

令和元年6月25日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19664

研究課題名（和文）NAFLDにおけるアミノ酸欠乏の病態への役割解明

研究課題名（英文）Amino acids deficiency in NAFLD

研究代表者

中島 淳（Atsushi, Nakajima）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30326037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：NAFLD患者では肥満や過剰な過栄養負荷状態にもかかわらず潜在的アミノ酸欠乏状態でありその影響は糞便中で顕著に出やすいこと、また過剰なエネルギーが肝臓に付加された状態でのアミノ酸不足は軽度の欠乏であっても脂肪肝を増悪つまり相対的に飢餓状態と同じ病態となっていることなどを明らかにした、これまで知られていなかったNAFLD病態における過栄養下のアミノ酸不足によるNAFLD増悪の新規メカニズムの提唱に繋がることが期待される。今後はNAFLD患者におけるアミノ酸欠乏状態の新規診断方法などの新たなバイオマーカーの開発や欠乏アミノ酸の検討からアミノ酸補充療法などの全く新しい診断治療法の実現を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は全人口の2割強を占める膨大な患者数であるが確立された薬物療法はない。それゆえ新規治療法の実現への挑戦が期待される分野である。当該患者では肥満を認めるが筋肉量の減少をしばしば認めるがこれは運動量の低下のためを説明されていた。しかし、当該患者で栄養状態が良いにもかかわらず潜在的アミノ酸欠乏状態に陥っていることは極めて新規性が高くかつ臨床的重要性が高いことであるといえる。NAFLDでは相対的にエネルギー・アミノ酸比が飢餓状態と同じでありその結果NAFLDが増悪するとすれば当該疾患の機序解明および治療におけるパラダイムシフトへとつながるものである。

研究成果の概要（英文）：In patients with NAFLD despite potential obesity and excessive hypertrophic condition, it is a potential amino acid deprivation condition, and its effect is conspicuous in faeces, and amino acid deficiency with excess energy added to the liver is It has been known that using a human clinical sample and a mouse model, even mild deficiency causes exacerbation of fatty liver, that is, the condition is relatively the same as starvation, etc. It is expected that it leads to the proposition of a novel mechanism of NAFLD exacerbation due to amino acid deficiency under hypernutrition in NAFLD pathological conditions that were not present. In the future, we would like to develop new biomarkers such as new diagnostic methods for amino acid deficiency in NAFLD patients and to develop completely new diagnostic treatments such as amino acid replacement therapy from detailed examination of deficient amino acids.

研究分野：消化器内科

キーワード：NASH NAFLD アミノ酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はNAFLDの病態解明や新規診断方・治療法の開発をこれまで精力的に行ってきた。NAFLD患者の糞便中のメタボローム解析を行ったところ当該疾患の線維化の進行に従い糞便中のアミノ酸の減少を認めた。栄養価の高い高脂肪高たんぱく食の摂取者が多く、見るからに栄養状態の良い患者の糞便でどうしてアミノ酸が減っているのかを考えてみると、可能性は腸内細菌の異常によるもの、つまりアミノ酸産生菌の低下や消費する菌の増加などが推測された。この証明には近年急速に進歩してきている腸内細菌の仮想メタゲノム解析をちいれればできることで本研究の着想に至った。また機序の解析はマウスモデルで行うこと。さらにNAFLDではサルコペニアなども多くいることから潜在的アミノ酸欠乏症は血液検査ではわかりにくいが見え隠れするのではと推測するに至った。飢餓時にはエネルギー摂取が少ないにもかかわらず著明な脂肪肝になるがその機序はタンパク質不足である。一方もしNAFLD患者が潜在的にアミノ酸不足であったら負荷される過剰なエネルギーを考えるとこの状態は相対的に飢餓時と同じ代謝異常となると考えられる。つまり飢餓ではないのに飢餓時と同じエネルギーに比してアミノ酸が少ない状態である。この結果脂肪肝が悪化するのではないかと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

NAFLDは全人口の2割強を占める膨大な患者数であるが確立された薬物療法はない。それゆえ新規治療法の開発への挑戦が期待される分野である。当該患者では肥満を認めるが筋肉量の減少をしばしば認めるがこれは運動量の低下のためを説明されていた。しかし、当該患者で栄養状態が良いにもかかわらず潜在的アミノ酸欠乏状態に陥っていること、さらにその機序解明はこれまで知られていない極めて新規性が高くかつ臨床的重要性が高いことであるといえる。NAFLDでは相対的にエネルギー・アミノ酸比が飢餓状態と同じでありその結果NAFLDが増悪するとすれば当該疾患の機序解明および治療におけるパラダイムシフトへとつながるものである。

