

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08322

研究課題名(和文) 肝細胞脂肪変性における遊離アミノ酸の細胞内ストレス応答機構に与えるインパクト

研究課題名(英文) Impact of free amino acids on intracellular stress response mechanisms in hepatic steatosis.

研究代表者

嘉数 英二 (Kakazu, Eiji)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20509377

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)：高脂肪・メチオニン(Met)制限・チロシン(Tyr)欠乏食を与えたマウスでは、肝臓でNrf2の核移行、成熟VLDLの放出、肝臓内フマル酸レベルが低下しNAFLD様病態を示した。肝臓特異的Keap1欠損マウスではこれらの現象が改善し、このマウスの肝オルガノイドでも、MetとTyrの欠乏で惹起される活性酸素種(ROS)と脂肪滴が抑制された。Nrf2誘導剤であるフマル酸ジメチルは、in vitroにおいて肝細胞内のフマル酸を増加させ脂肪変性を改善した。これらの結果からアミノ酸であるMetおよびTyrの欠乏は、Keap1-Nrf2システムを介して脂肪肝を誘発する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

これまで糖・脂質代謝からNAFLD/NASHの病態を解析した報告は多く存在するが、本研究はアミノ酸代謝とNAFLD/NASHの病態を説明した新しいアプローチの研究である。本研究により過剰な糖質・脂質の摂取だけでなく一部のアミノ酸の欠乏がNASH病態に関与していることが明らかとなった。糖尿病やNAFLD/NASHの食事療法として低糖質・低脂肪・高たんぱく食が推奨されているがその根拠となる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：We elucidated that mice fed a High Fat, methionine (Met) restricted and tyrosine (Tyr) deficient diet showed the NAFLD-like phenotype in which the nuclear translocation of Nrf2, triglyceride-rich VLDL and fumarate were decreased in liver but liver specific Keap1 KO mice ameliorated these phenomena. Reactive oxygen species and LDs induced by the deprivation of Met and Tyr were prevented in hepatic organoids generated from the Keap1 KO mice. Dimethyl fumarate, a Nrf2 inducer ameliorated the steatosis and increased the hepatic fumarate reduced by the deprivation of Met and Tyr in vitro. OA / Met or Tyr ratio in peripheral blood were associated with the hepatic steatosis in NAFLD patients. Conclusion: an imbalance between free fatty acids and Met and Tyr induces hepatic steatosis by disturbing the VLDL assembling via the Keap1-Nrf2 system.

研究分野：肝疾患

キーワード：NAFLD NASH アミノ酸 VLDL

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

飽食の時代背景を基に全世界で肥満・糖尿病が増加しており、それに伴い非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) も急増している。約 25% の NAFLD は NASH に進行することが知られ、現在、NASH に対する治療薬はなく食事・運動療法が中心であるため、病態解明・バイオマーカーの同定・治療薬開発は急務である。NASH 発症機序は不明であるが、病理学上 肝細胞脂肪変性 肝細胞風船様変化 炎症細胞浸潤 線維化が特徴であり、<sup>1</sup> は肝細胞に中性脂肪 (TG) の蓄積とアポトーシスを起こした現象、<sup>2</sup> は肝細胞周囲にマクロファージ、肝星細胞が集積・活性化し炎症・線維化を起こした現象である。

過栄養状態では門脈血由来の過剰な糖質・飽和脂肪酸による糖毒性や脂肪毒性が肝細胞内に酸化ストレスや小胞体ストレスを与える。ストレス回避機構として酸化ストレスには Keap1-Nrf2 システム、小胞体ストレスには小胞体ストレス応答 (PERK, IRE1, ATF6) が存在する。過剰な糖質・脂質がこれらの肝細胞ストレスセンサーを活性化することは証明されているが、遊離アミノ酸との関係はあまり知られていない。先行研究において脂肪肝になっているレプチン欠損マウス (ob/ob マウス) の空腹時門脈血中ではグルコース濃度や遊離脂肪酸濃度が野生型マウスと比較して有意に高いが 7 種類の遊離アミノ酸が有意に低下していることを見出した。本研究ではこの門脈血中遊離アミノ酸不均衡に着目し肝細胞脂肪変性における遊離アミノ酸のかかわりを探求する。

