

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08316

研究課題名(和文) 肝硬変患者における骨格筋代償能の血液生化学的評価法の開発

研究課題名(英文) Development of biochemical assessment method for skeletal muscle compensatory capacity in patients with liver cirrhosis

研究代表者

池上 正 (Ikegami, Tadashi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：40439740

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)：分岐鎖アミノ酸(BCAA)の異化状態を血液サンプルで評価できる代謝マーカーとして、BCAAの一つであるバリンの中間代謝物3-hydroxyisobutyrate (3HIB)に着目し、骨格筋の代謝能を定量的に評価する手法としようかどうかについて、モデル動物を用いた検討を行った。我々が開発した肝障害モデルである、ヒト型胆汁酸を有するCyp2c70/Cyp2a12ダブルノックアウト(DKO)マウスを用いて、筋萎縮やBCAA代謝について検討したところ、DKOマウスでは野生型に比べて有意な骨格筋重量、線維径の減少を認めた。DKOマウスでは血中3HIBが増加しており、フィッシャー比の低下がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆汁酸は様々な疾患との関連が報告されているが、動物モデルを用いた検討を行う場合、ヒトとの胆汁酸組成の種差が問題となり解釈が困難であることをしばしば経験してきた。我々が開発したDKOマウスはこの課題を克服し、ヒトと同様の胆汁酸組成が存在する状況下を作り出すことに成功し、現在様々な疾患モデルへの応用が開始されている。本研究はこのモデルを用いてBCAA代謝を検討している点が独創的であり、本研究はヒト型胆汁酸とサルコペニアの発症に関する新たな研究課題の発想につながった。また、骨格筋代償能の評価法として分岐鎖アミノ酸異化マーカー(3HIB)を用いた臨床研究が可能であることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We focused on 3-hydroxyisobutyrate (3HIB), an intermediate metabolite of valine, one of the BCAAs, as a metabolic marker that can be used to evaluate the catabolic state of branched-chain amino acids (BCAAs) in blood samples, and investigated whether it could be used as a method for quantitatively evaluating metabolic capacity in skeletal muscle using animal models. We used Cyp2c70/Cyp2a12 double-knockout (DKO) mice, a model of hepatic injury that we developed and in which human-type hydrophobic bile acids are present, to examine muscle atrophy and BCAA metabolism. Compared to the wild type, DKO mice showed significantly decreased skeletal muscle weight and fiber diameter, increased blood 3HIB, and decreased Fisher's ratio.

研究分野：肝臓病学、脂質・胆汁酸代謝、タンパク・アミノ酸代謝

キーワード：慢性肝疾患 肝硬変 骨格筋 分岐鎖アミノ酸 サルコペニア 胆汁酸

## 1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変患者では、蛋白・エネルギー低栄養が生じ、第2の肝臓と呼ばれる骨格筋が肝機能を代償する。骨格筋による肝機能代償は、患者のQOLや生命予後にとって重要であるが、その代償能を生化学的に定量化して評価する方法はなかった。分岐鎖アミノ酸(BCAA)は体内のエネルギー源として骨格筋のミトコンドリア内で代謝される。我々はBCAAの一つであるバリンが分解されてエネルギーに変換される際の間代謝物である低分子の3-hydroxyisobutirate (3HIB)に注目し、骨格筋から血液中に放出される3HIBを高感度に定量化する方法を確立した。3HIBは骨格筋BCAA燃焼に応じて血液中濃度が高まることから、骨格筋におけるBCAA異化状態を血液サンプルで評価できる代謝マーカーとしての有用性を評価し、肝硬変患者の血液で増加していることを見出した。血中3HIBの測定により骨格筋における代償能を定量的に評価できるのではないかと「問い」が生まれ、肝硬変患者のテーラーメイド栄養療法の確立に役立つと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、BCAAの一つであるバリンが骨格筋でエネルギー産生源として代謝される際に生じる中間代謝物の3HIBを骨格筋BCAAの異化マーカーとして利用することで、肝硬変患者における骨格筋の代償能を定量的に評価する手法として確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