### 3. 研究の方法

(1)患者検体を用いた潜在的アミノ酸欠乏状態の解析：糞便メタボローム解析の結果をさらに詳細に解析して潜在的アミノ酸欠乏状態の実態解明を行う。具体的にはアミノ酸アナライザーを用いて多数例(約100名の当該患者と脂肪肝のない健常人80名)の患者糞便と血清アミノ酸全分画の精密定量解析を行う。以上の解析で糞便中および血液中のアミノ酸欠乏状況の把握をおこなう。

(2)動物モデルを用いた検討：(a)高カロリー低アミノ酸モデルでの検討。高脂肪高カロリー食負荷ではマウスはNAFLDに類似した著明な脂肪肝を呈する。この過栄養モデルを用いて投与餌中のアミノ酸を欠乏した種々のレベルのアミノ酸低下食を用いて検討をする。十分なアミノ酸含有餌に比してアミノ酸欠乏食では脂肪肝が増悪が起これば過栄養状態でもエネルギー・アミノ酸比の亢進があれば脂肪肝が増悪する証明になる。(b)マウスモデルでは高脂肪高カロリー負荷でアミノ酸経度欠乏時にアミノ酸プールの減少が軽度起きていれればまず肝臓におけるアミノ酸利用が低下することの検討。アイソトープ標識アミノ酸を投与して過栄養でアミノ酸欠乏食投与では投与アミノ酸の体内分布で各種臓器への標識アミノ酸の供給が肝臓では相対的に低下することの証明実験をおこなう。以上の検討でヒト解析結果に基づいたアミノ酸経度欠乏食で高脂肪高カロリー負荷でNAFLDが増悪するモデルが確立できたらその詳細な解析に加えうらとり実験として摂取カロリーを徐々に低下させて見た場合アミノ酸欠乏のない群と比べるとアミノ酸欠乏群では脂肪肝の改善効果が乏しいことが認められれば仮説として述べてきた相対的飢餓状態による疾患増悪機序の必要かつ十分な動物実験による証明となる。

(3)腸内細菌解析：アミノ酸産生腸内細菌の解析を患者の腸内細菌を次世代シーケンサーで16srRNAのパイロシーケンスをおこない解析をする。仮想メタゲノム解析でアミノ酸産生菌の変化をアミノ酸合成遺伝子、代謝遺伝子を各々のアミノ酸ごとに解析することでアミノ酸ごとの患者腸内のアミノ酸産生菌、アミノ酸代謝菌の変化を解析することができる。もし低下していれば原因はアミノ酸産生菌の減少である可能性が高くなりその機序解明を進める。