### 2. 研究の目的

肝細胞脂肪変性に関与する遊離アミノ酸を同定し、細胞内ストレスを介したメカニズムを明らかにすること。

### 3. 研究の方法

#### I. 細胞実験

先行研究で独自に開発した門脈血類似 3 次元灌流培養法を用いて門脈血で低下した遊離アミノ酸の中で L-Methionine (Met) と L-Tyrosine (Tyr) の濃度を改変し肝細胞脂肪変性と酸化ストレスを評価した。細胞は SV40 マウス不死化肝細胞およびオルガノイドを使用した。肝細胞内の脂肪滴、ROS を蛍光顕微鏡、flow cytometry で評価し、酸化ストレス応答 Keap1-Nrf2 の発現はウェスタンブロットで評価した。

#### II. 動物実験

本研究期間では Met/Tyr による脂肪肝形成の Keap1-Nrf2 の依存性を明らかにするために、山本ら (東北大学医科学分野) の協力を受け Alb-cre マウスと Keap1(flox/flox) および Nrf2(flox/flox) マウスから肝臓特異的 Keap1, Nrf2 ノックアウトマウスの提供を受け、高脂肪・メチオニン制限チロシン欠損食で飼育しコントロールマウスとの比較を行った。肝臓内の Keap1, Nrf2 の発現 (核内移行)、GRP78, ATF4 の発現を解析した。肝臓からの VLDL 放出を解析するために血中リポ蛋白質解析を (LipSEARCH® に受託) 行った。

#### III. 患者検体

NAFLD/NASH 患者の末梢血中遊離アミノ酸分析結果と肝臓病理標本を後ろ向きに解析し、血中 Met/Tyr 濃度と肝臓病理学的所見 (肝細胞脂肪化、肝細胞風船様腫大、線維化) との相関関係を評価した。

### 4. 研究成果

メタボローム解析 (CE-TOFMS) により NAFLD モデルマウス ob/ob マウスの門脈血では Met・Tyr を含む 7 種類のアミノ酸が有意に低下しており、その環境を左舷するため野生型マウスと ob/ob マウスの門脈血のアミノ酸濃度を一致した培地をそれぞれ作成した (PBM-wt、PBM-ob)。これらの培地でオレイン酸を負荷した肝細胞を培養すると PBM-ob 下で培養肝細胞中の脂肪滴が有意に多くなるが、Met・Tyr 添加により濃度依存的に脂質放出を促進し細胞内脂質を減少させた。この現象に伴い Met・Tyr 欠損培地下では VLDL の分泌に関与する ApoB-MTP の結合は亢進するが MTP 活性は低下していた。更に Met・Tyr 欠損培地下ではオレイン酸添加による細胞内フマル酸の増加が完全に抑制され核内 Nrf2 の低下、活性酸素種 (ROS) 蓄積を認めた。Nrf2 活性化剤として知られているフマル酸ジメチル (DMF) の添加により細胞内フマル酸増加に伴い肝細胞内脂質および ROS は減少する一方で、フマル酸合成阻害剤により肝細胞内脂質は増加した。動物実験において野生型マウスでは高脂肪・低 Met・Tyr 欠損食により NAFLD 表現型を呈し、肝組織のフマル酸レベル低下に伴い核内 Nrf2 レベルも高脂肪食群マウスに比べ低下した。また末梢血中の TG-rich の成熟 VLDL が低下した。興味深いことに Nrf2 が恒常的に活性化する肝臓特異的 Keap1K0 マウスでは低 Met・Tyr 食による NAFLD 進展が抑制され、更に Keap1K0 マウス由来肝オルガノイドでも Met・Tyr 欠損培地による脂肪変性が抑制された。細胞実験、動物実験の結果を反映して

