

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06436

研究課題名(和文) アミノ酸と核酸塩基の代謝ネットワークを基盤とした新しい脂肪肝誘導機構

研究課題名(英文) Novel mechanisms for fatty liver formation based on metabolic network among amino acids and nucleobases

研究代表者

山中 大介 (Yamanaka, Daisuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：10553266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、アミノ酸のうちアルギニンのみ不足した低アルギニン食で誘導される脂肪肝の形成機構を解析してきた。最近、低アルギニン食誘導性の脂肪肝では、核酸代謝系の一部であるアデニン代謝系化合物の低下が必須である可能性を見出した。そこで本研究では、このようなアデニン代謝系の低下を誘導する代謝ネットワークが脂肪肝形成やNASH発症に果たす役割を解析した。その結果、アデニン代謝系のうち、特にイノシンーリン酸(IMP)がアルギニン不足による単純性脂肪肝の誘導に重要であり、この代謝系はNASHモデルであるメチオニンコリン欠乏のNASH発症には関与しないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルコール多飲歴のない非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は肝硬変や肝癌へと進行し得るが、治療法が確立されていないことが問題となっている。これまで、脂肪肝形成やNASH発症に関する分子機構の研究は、インスリン抵抗性や脂質異常、炎症などの観点から行われてきた。一方で本研究は、アミノ酸と核酸代謝系(特にアデニン代謝系)の脂肪肝形における役割を明らかにした点が新しく、学術的重要性が高い。またアデニン代謝系が単純脂肪肝の形成には関与するもののNASH発症には関与しない点は、NASHに遷移しない脂肪肝を特定する病態分類などに応用でき、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the mechanism of fatty liver formation induced by a low arginine diet, in which only arginine is deficient among the amino acids. Recently, we found that a decrease in adenine metabolic compounds, which are part of the nucleic acid metabolic system, may be essential for the low arginine diet-induced fatty liver. In this study, we analyzed the role of metabolic networks that induce such a decrease in the adenine metabolic system in fatty liver formation and NASH development. We found that among the adenine metabolic systems, inosine monophosphate (IMP) is particularly important in the formation of simple fatty liver induced by arginine deficiency, and that this metabolic system is not involved in the development of NASH in a NASH model, methionine choline deficiency.

研究分野：分子内分泌代謝学

キーワード：脂肪肝 NASH アミノ酸 核酸 アデニン イノシンーリン酸IMP

## 1. 研究開始当初の背景

アルコール多飲歴のない脂肪肝疾患 (NAFLD) に含まれる非アルコール性脂肪肝 (NASH) は、肝硬変や肝臓癌へと進行し得ることから、近年注目を集めている。NASH の治療は食事・運動療法を基本に、状況により薬物療法などが施されるが、改善されないことも多く、治療法の確立が臨床上の課題となっている。NASH は、非飲酒者においてアルコール性肝炎に類似した病理所見を呈する疾患概念であって、その病因に立脚したものではない。そのため、NASH は複数の病態を含んでいる。NASH の治療法を確立するためには、脂肪肝形成や NASH 発症のメカニズムを解明し、NASH の病態解明に役立てることが重要である。

我々はこれまで、アミノ酸のうちアルギニンのみ不足した飼料 (低アルギニン食) を成長期のラットに給与すると、脂肪肝が形成されることを報告してきた。このような脂肪肝形成における代謝変動の影響を明らかにするため、低アルギニン食給与ラットの肝臓において、アミノ酸や糖、核酸などを調べるメタボローム解析を行った。その結果、興味深いことに、低アルギニン食群において、核酸塩基アデニンの生成に至る一連の代謝経路化合物 (IMP、AMP、アデノシン、アデニン) が減少することがわかった【図1】。そこで、これらのアデニン代謝系化合物の低下を補う目的で、低アルギニン食にアデニンを添加し給与したところ、これらの化合物の低下は回復し、同時に、脂肪肝誘導も完全に抑制された。これらの結果は、アミノ酸、特にアルギニンの不足がアデニン代謝系化合物の低下を誘導し、これを介して肝臓への脂肪蓄積が起こることを示している。このように、十分な栄養素を摂取すれば「脂肪肝を抑制するアミノ酸と核酸の代謝ネットワーク」が機能するが、アミノ酸欠乏によりこのネットワークが破綻し、脂肪肝を抑制するアデニン代謝経路化合物が減少するために脂肪肝が誘導されるといふ全く新しいメカニズムを提案するに至っている。

