合成のマーカーであるマロン酸、肝臓での脂肪酸酸化(異化)のマーカーである3-ヒドロキシ酪酸の分析方法を開発した。アセトニトリルによる除蛋白によって、簡単にLC-MS/MS分析の前処理を行うことができたが、これらの物質

をピコリン酸で誘導体化して LC-MS/MS で分析することにより、分析感度が著明に上昇し、血清のみならず、唾液での定量も可能になった。血清中と唾液中のこれらの物質の濃度には、有意な正の相関を認めたことから、将来的には血液ではなく唾液を用いた代謝評価の可能性が示唆された。

次に、コリン代謝、カルニチン代謝、解糖系と TCA サイクルに関連するマーカー候補化合物の分析方法を開発した。具体的には、血清にアセトニトリルを添加して除蛋白したサンプルを使って、コリン、ベタイン、カルニチン、アセチルカルニチン、パルミトイルカルニチン、ピルビン酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸、コハク酸などを、LC-MS/MS で分析する方法を開発した。

(2) 低栄養性脂肪肝患者の病態解析

消化吸收障害によって脂肪肝を引き起こすクローン病と、ミトコンドリアのエネルギー代謝障害によって脂肪肝を引き起こすシトリン欠損症について、詳細な検討を行った。その結果、クローン病の血清では、核内レセプター LXR のリガンドとなる酸化ステロールが有意に増加し、脂肪酸合成促進に働いているものと考えられた。また、FGF19 の低下と 7-ヒドロキシ-4-エン-3-オン (C4) の上昇より、胆汁酸レセプターの FXR は不活性化されているものと考えられ、それによって脂肪酸の合成促進と異化 (酸化) の低下が助長されているものと推測された (図 2)。

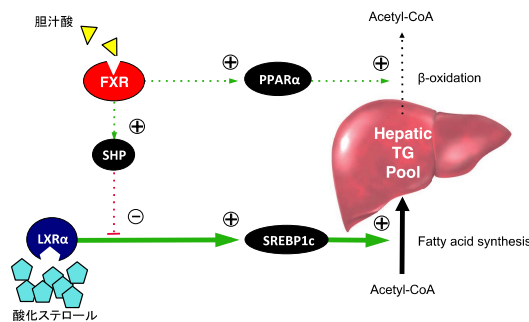


図2 クローン病における脂肪酸の合成と分解

一方、シトリン欠損症では、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの障害により細胞質の NAD⁺ とミトコンドリアの ATP が枯渇状態となり、それらを補うために糖質利用は制限され、脂質とアミノ酸に依存した状態となっていると考えられている。血中クエン酸の増加とリンゴ酸の減少を認めたことから、リンゴ酸-クエン酸シャトルがフル回転し、ミトコンドリア外に出たクエン酸が脂肪酸合成に利用されて脂肪肝を促進しているものと考えられた。

(3) 脂肪肝モデル細胞の作成と治療の試み

マウスの AML12 培養肝細胞に LXR のリガンドである酸化ステロールを添加し、脂肪肝モデル肝細胞を作成した。また、このモデルに FXR のリガンドである胆汁酸を投与し、脂肪蓄積が減少することを確認した (図 3)。

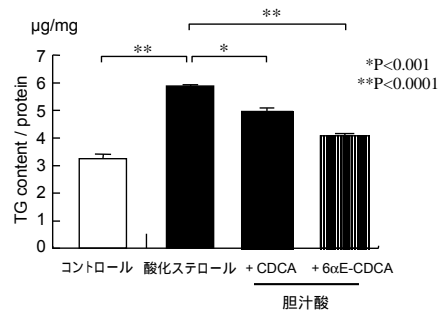


図3 AML12細胞への中性脂肪蓄積に対する胆汁酸の影響

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5件)