NAFLD 患者の脂肪滴定量データと遊離脂肪酸 (FFA) /Met、FFA/Tyr 比に相関関係を認めた。以上の結果から、NAFLD/NASH では門脈血中の過剰なグルコース、脂肪酸により肝臓に脂肪毒性 (Lipotoxicity) がかかりそれを回避するために酸化ストレス応答 Keap1-Nrf2 機構が働くが、Met, Tyr の欠乏が生じるとその応答機構が正常に機能せずに病態が悪化することを示した。これらの研究成果を論文として報告した (Sano A, Kakazu E, et al. Hepatology. 2021 Sep;74(3):1271-1286.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sano Akitoshi, Kakazu Eiji, Hamada Shin, Inoue Jun, Ninomiya Masashi, Iwata Tomoaki, Tsuruoka Mio, Sato Kosuke, Masamune Atsushi	4. 巻 74
2. 論文標題 Steatotic hepatocytes release mature VLDL via methionine and tyrosine metabolism in a Keap1 Nrf2 dependent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 -1271-1286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.31808	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 -

1. 著者名 Masaaki Mino, Eiji Kakazu, Akitoshi Sano, Hisayuki Katsuyama, Mariko Hakoshima, Hidekatsu Yanai, Yoshihiko Aoki, Masatoshi Imamura, Taiji Yamazoe, Taizo Mori, Sachiyo Yoshio, Jun Inoue, Atsushi Masamune, Tatsuya Kanto	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and pioglitazone on FIB-4 index in metabolic-associated fatty liver disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13898.	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 嘉数英二、佐野晃俊、正宗淳
2. 発表標題 脂肪変性肝細胞のVLDL放出における酸化ストレス応答と遊離アミノ酸の関係
3. 学会等名 第7回肝臓と糖尿病・代謝研究会 シンポジウム3（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akitoshi Sano, Eiji Kakazu, Jun Inoue, Masashi Ninomiya, Tomoaki Iwata, Mio Tsuruoka, Kosuke Sato, Atsushi Masamune.
2. 発表標題 Steatotic hepatocytes release mature very-low-density lipoprotein via methionine and tyrosine metabolism in a Keap1-Nrf2 dependent manner.
3. 学会等名 米国肝臓学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嘉数英二、美野正彰、考藤達哉
2. 発表標題 フマル酸ジメチルの酸化ストレス応答機構 Keap1-Nrf2系を介した NASH 進展抑制効果
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会 ワークショップ3
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美野 正彰、嘉数 英二、 考藤 達哉
2. 発表標題 肝硬変アミノ酸不均衡を再現した新規培養系によるサルコペニア改善アミノ酸の探求
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会 パネルディスカッション7
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaaki Mino, Eiji Kakazu, Toshihiro Sakata, Shiori Yoshikawa, Taizo Mori, Taiji Yamazoe, Sachiyo Yoshio, Tatsuya Kanto
2. 発表標題 Supplementation of five amino acids promotes myoblast differentiation in cirrhotic condition in vitro
3. 学会等名 アジア太平洋肝臓学会 (APASL) Oncology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嘉数英二 美野正彰 佐野晃俊 阪田敏聖 筒井由梨子 吉川詩織 山添太士 森 泰三 由雄祥代 考藤達哉
2. 発表標題 フマル酸ジメチルのNrf2活性化によるNASH進展抑制効果と肝細胞内アミノ酸代謝に与える影響
3. 学会等名 第30回日本消化器関連学会週間 (JDDW)
4. 発表年 2022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	濱田 晋 (HAMADA SHIN) (20451560)	東北大学・医学系研究科・助教  (11301)	
研究分担者	岩田 朋晃 (IWATA TOMOAKI) (30803647)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師  (11301)	
研究分担者	井上 淳 (INOUE JUN) (60455821)	東北大学・大学病院・助教  (11301)	
研究分担者	小暮 高之 (KOGURE TAKAYUKI) (70400330)	東北医科薬科大学・医学部・准教授  (31305)	
研究分担者	二宮 匡史 (NINOMIYA MASASHI) (70583938)	東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教  (11301)	

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
---------	---------