「肝硬変症での血中3HIB濃度変化が、どの程度骨格筋BCAA異化状態を反映するか」について、肝硬変モデルマウスを作成し、骨格筋と血中の3HIB濃度の相関性とBCAA摂取後の反応について検証する

## 4. 研究成果

### (1) 肝硬変モデルマウスの作成

当初最も一般的に用いられている四塩化炭素の腹腔内投与にて肝硬変モデルマウスを作成する予定であったが、我々がラボ契約しているJackson Laboratoryの筑波飼育センターでこの薬剤を用いることが困難であった(揮発性劇物であり、安全上の問題があるため)。

同センターで使用可能なチオアセトアミド(TAA)を、腹腔内に反復投与して肝硬変モデルの作成を試みた。既報と同等量・同期間の間投与を継続したが、肝炎は発生したものの、想定していた肝硬変まで至る動物を得られず、このモデルについても使用を断念せざるを得なかった。

そこで、当時我々が開発した、ヒト型胆汁酸組成を有するモデルマウスを用いて、今回の研究に用いることにした。本モデルは野生型マウスの持つ、Cyp2a12(二次胆汁酸をコール酸に変換する酵素)並びにCyp2c70(ケノデオキシコール酸をムリコール酸に変換する酵素)をダブルノックアウトすることで(図1)、野生型マウスにはほとんど見られないケノデオキシコール酸やデオキシコール酸、リトコール酸といった疎水性胆汁酸を有するマウスとなる(文献1)。このマウスは飼育経過において、持続的に肝障害を起こすが、親水性胆汁酸であるウルソデオキシコール酸(UDCA)を投与することでこの肝障害は緩和される。一方、UDCA投与をせずに長期間飼育すると線維化が進行し、肝硬変に至ることが判明しており、今回はこのモデルをもとに検証を行った。

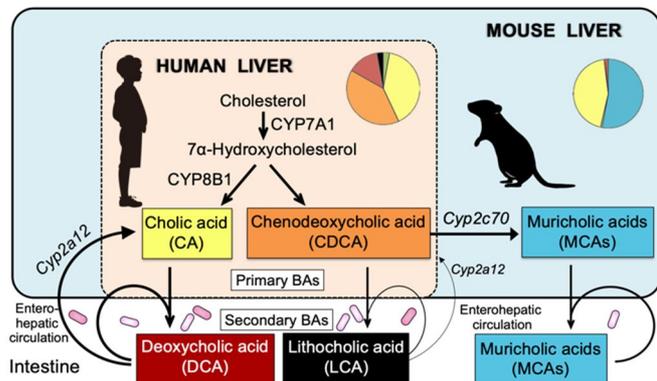


図1 ヒトとマウス胆汁酸代謝の違い

(2) ヒト型胆汁酸組成を有するマウスにおける筋萎縮と BCAA 異化マーカー

ヒト型胆汁酸組成を有するマウス(DKO マウス)では、15 週飼育の段階で野生型と比べ肝の炎症が有意に増加した。この週齢の動物を対照の野生型マウスと比較すると、図2のように体重あたりの骨格筋(腓腹筋)重量は減少し、また、骨格筋線維径も有意に減少していた。

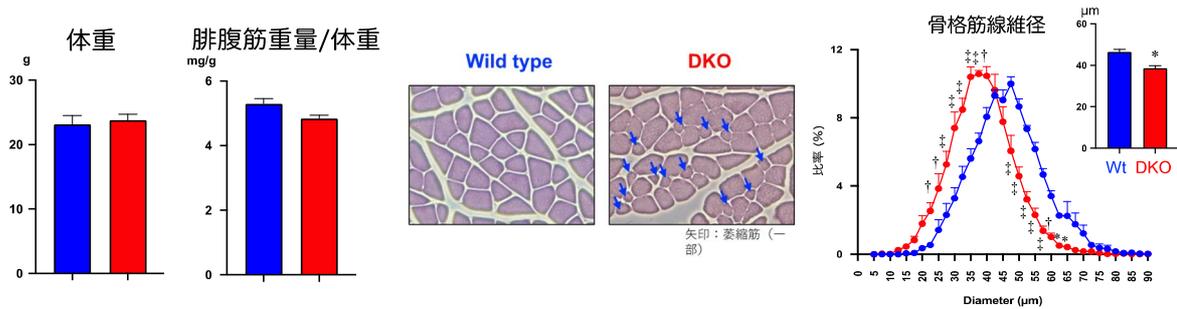


図2 DKO マウスにおける骨格筋減少(青:野生型、赤:DKO マウス)

