

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 16 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：15K09026

研究課題名(和文) 骨格筋低分子マイオカインによる肝代謝制御メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) The actions of BCAA intermediates as myokines on hepatic metabolism

研究代表者

松崎 靖司 (Matsuzaki, Yasushi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：50209532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体中の最大臓器である骨格筋は、収縮刺激に伴い生理活性物質(マイオカイン)を分泌する。また、骨格筋の特異的代謝として分岐鎖アミノ酸(BCAA)を異化し、中間代謝物を放出する。本研究では、BCAA中間代謝物における肝臓へのマイオカイン作用を評価した。ロイシン中間代謝物3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸(3HMB)、バリン中間代謝物3-アミノイソ酪酸(3AIB)と3-ヒドロキシイソ酪酸(3HIB)のアルブミン合成能や脂質代謝に対する作用を培養肝細胞やラット肝組織で評価した結果、3AIBの脂質異化能に対する効果は見られなかったが、3HMBのアルブミン合成向上と3HIBのケトン体産生抑制が確認された。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscles secrete myokines that have physiological actions in response to muscle contractions, and some intermediates of branched-chain amino acids (BCAAs) during energy production. This study evaluated the physiological actions of the BCAA-intermediates as myokines on the hepatic metabolism in cultured hepatocytes and rat hepatic tissue. Leucine-intermediate 3-hydroxy-3-methylbutyrate and valine 3-hydroxyisobutyrate had the increase of reduced albumin synthesis ability and the inhibition of ketone body production, respectively, although the effect of valine intermediate 3-aminoisobutyrate on the hepatic lipid catabolism had not been confirmed.

研究分野：肝臓病学

キーワード：慢性肝疾患 マイオカイン 分岐鎖アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

肝臓は様々な代謝を通じて、全身の恒常性を維持している中心的な臓器である。一方、生体中最大の重量を占める骨格筋(筋)も多くの代謝を担っており、筋収縮刺激に伴って筋細胞から生理活性物質(マイオカイン)が分泌され、筋自身のほか、肝臓などの他臓器へ作用することが明らかとなっている。マイオカインには、分子量の大きな蛋白系マイオカイン(インターロイキン類、アイリシン、マイオスタチンなど)に加え、非蛋白系の低分子化合物も存在することが明らかになっている。特に、筋では分岐鎖アミノ酸(BCAA; バリン, ロイシン, イソロイシン)がエネルギー産生に利用される特徴があり、BCAA 異化過程で、中間代謝物として低分子化合物が産生され、筋から放出されることが明らかになっている。特に、ロイシンは、3-ヒドロキシ-3-メチル酪酸(3HMB)に代謝され、3HMB は、mammalian target of rapamycin (mTOR)を活性化し蛋白合成促進と分解抑制の作用が確認されている。また、バリンは、脂質代謝を制御する核内受容体 PPAR α の発現を増加させて脂肪酸 β 酸化能を向上させる作用が確認されている 3-アミノイソ酪酸(3AIB)や、ケトン体の 3-ヒドロキシ酪酸(3HB)のイソ体である 3-ヒドロキシイソ酪酸(3HIB)に代謝される。これら酪酸系の BCAA 中間代謝物は、筋の収縮に伴い骨格筋から血中へ放出されるため、肝臓の機能向上や病態改善などのマイオカインとしての作用を有する可能性が推測される。

2. 研究の目的

骨格筋にて産生される酪酸系の BCAA 中間代謝物が、肝臓の機能向上や病態改善などの肝代謝制御・生理活性を有するマイオカインとしての作用を持つ物質を探索する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 3HMB のアルブミン合成効果の評価

ヒト非腫瘍性肝細胞株 HepaRG 細胞を、6-well plate に播種し、サブコンフルエントになるまで増殖させた。その後、コントロール培地群(DMEM)とアミノ酸不含培地(Zero 培地)に変更し、Zero 培地には、2mM ロイシン、もしくは、2mM 3HMB を添加して 24 時間培養し、培地と細胞を回収した。培地を遠心式フィルターで濃縮後、Albumin 測定 ELISA キット (Bethyl Laboratories, Inc)にて、培地中のアルブミン濃度を測定した。また、細胞から total RNA を回収し、逆転写反応処理後、リアルタイム PCR 装置にて、albumin と β -actin の mRNA 発現を測定した。