- Murakami M, Iwamoto J, Honda A, Tsuji T, Tamamushi M, Ueda H, Monma T, Konishi N, Yara S, Hirayama T, Miyazaki T, Saito Y, Ikegami T, Matsuzaki Y. Detection of gut dysbiosis due to reduced *Clostridium* subcluster XIVa using the fecal or serum bile acid profile. 査読有, Inflamm Bowel Dis 2018 [Epub ahead of print] DOI:10.1093/ibd/izy022.
- Miyazaki T, Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Morioka I, Tsukahara H, Kaji S, Hirayama S, Miida T, Kondou H, Ihara K, Yagi M, Kizaki Z, Bessho K, Kodama T, Iijima K, Yorifuji T, Matsuzaki Y, Honda A. Serum amino acid profiling in citrin-deficient children exhibiting normal liver function during the apparently healthy period. 査読有, JIMD Rep 2018 [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/8904_2018_99.
- Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Nakacho M, Morioka I, Tsukahara H, Kaji S, Hirayama S, Miida T, Kondou H, Ihara H, Yagi M, Kizaki Z, Bessho K, Kodama T, Iijima K, Saheki T, Yorifuji T, Honda A. Circulating tricarboxylic acid cycle metabolite levels in citrin-deficient children with metabolic adaptation, with and without sodium pyruvate treatment. 査読有, Mol Genet Metab 2017; 120: 207-212. DOI:10.1016/j.ymgme.2016.12.011.
- Miyamoto Y, Miyazaki T, Honda A, Shimohata H, Hirayama K, Kobayashi M. Retention of acetylcarnitine in chronic kidney disease causes insulin resistance in skeletal muscle. 査読有, J Clin Biochem Nutr 2016; 59: 199-206. DOI:10.3164/jcbn.15-146.
- Miyazaki T, Honda A, Ikegami T,

Iwamoto J, Monma T, Hirayama T, Saito Y, Yamashita K, Matsuzaki Y. Simultaneous quantification of salivary hydroxybutyrates as possible markers of amino acid and fatty acid catabolic pathways by LC-ESI-MS/MS. 査読有, Springerplus 2015; 4: 494. DOI:10.1186/s40064-015-1304-0. eCollection 2015.

〔学会発表〕(計7件)

東村泰希, 内藤裕二, 井上 亮, 馬場保徳, 水島かつら, 大野木宏, 本多 彰, 松崎靖司, 吉川敏一. 茶カテキン摂取による脂肪肝抑制作用と腸内細菌叢の関与. 第69回日本ビタミン学会大会, 横浜 6/9, 2017.

本多 彰, 池上 正, 宮崎照雄, 松崎靖司. 肝臓内脂質代謝の老化とアンチエイジング. 第17回日本抗加齢医学会総会(シンポジウム), 東京 6/4, 2017.

Murakami M, Iwamoto J, Miyazaki T, Monma T, Shoichiro Y, Ikegami T, Matsuzaki Y, Honda A. Detection of gut dysbiosis due to reduced *Clostridium* subcluster XIVa based on the serum bile acid profile. Digestive Disease Week 2017. Chicago, USA, 5/7, 2017.

屋良昭一郎, 池上 正, 本多 彰, 岩本淳一, 宮崎照雄, 松崎靖司. 脂肪性肝炎進展過程における酸化ステロールの質的变化. 第20回日本肝臓学会大会, 神戸 11/3, 2016.

宮崎照雄, 本多 彰, 松崎靖司. 核内受容体を介した胆汁酸の脂質代謝制御による脂肪肝改善作用. 第52回日本肝臓学会総会(ワークショップ), 千葉 5/19, 2016.

Yara S, Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Monma T, Murakami M, Konishi N, Iwamoto J, Saito Y, Matsuzaki Y. Dysregulation of hepatic 27-hydroxycholesterol in steatohepatitis model mice with hyperglycemia. 25th Conference of the APASL, Tokyo, Japan 2/23, 2016.

宮崎照雄, 本多 彰, 松崎靖司. 肝代謝代償能を評価する骨格筋分岐鎖アミノ酸異化バイオマーカー. 第51回日本肝臓学会総会(ワークショップ), 熊本 5/22, 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 淳一 (IWAMOTO, Junichi)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10384950

(2) 研究分担者

本多 彰 (HONDA, Akira)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10468639

(3) 研究分担者

宮崎 照雄 (MIYAZAKI, Teruo)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60532687