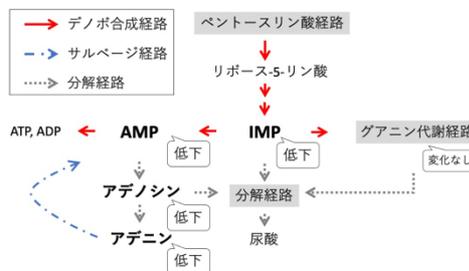


図1. 脂肪肝モデルで観察されるアデニン代謝経路化合物の低下一般に知られているアデニン代謝経路の概要を示した。低アルギニン食で観察される代謝物の変動を吹き出しに記載した。

## 2. 研究の目的

本研究では、このようなアミノ酸とアデニン代謝経路化合物のネットワークを介した脂肪肝形成や NASH 発症の制御メカニズムを解明することを目的とした。具体的には次の3点に焦点を絞り、解析を進めた。

- (1) 飼料中アミノ酸によるアデニン代謝経路化合物の制御と脂肪肝への影響
- (2) 脂肪肝抑制の実体を担うアデニン代謝経路化合物の特定
- (3) アデニン代謝経路の NASH 発症への関与

## 3. 研究の方法

(1) 飼料に含まれるアミノ酸全体の量が不足する低アミノ酸食や、アミノ酸のうちアルギニンのみ不足する低アルギニン食を脂肪肝モデル飼料として用いて、アミノ酸がアデニン代謝系化合物の量を制御するメカニズムを解明する研究を進めた。具体的には、低アミノ酸食、低アルギニン食またはこれらの飼料にアデニン代謝系化合物を1種類ずつ添加した飼料を作成、成長期のラットに給餌し、肝臓における中性脂肪量やアデニン代謝系化合物を調べた。

(2) ラット肝臓由来の培養細胞株である H4IIE 細胞を用いて、低アルギニン環境を模倣した培養条件を設計した。具体的には、低アルギニン食を給与したラットの血清中アミノ酸では、メチオニンやヒスチジンなどが増加、チロシンやスレオニン、アルギニンなどが減少することから、培地中のアミノ酸組成をこれらの変動を模倣する形で変更した (低アルギニン模倣培地)。この条件下で H4IIE 細胞を培養し、アデニン代謝系化合物の変動や脂肪蓄積との関連を調べた。また、細胞内 IMP 量と脂肪蓄積量の関連を明らかにするため、IMP を代謝する酵素の阻害剤 (MPA および Alanosine) を H4IIE 細胞に添加し、IMP 量と細胞内脂肪量の解析を行なった。

(3) 脂肪肝から NASH への遷移におけるアデニン代謝系の役割を解析するため、NASH モデルとしてしばしば用いられるメチオニン・コリン欠乏食に加えて、低アルギニン食や、これとコリン欠乏を組み合わせた低アルギニン・コリン欠乏食を作成、脂肪肝や NASH マーカー (血清 ALT) への影響を調べた。さらに、メチオニン・コリン欠乏食にアデニンを添加した際の脂肪肝への影響を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 低アミノ酸食、低アルギニン食のいずれを給餌した場合でも脂肪肝は誘導されるが、これらの飼料にアデニンを添加すると、低アミノ酸+アデニン食の場合には脂肪肝への影響は観察さ

れない一方で、低アルギニン+アデニン食の場合には脂肪肝が抑制されることがわかった (図2A)。また、食餌中アミノ酸に反応した肝臓中のアデニン系化合物の変化も低アルギニン食の場合にのみ観察され、この変化はアデニン添加によってキャンセルされた (図2B)。一方で、このようなアデニン系化合物量への効果は、アデニン以外のアデニン代謝系化合物では観察されなかった (図2B)。さらに、個々のアデニン代謝系化合物 (アデニン、アデノシン、AMP、IMP) を低アルギニン食に添加して同様の解析を行なった結果、アデニンのみ脂肪肝を抑制する効果を示し、それ以外の化合物は抑制効果を示さなかった (図3A)。また興味深いことに、肝臓における化合物代謝を調べた結果、IMPの量変動が顕著であり、しかも肝臓脂肪量と逆の量変動を示すことが明らかになった (図3B)。これらの結果は低アルギニン食特異的にアデニン代謝系化合物を介した脂肪肝制御機構が存在する可能性を示している。