(2) 3AIB の脂肪肝改善効果の評価

マウス非腫瘍性肝細胞株 AML12 細胞を 6-well plate に播種し、サブコンフルエントまで増殖させた。その後、核内受容体 LXR の合成リガンドである To901317 を 1 μ M 添加して4日間培養し、脂肪肝モデルを作成した。その後、細胞を PBS で洗浄した後、0~100 μ M の濃度で 3AIB を 3日間暴露した。同様に、PPAR α の合成リガンドである fenofibric acid (FA)を 1 μ M にて添加した。

3日間の3AIB 添加後、細胞を回収し、トリグリセライド E-テストワコー(和光純薬社)にて細胞内中性脂肪量を、Pierce® BCA 蛋白測定キット(Thermo Fischer Scientific Inc.)にて、細胞総蛋白量を測定し、細胞内中性脂肪量を総蛋白量で補正した。

(3) 3HIB の肝脂質代謝に及ぼす影響の評価

マウス AML12 細胞を 6-well plate に播種し、コンフルエントまで増殖させた後、脂肪酸 β 酸化誘導条件(200 μ M パルミチン酸[10% bovine serum albumin に混和], 50 μ M カルニチン, 1.0 g/L glucose, 無血清)に、2 mM、もしくは、10 mM の 3HIB を加えて、overnight(17 時間)で培養後、培地を回収した。回収した培地において、脂肪酸 β 酸化により産生され細胞外へ放出されるケトン体 3HB の濃度を、LC-MS/MS 装置にて定量した。また、6-well plate にてコンフルエントまで増殖させた AML12 細胞に対し、2 mM の 3HIB と 1 μ M To901317 を添加し、24時間後の SREBP1c mRNA 量を RT-PCR 法にて測定した。

また、Wister 系の雄性ラット(8 週齢)に対し、腹腔内に 3HIB を 60mg/kg BW にて腹腔内投与し、15 分後と 60 分後に肝臓を採取した。得られたサンプルにより、LC-MS/MS 装置にて、3HB と 3HIB を測定した。

4. 研究成果

(1) 3HMB のアルブミン合成効果の評価

図1に、HepaRG 細胞に、3HMB を添加した際の培地中アルブミン濃度とアルブミン mRNA 量に及ぼす影響の検討結果を示した。コントロール培地と比較して、アミノ酸不含 Zero 培地では、培地中アルブミン濃度は有意に減少し、3HMB の添加により、その減少は、コントロール培地レベルまで増加した(図1A)。一方、ロイシンの添加により、Zero 培地と比較し、アルブミン濃度は上昇したが有意ではなかった。また、アルブミン mRNA 発現は、Zero 培地と比べて、3HMB とロイシンの添加共に、有意な変化は見られなかった(図1B)。

(2) 3AIB の脂肪肝改善効果の評価

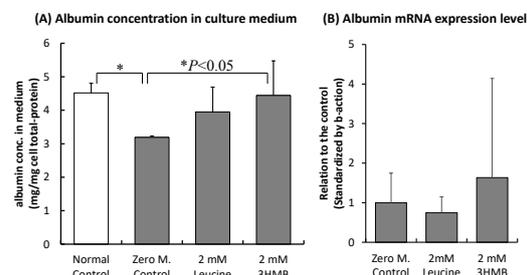


図1. ヒト培養肝細胞における3HMBのアルブミン細胞外排泄量とアルブミン遺伝子発現に対する効果。ヒト非腫瘍性肝細胞株 HepaRG 細胞を 3HMB ならびに Leu に 24 時間暴露し、培地中へ排泄されるアルブミン量(A)とアルブミン mRNA 量(B)を測定した。データは、平均±標準偏差で示す。Normal Control; DMEM コントロール培地, Zero M. Control; アミノ酸不含コントロール培地, Leu; ロイシン, 3HMB; 3-hydroxy-3-methylbutyrate, 2 mM Leucine; Zero M. に 2 mM Leu を添加, 2 mM 3HMB; Zero M. に 2 mM 3HMB を添加。

図2に、3AIB の脂肪肝改善効果の検討結果を示した。AML12 細胞に LXR 合成リガンドである To901317 を添加して細胞内中性脂肪を蓄積させた脂肪肝モデルに対して、0~100 μM 3AIB, ならびに、1 μM FA に、3日間暴露した結果、FA の添加では細胞内中性脂肪量が有意に減少したが、3AIB の添加では脂肪肝改善効果は認められなかった。

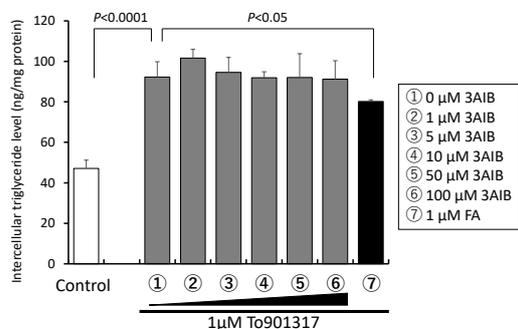


図2. マウス培養脂肪肝細胞モデルにおける 3AIB の脂肪肝改善効果. LXR 合成リガンド To901317 により作成した肝細胞脂肪肝モデルに対し、様々な濃度で 3AIB を添加し、3日後に細胞内中性脂肪量を測定した。データは、平均 \pm 標準偏差で示す。Control; To901317 非添加正常細胞, 3AIB; 3-アミノイソ酪酸. FA; fenofibric acid.