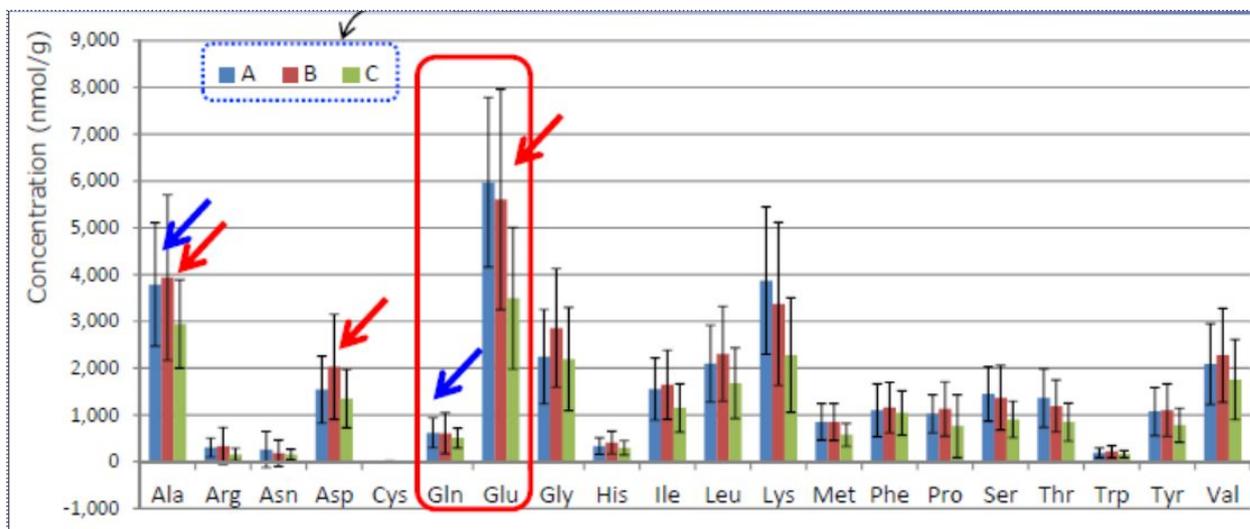
### 4. 研究成果

#### ヒト患者解析

患者の糞便解析では図のようなアミノ酸異常をみとめ、現在論文作成中である。

#### 動物モデルでの解析

動物モデルではアニリン負荷モデルを用いて解析を行った。患者糞便解析と同様な糞便アミノ酸プロファイリングを得られたのでその機序、及び臨床的意義の解析を継続して行っている。マウスの筋肉定量を行い、アミノ酸の補充療法を行うとサルコペニアの改善が起きるかのチャレンジングな検討を現在行っている。



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](査読あり 計 19 件)

- 1.Hsu C, Caussy C, Imajo K, Chen J, Singh S, Kaulback K, Le MD, Hooker J, Tu X, Bettencourt R, Yin M, Sirlin CB, Ehman RL, Nakajima A, Loomba R. Magnetic Resonance vs Transient Elastography Analysis of Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease: a Systematic Review and Pooled Analysis of Individual Participants. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jun 13. pii: S1542-3565(18)30613-X. doi: 10.1016/j.cgh.2018.05.059. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29908362.
2. Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, Sugi Y, Arimoto J, Umezawa S, Uchiyama S, Matsumoto M, Nakajima A. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut*. 2018 Jun 22. pii: gutjnl-2018-316661. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316661. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29934439.
- 3.Yoneda M, Imajo K, Nakajima A. Non-Invasive Diagnosis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2018 May 1. doi: 10.1038/s41395-018-0170-0. PubMed PMID: 29937542.
- 4.Estes C, Anstee QM, Teresa Arias-Loste M, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, Colombo M, Craxi A, Crespo J, Day CP, Eguchi Y, Geier A, Kondili LA, Kroy DC, Lazarus JV, Loomba R, Manns MP, Marchesini G, Nakajima A, Negro F, Petta S, Ratziu V, Romero-Gomez M, Sanyal A, Schattenberg JM, Tacke F, Tanaka J, Trautwein C, Wei L, Zeuzem S, Razavi H; NAFLD / NASH Working Group. Modeling NAFLD Disease Burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol*. 2018 Jun 8. pii: S0168-8278(18)32121-4. doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.036.

5. Ogawa Y, Imajo K, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Kato S, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Saigusa Y, Hyogo H, Sumida Y, Itoh Y, Eguchi K, Yamanaka T, Wada K, Nakajima A: Palmitate-induced lipotoxicity is crucial for the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in cooperation with gut-derived endotoxin. *Sci Rep.* 2018 Jul 27;8(1):11365. doi: 10.1038/s41598-018-29735-6. PubMed PMID:30054551.
6. Higurashi T, Fuyuki A, Ohkubo H, Iida H, Inamori M, Taguri M, Komiya Y, Goto S, Taniguchi L, Okada N, Ito T, Mizuki A, Manabe N, Haruma K, Nagasaka M, Nakagawa Y, Ohmiya N, Yamamoto S, Funaki Y, Kasugai K, Nakajima A : The Efficacy of the Kampo Formula Keishikashakuyakuto for Irritable Bowel Syndrome: A Phase 3, Multicenter, Double-Blind, Placebo- Controlled, Randomized Controlled Trial . *J Clin Trials* 2018, Vol 8(2) Received Date: May 08, 2018 / Accepted Date: May 14, 2018 / Published Date: May 16, 2018 .
7. Fukudo S, Endo Y, Hongo M, Nakajima A, Abe T, Kobayashi H, Nakata T, Nakajima T, Sameshima K, Kaku K; Mizagliflozin Study Group : Safety and efficacy of the sodium-glucose cotransporter 1 inhibitor mizagliflozin for functional constipation: a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial . *Lancet Gastroenterol Hepatol* , 2018 Jul 25. [Epub ahead of print]
8. Fukudo S, Miwa H, Nakajima A, Kinoshita Y, Kosako M, Nakagawa A, Akiho H, Kuroishi K, Johnston JM, Currie M, Ohkusa T : Dose-finding study of linaclotide in Japanese patients with chronic constipation: A phase II randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *Neurogastroenterol Motil.* 2018 Aug 7:e13442. doi: 10.1111/nmo.13442. [Epub ahead of print]
9. Ohkuma K, Iida H, Inoh Y, Kanoshima K, Ohkubo H, Nonaka T, Fujita K, Kusakabe A, Inamori M, Nakajima A. Comparison of the early effects of vonoprazan, lansoprazole and famotidine on intragastric pH: a three-way crossover study. *J Clin Biochem Nutr.* 2018 Jul;63(1):80-83. doi: 10.3164/jcbn.17-128. Epub 2018 May 9. PubMed PMID: 30087548; PubMed Central PMCID: PMC6064815.
10. Fukudo S, Miwa H, Nakajima A, Haruma K, Kosako M, Nakagawa A, Akiho H, Yamaguchi Y, Johnston JM, Currie M, Kinoshita Y. A randomized controlled and long-term linaclotide study of irritable bowel syndrome with constipation patients in Japan. *Neurogastroenterol Motil.* 2018 Aug 22:e13444. doi:10.1111/nmo.13444. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30136447.
11. Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Yoneda M, Imajo K, Tomeno W, Saito S, Nakajima A. Identification of differentially methylated region (DMR) networks associated with progression of nonalcoholic fatty liver