BCAA 異化マーカーである血中 3HIB は DKO マウスで増加し、一方 BCAA と芳香族アミノ酸の比率を示すフィッシャー比は DKO マウスで減少しており、DKO マウスの骨格筋で BCAA の異化が亢進していることが示唆された(図3)。

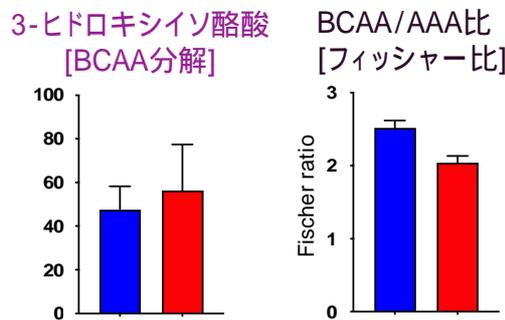


図3 DKO マウスにおける BCAA 代謝(青:野生型、赤:DKO マウス)

この実験結果から、ヒト型の疎水性胆汁酸の存在が BCAA の異化亢進に関与していることが示唆され、サルコペニア発症メカニズムとの関連について新たな研究の発想につながった。

(3) ヒト型胆汁酸組成を持つ MASLD マウスモデルにおける BCAA 代謝

ヒト型胆汁酸組成を有する DKO マウスに高ショ糖・高脂肪食を投与することにより、脂肪肝～脂肪肝炎～線維化進行～肝硬変(Burned out)～肝発癌という、ヒト MASLD の自然史をよく模倣したモデルを作成することが可能になった(投稿準備中)。このモデルにおける BCAA 代謝について検討すると、上記(2)で示された 3-HIB の増加は高ショ糖・高脂肪食投与軍では著明に減少しており(図4)、エネルギー源として糖質・脂質が用いられることで BCAA の異化が抑制されることが明らかであり、胆汁酸組成の変化による BCAA 異化の亢進はキャンセルされると推測された。

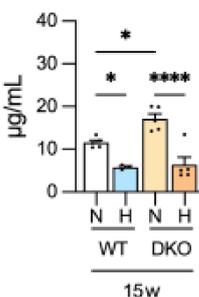


図4 ヒト胆汁酸組成を持つ MASLD マウスモデルの 3HIB 濃度(N: 通常食投与、H: 高ショ糖高脂肪食投与)