(3) 3HIB の肝脂質代謝に及ぼす影響の評価

図3に、3HIB の肝細胞脂質代謝に及ぼす影響の検討結果を示した。培養肝細胞に、低栄養条件下(低グルコース 1.0g/L, 無血清)に脂肪酸を添加すると脂肪酸 β 酸化が亢進し、その結果、ケトン体 3HB が肝細胞から放出される。本実験では、脂肪酸 β 酸化誘導条件下における 3HIB の影響について検討した結果、3HIB 単独では、3HB の放出量に影響は無かったが、パルミチン酸添加により増加した 3HB 放出量が 3HIB の共添加により、有意に減少した(図3A)。

さらに、脂質代謝の遺伝子発現を制御する転写因子 SREBP1c の mRNA 発現に及ぼす 3HIB の影響について検討した結果、SREBP1c mRNA 発現量は、LXR 合成リガンドである To901317 によって有意に増加したものの、2 mM, あるいは、10 mM の 3HIB 添加によっても、影響は見られな

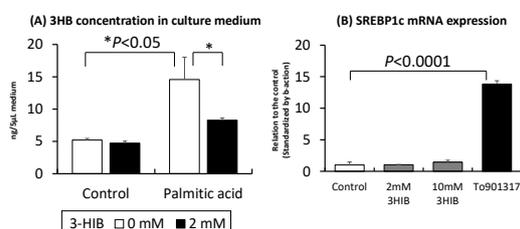


図3. マウス AML12 細胞における脂質代謝に及ぼす 3HIB の影響. 脂肪酸(PA)添加 β 酸化誘導条件下にて 2mM の 3HIB を共暴露し、overnight 後の培地中に排泄されるケトン体(3HB)濃度を測定した(A)。また、2、10mM の 3HIB, ならびに、1 μM の To901317 を添加し、24 時間後に SREBP1c mRNA 発現量を測定した(B)。データは、平均 \pm 標準偏差で示す。(図3A) Control; 脂肪酸非添加条件, Palmitic acid; 200 μM パルミチン酸添加条件, 3HB; 3-ヒドロキシ酪酸, 3HIB; 3-ヒドロキシイソ酪酸。(図3B) Control; 3HB/To901317 非添加条件, To901317; LXR 合成リガンド。

かった(図3B)。

図4に、ラットへ 3HIB を腹腔内投与し、15 分後と 60 分後の肝臓中 3HB と 3HIB 濃度を測定した結果を示した。3HIB の腹腔内投与により、投与15分後に肝臓中 3HIB 濃度は有意に増加したが、60分後には投与前のレベルまで減少した。一方、肝臓中 3HB は、3HIB 腹腔内投与 15 分後に減少し、60 分後には増加した。

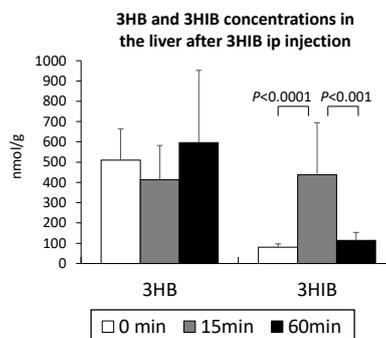


図4. 3HIB 腹腔内投与後のラット肝組織中 3HB と 3HIB 濃度. ラットに、60mg/kg BW にて 3HIB を腹腔内投与し、15 分後と 60 分後に肝臓中の 3HB と 3HIB を測定した。データは、平均 \pm 標準偏差で示す。3HB; 3-ヒドロキシ酪酸, 3HIB; 3-ヒドロキシイソ酪酸。