(2) 低アルギニン模倣培地で H4IIE 細胞を培養し、細胞内の中性脂肪量を調べた。その結果、対照培地で培養した場合と比べて、低アルギニン模倣培地では脂肪量は約2倍に増加することがわかった。これらの細胞において、アデニン、アデノシン、AMP、IMPの分析を行なった結果、対照培地、低アルギニン模倣培地のいずれにおいても、これらの化合物は検出できないほど低レベルであることがわかった (図4)。さらに、IMPの代謝阻害剤 (MPA および Alanosine) を低アルギニン模倣培地に添加して H4IIE 細胞を培養したところ、細胞内 IMP 量は十分に検出可能なレベルまで増加した。そこで、MPA および Alanosine 添加による細胞内脂肪量への影響を調べたところ、これらの阻害剤を添加することによって、低アルギニン模倣培地による細胞内脂肪量の増加は抑制された (図4)。これらの結果は、IMPの増加が脂肪蓄積を抑制することを示唆している。

(3) メチオニンコリン欠乏食、低アルギニン・コリン欠乏食、低アルギニン食を1週、4週、8週にわたってラットに給与し、肝臓脂肪量および NASH マーカー (血清 ALT) を解析した。その結果、メチオニンコリン欠乏食では1週間脂肪肝が誘導され、4週では脂肪蓄積はさらに顕著になり、この脂肪量は8週間まで維持された。NASH マーカーは4週で増加が認められ、8週間までそのレベルは維持された。一方で、低アルギニン・コリン欠乏食の場合には、1週~4週においてはメチオニンコリン欠乏と同レベルの脂肪肝を示したが、8週間給餌すると脂肪量は低下した。NASH マーカーの増加は見られなかった。また、低アルギニン食の場合にはさらにマイルドな影響のみ観察され、1週間給餌では他の飼料の場合と同レベルの脂肪肝が誘導されたが、4週間以降では脂肪量は対照食と遜色ないレベルまで低下した。この場合でも NASH マーカーは増加しなかった。これらの結果から、メチオニンコリン欠乏食では脂肪肝が誘導され、かつ NASH マーカーの増加も起こるが、アルギニン不足の場合には脂肪肝のみ観察され、NASH への遷移は起こらないことがわかった。

また、メチオニンコリン食を給与したラットの肝臓では、アデニン、アデノシンの低下は見られるものの、IMPの低下は観察されないことがわかった。さらに、アデニンをメチオニンコリン欠乏食に添加して肝臓脂肪のレベルを調べた結果、アデニン添加群の肝臓脂肪量はメチオニンコリン欠乏群と同等であった。

一連の結果は、アデニン代謝系化合物はメチオニンコリン欠乏のような NASH モデルにおける脂肪肝形成には関与しない一方で、アルギニン不足で誘導される単純脂肪肝の誘導に関与する可能性があることを示している。

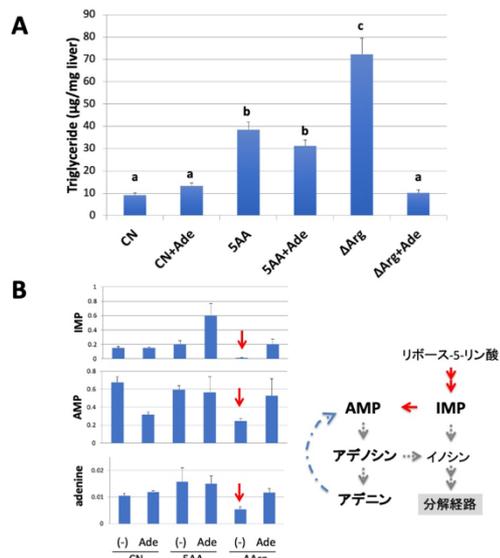


図2. 低アミノ酸食・低アルギニン食へのアデニン添加の影響  
低アミノ酸食 (5AA) または低アルギニン食 (ΔArg) にアデニン (Ade) を添加し、肝臓中性脂肪量 (A) や肝臓中のアデニン代謝系化合物の含量 (B) への影響を解析した。