<引用文献>

1 Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Morishita Y, Monma T, Ueda H, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Ikegami T. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition. J Lipid Res 2020;61:54-69.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Iwamoto J, Honda A, Miyazaki T, Monma T, Ueda H, Morishita Y, Yara S, Hirayama T, Ikegami T	4. 巻 5(12)
2. 論文標題 Western diet changes gut microbiota and ameliorates liver injury in a mouse model with human-like bile acid composition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HepatoI Commun	6. 最初と最後の頁 2052-2067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1778	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 Monma T, Iwamoto J, Honda A, Ueda H, Kakizaki F, Yara S, Miyazaki T, Ikegami T	4. 巻 12(4)
2. 論文標題 Evaluation of the risk of Clostridium difficile infection using a serum bile acid profile	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12040331	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 Ueda H, Honda A, Miyazaki T, Morishita Y, Hirayama T Iwamoto J, Nakamoto N, Ikegami T	4. 巻 17(7)
2. 論文標題 Sex-, age- and organ-dependent improvement of bile acid hydrophobicity by ursodeoxycholic acid treatment: A study using a mouse model with human-like bile acid composition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLos One	6. 最初と最後の頁 e0271308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0271308. eCollection 2022	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 Monma T, Iwamoto J, Ueda H, Tamamushi M, Kakizaki F, Konishi N, Yara S, Miyazaki T, Hirayama T, Ikegami T, Honda A	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of gut dysbiosis using serum and fecal bile acid profiles (Review)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World J Clin Cases	6. 最初と最後の頁 12484-12988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12998/wjcc.v10.134.12484	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 Miyazaki T, Ueda H, Ikegami T, Honda A	4. 巻 13(7)
2. 論文標題 Upregulation of taurine biosynthesis and bile acid conjugation with taurine through FXR in a mouse model with human-like bile acid composition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo13070824	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 Miyazaki Teruo, Sasaki Sei-ich, Toyoda Atsushi, Shirai Mutsumi, Ikegami Tadashi, Honda Akira	4. 巻 1370
2. 論文標題 Impaired Bile Acid Synthesis in a Taurine-Deficient Cat Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 195-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-93337-1_19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 宮崎照雄, 池上正, 本多彰
2. 発表標題 ビタミンD受容体(VDR)を介した胆汁酸の骨格筋症状に及ぼす影響-胆汁酸ヒト化マウスを用いた検討-
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎照雄, 上田元, 池上正, 本多彰
2. 発表標題 胆汁酸の骨格筋エネルギー代謝に及ぼす影響-ヒト型胆汁酸マウスを用いた検討-
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teruo Miyazaki, Hajime Ueda, Tadashi Ikegami, Akira Honda
2. 発表標題 Involvements of bile acids on sarcopenia by regulations of muscular TGR5 and VDR activities in the double knockout mice with human-like bile acid composition
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎照雄, 上田元, 岩本淳一, 池上正, 本多彰
2. 発表標題 血中リトコール酸濃度の増加がサルコペニア発症に及ぼす影響
3. 学会等名 第43回胆汁酸研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田元, 本多彰, 宮崎照雄, 池上正
2. 発表標題 ヒト型の胆汁酸組成を有するマウスモデルにおけるウルソデオキシコール酸の影響
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本淳一, 本多彰, 宮崎照雄, 門馬匡邦, 池上正
2. 発表標題 西欧食による腸内細菌叢と胆汁酸代謝の変化: 胆汁酸ヒト化マウスを用いた検討
3. 学会等名 第42回胆汁酸研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teruo Miyazaki, Hajime Ueda, Tadashi Ikegami, Akira Honda
2. 発表標題 Aggravating effect of LCA administration on cholangitis occurring in a mouse model with human-like bile acid composition
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎照雄、池上正、本多彰
2. 発表標題 リトコール酸の胆汁酸受容体を介したサルコペニア発症に及ぼす影響 胆汁酸ヒト化マウスを用いた検討
3. 学会等名 第109回 日本消化器病学会総会 シンポジウム 「消化器疾患とサルコペニア・フレイル」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎照雄、上田元、岩本淳一、池上正、本多彰
2. 発表標題 疎水性胆汁酸マウスを用いた硬化性胆管炎モデルの開発
3. 学会等名 第44回 胆汁酸研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hajime Ueda, Akira Honda, Teruo Miyazaki, Tadashi Ikegami
2. 発表標題 The role of hydrophobic bile acids in the progression to NASH by using a mouse model with human-like bile acid composition
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hajime Ueda, Akira Honda, Teruo Miyazaki, Tadashi Ikegami
2. 発表標題 Hydrophobic bile acids accelerate NAFLD-associated HCC development in a mouse model with human-like bile acid composition
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田元, 本多 彰, 宮崎照雄, 池上正
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 発癌モデルマウスにおける疎水性胆汁酸の役割
3. 学会等名 JDDW 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田元, 宮崎照雄, 本多彰, 池上正
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) / 肝細胞癌 (HCC) モデルマウスにおける疎水性胆汁酸の役割
3. 学会等名 第44回胆汁酸研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	本多 彰  (Honda Akira)  (10468639)	東京医科大学・医学部・教授   (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	宮崎 照雄  (Miyazaki Teruo)  (60532687)	東京医科大学・医学部・准教授     (32645)	

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