- disease. *Sci Rep.* 2018 Sep 11;8(1):13567. doi: 10.1038/s41598-018-31886-5. PubMed PMID: 30206277; PubMed Central PMCID: PMC6134034.
12. Kawashima K, Isogawa M, Hamada-Tsutsumi S, Baudi I, Saito S, Nakajima A, Tanaka Y. Type I interferon signaling prevents hepatitis B virus-specific T cell responses by reducing antigen expression. *J Virol.* 2018 Sep 12. pii: JVI.01099-18. doi: 10.1128/JVI.01099-18. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30209178.
  13. Yoneda M, Imajo K, Nakajima A. Will the magnetic resonance imaging proton density fat fraction replace liver biopsy as the gold standard for detecting steatosis? *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2018 Aug;7(4):292-293. doi: 10.21037/hbsn.2018.04.02. PubMed PMID: 30221157; PubMed Central PMCID: PMC6131261.
  14. Chiba H, Ohata K, Tachikawa J, Arimoto J, Ashikari K, Kuwabara H, Nakaoka M, Goto T, Nakajima A : Delayed Bleeding After Colorectal Endoscopic Submucosal Dissection: When Is Emergency Colonoscopy Needed?. *Dig Dis Sci.* 2018 Oct 3. doi: 10.1007/s10620-018-5310-2. [Epub ahead of print] PMID: 30284133 [PubMed - as supplied by publisher]
  15. Fukudo S, Miwa H, Nakajima A, Kinoshita Y, Kosako M, Hayashi K, Akiho H, Kuroishi K, Johnston JM, Currie M, Ohkusa T. : High-dose linaclotide is effective and safe in patients with chronic constipation: A phase III randomized, double-blind, placebo-controlled study with a long-term open-label extension study in Japan. *Neurogastroenterol Motil.* 2018 Oct 23:e13487. doi: 10.1111/nmo.13487. [Epub ahead of print] PMID: 30353619 [PubMed - as supplied by publisher]
  16. Higurashi T, Nakajima A. : Metformin and Colorectal Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Oct 23;9:622. doi: 10.3389/fendo.2018.00622. eCollection 2018. Review. PMID: 30405532 [PubMed]
  17. Ogawa Y, Yoneda M, Kobayashi T, Honda Y, Kessoku T, Imajo K, Saito S, Nakajima A. : Present and emerging pharmacotherapies for non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Expert Opin Pharmacother.* 2018 Nov 9:1-14. doi: 10.1080/14656566.2018.1543403. [Epub ahead of print] PMID: 30411635 [PubMed - as supplied by publisher]
  18. Kurita Y, Kobayashi N, Tokuhisa M, Goto A, Kubota K, Endo I, Nakajima A, Ichikawa Y. : Sarcopenia is a reliable prognostic factor in patients with advanced pancreatic cancer receiving FOLFIRINOX chemotherapy. *Pancreatology.* 2018 Nov 10. pii: S1424-3903(18)30746-4. doi: 10.1016/j.pan.2018.11.001. [Epub ahead of print]

19. Tomeno W, Imajo K, Kuwada Y, Ogawa Y, Kikuchi M, Honda Y, Kato T, Kessoku T, Kirikoshi H, Yoneda M, Kitahora T, Saito S, Ozawa Y, Nakajima A. : Distribution of liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease with higher Fibrosis-4 index than low cut-off index. J Gastroenterol Hepatol. 2018 Dec 2. doi: 10.1111/jgh.14559. [Epub ahead of print]PMID: 30506860 [PubMed - as supplied by publisher]

〔学会発表〕(計 0件)

〔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: <http://ycu-hepabiligi.jp/>

## 6 . 研究組織

研究代表者のみ

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。