以上の結果をまとめると、1)非腫瘍性肝細胞株をアミノ酸不含培地での培養で減少するアルブミン産生量の低下を、3HMB により改善した。2)培養細胞脂肪肝モデルに対し、3AIB を添加し細胞内中性と SREBP-1c 遺伝子発現量を測定した結果、3AIB には脂肪肝改善効果は観察されなかった。3)非腫瘍性肝細胞株に β 酸化誘導条件下で 3HIB を添加したところ、ケトン体の産生量を低下させた。また、ラットに 3HIB を腹腔内投与すると、肝臓中 3HIB 濃度の増加に伴いケトン体量が減少した。

以上により、骨格筋にて産生される酪酸系の BCAA 中間代謝物のうち、3HMB に低下した肝臓のアルブミン合成能を回復させる効果と、3HIB に肝臓のケトン体産生能を低下させる効果を有する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Miyazaki T. The regulation of BCAA catabolism for preference of energy expenditure in the skeletal muscle. *Adv Exer Sport Physiol.* 23(2):19-24, 2017. <査読無し>
2. Miyazaki T, Nakamura Y, Ebina K, Mizushima T, Ra RG, Ishikura K, Matsuzaki Y, Ohmori H, Honda A. Increased N-acetyltaurine in the skeletal muscle after endurance exercise in rat. *Adv Exp Med Biol.* 975:403-11, 2017. <査読有り>
3. Miyazaki T, Ishikura K, Honda A, Ra SG, Komine S, Miyamoto Y, Ohmori H, Matsuzaki Y. Increased N-acetyltaurine in

serum and urine after endurance exercise in human. *Adv Exp Med Biol.* 803:53-62, 2015.
<査読有り>

[学会発表] (計 11 件)

1. 宮崎照雄, 池上正, 松崎靖司, 本多彰. TGR5 を介した細胞内甲状腺ホルモン活性化による骨格筋分岐鎖アミノ酸異化の制御. 第 72 回日本体力医学会大会 (松山市). 2017 年 9 月 16-18 日.
2. 宮崎照雄. 唾液マーカーを用いた非侵襲的な肝硬変患者の肝筋栄養代謝評価の試み. 第 10 回 IBARAKI LIVER FORUM 2017 (つくば市). 2017 年 7 月 20 日.
3. Miyazaki T, Ra SG, Ishikura K, Ohmori H, Ikegami T, Matsuzaki Y, Honda A. Comparison of the influence of pre-exercise BCAA supplementation on serum HMB level between endurance and resistance exercises. *Experimental Biology* 2017. Chicago. April 22-26, 2017.
4. 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 運動による分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の代謝. 第9回三大学交流セミナー (阿見町). 2017 年 2 月 1 日.
5. 宮崎照雄, 羅成圭, 石倉恵介, 宮川俊平, 松崎靖司, 本多彰, 大森肇. 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 摂取後の運動による血中 β -hydroxy- β -methylbutyrate (3HMB) 濃度の上昇. 第 71 回日本体力医学会大会 (盛岡市). 2016 年 9 月 23-25 日
6. 宮崎照雄. 持久性運動時の脂質, アミノ酸代謝の筋肝連関. 日本体育学会第67回大会 (熊取町). 2016 年 8 月 24-26 日.
7. Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. TGR5 activation inhibits muscular BCAA catabolism via thyroid hormone activation. *Falk Symposium 203. XXIV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease.* Düsseldorf. June 17-18, 2016.
8. Miyazaki T, Nakamura Y, Ebina K, Mizushima T, Ra SG, Ishikura K, Matsuzaki Y, Ohmori H, Honda A. The role of N-acetyltaurine on the normalization of energy metabolism balance in the skeletal muscle after endurance exercise. 20th international taurine meeting. Seoul. May 23-27, 2016.
9. Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. Serum 3-hydroxyisobutyrate as a biomarker of muscular BCAA catabolism in liver cirrhosis patients. the 25th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2016). Shinagawa. February 20-24, 2016.
10. 宮崎照雄, 本多彰, 池上正, 松崎靖司. 骨格筋 BCAA 異化状態を反映するバリン中間代謝物 3-ハイドロキシイソ酪酸の評価. 第 70 回日本体力医学会大会 (和歌山市). 2015 年 9 月 18-20 日.
11. Miyazaki T, Ishikura K, Honda A, Ra SG,

Ohmori H, Matsuzaki Y. Serum concentrations of 3-hydroxyisobutyrate and 3-hydroxy-3-methylbutyrate as BCAA metabolites in endurance exercise. 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Protein. Vienna. August 3-7, 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

松崎 靖司 (MATSUZAKI, Yasushi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50209532

(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

池上 正 (IKEGAMI, Tadashi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40439740

宮崎 照雄 (MIYAZAKI, Teruo)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60532687

(3)連携研究者なし

(4)研究協力者なし