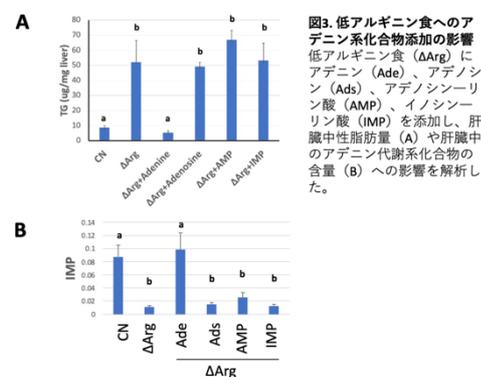


図3. 低アルギニン食へのアデニン系化合物添加の影響  
低アルギニン食 (ΔArg) にアデニン (Ade)、アデノシン (Ads)、アデノシンリン酸 (AMP)、イノシンリン酸 (IMP) を添加し、肝臓中性脂肪量 (A) や肝臓中のアデニン代謝系化合物の含量 (B) への影響を解析した。

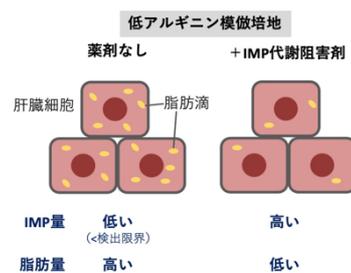


図4. 肝臓細胞における人為的なIMP増加の脂肪蓄積への影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroki Nishi, Daisuke Yamanaka, Masato Masuda, Yuki Goda, Koichi Ito, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Alteration of serum amino acid profiles by dietary adenine supplementation inhibits fatty liver development in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79234-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Goda Yuki, Yamanaka Daisuke, Nishi Hiroki, Masuda Masato, Kamei Hiroyasu, Kumano Mikako, Ito Koichi, Katsumata Masaya, Yamanouchi Keitaro, Kataoka Naoyuki, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro	4. 巻 297
2. 論文標題 Dietary lysine restriction induces lipid accumulation in skeletal muscle through an increase in serum threonine levels in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101179 ~ 101179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima Sara, Nishi Hiroki, Kumano Mikako, Yamanaka Daisuke, Kataoka Naoyuki, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro	4. 巻 24
2. 論文標題 A novel amino acid signaling process governs glucose-6-phosphatase transcription	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102778 ~ 102778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fumihiko Hakuno, Hiroki Nishi, Daisuke Yamanaka, Yuki Goda, Shin-Ichiro Takahashi
2. 発表標題 Serum amino acid profile conducts tissue-specific lipid metabolism regulation in response to protein nutritional status
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西宏起、福島沙良、山中大介、伯野史彦、高橋伸一郎
2. 発表標題 肝細胞におけるアミノ酸飢餓ストレスに対する代謝応答
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中大介、長田悠加、豊島由香、西宏起、大谷りら、合田祐貴、伯野史彦、竹中麻子、加藤久典、高橋伸一郎、伊藤公一
2. 発表標題 個々のアミノ酸に応答したインスリン様活性の調節
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田正人、西宏起、山中大介、高橋伸一郎、伯野史彦
2. 発表標題 血中アミノ酸プロファイルが肝臓への脂肪蓄積量を決定する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 合田祐貴、西宏起、山中大介、山内啓太郎、勝俣昌也、片岡直行、伯野史彦、高橋伸一郎
2. 発表標題 血中アミノ酸の低リジン高スレオニン状態は、骨格筋への脂質の蓄積を誘導する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中大介、増田正人、西宏起、合田祐貴、伯野史彦、高橋伸一郎、伊藤公一
2. 発表標題 メタボローム解析でわかるアミノ酸シグナルが肝細胞の脂肪蓄積に果たす役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

食と生体機能モデル学研究室ホームページ <a href="http://webpark1838.sakura.ne.jp">http://webpark1838.sakura.ne.jp</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------