

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790643

研究課題名（和文）肝硬変で出現するアミノ酸不均衡が免疫細胞（樹状細胞）  
に与える影響について研究課題名（英文）The study of amino acids imbalance which influences the immune cells,  
especially dendritic cells, in patients with advanced cirrhosis.

研究代表者

嘉数 英二（KAKAZU EIJI）

東北大学・病院・医員

研究者番号：20509377

研究成果の概要（和文）：

肝臓は栄養・代謝に関与する最重要臓器であり、肝硬変患者では血漿中アミノ酸不均衡が出現する。このアミノ酸不均衡が易感染性宿主である肝硬変患者の免疫機構に与える影響を研究した。肝硬変患者に出現する分岐鎖アミノ酸の低下が、免疫機構の重要細胞である樹状細胞の活性化を抑制し、更に分岐鎖アミノ酸を肝硬変患者に経口投与することでその活性化が改善できることを明らかにした。肝硬変患者のアミノ酸不均衡、特に分岐鎖アミノ酸の低下を補正する事で感染症などの合併症を予防できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the function of myeloid dendritic cells using a serum free culture medium consistent with the average concentration of plasma amino acids from healthy controls or advanced cirrhotic patients to reflect more closely the actual environment of the living body. Elevating the extracellular concentration of BCAAs improved the maturation of dendritic cells in patients with advanced cirrhosis. Elevating the extracellular concentration of BCAAs seems to be beneficial for improving the functions of dendritic cells in advanced cirrhotic patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝硬変、分岐鎖アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

（1）厚生労働省の報告によると平成20年の死亡原因において肝疾患は16229人、肝臓癌は33660人と肝臓関連死の割合は極めて高く、これらの患者の大部分に肝硬変が存在する。進行した肝硬変では免疫機構の異常をきたし、進行した肝硬変では免疫機能異常に

より、肺炎・特発性細菌性腹膜炎などの細菌感染が予後を大きく左右することが知られている。一方で肝硬変患者では分岐鎖アミノ酸を始めとした血漿中のアミノ酸異常が出現する。更に、近年アミノ酸はただ単に細胞骨格や様々な代謝経路の基質となるだけでなく、mTORなどの栄養感受性シグナル経路

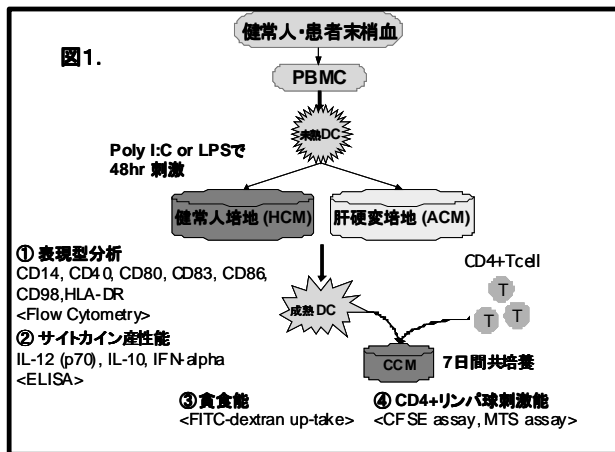
に作用し、細胞機能を調節する事が解明されてきている。

## 2. 研究の目的

進行した肝硬変に出現する血漿アミノ酸不均衡が免疫機構に与える影響を解析することを目的とした。今回は免疫機構の中心細胞である樹状細胞に与える影響を解析した。更に分岐鎖アミノ酸製剤を肝硬変患者に投薬することでその機能が改善できるかどうかも検討した。

## 3. 研究の方法

健常人と非代償性肝硬変患者の血漿中アミノ酸濃度に一致したアミノ酸組成をもつ無血清培地を作成し、その培地下で健常人・肝硬変患者より採取した樹状細胞 (DC) の機能を解析した。(図 1.) 樹状細胞機能の解析法としては、①表現型(フローサイトメトリー CD14 CD40 CD83 CD86 CD98 HLA-DR)、②サイトカイン産生能(ELISA IL-10, IL-12)、③食食能(FITC-dextran uptake)、④CD4+リンパ球刺激能(CFSE assay 又は MTS assay)、⑤細胞内シグナル(Western Blotting)をおこなった。更に、ex vivo の検討として、非代償性肝硬変患者 5 人において早朝空腹時に水 100mL で BCAA 顆粒 (リーバクト®) 1 包を内服し内服前・60 分後の自家血漿下で PBMC を刺激しサイトカインの産生を ELISA で測定した。



## 4. 研究成果

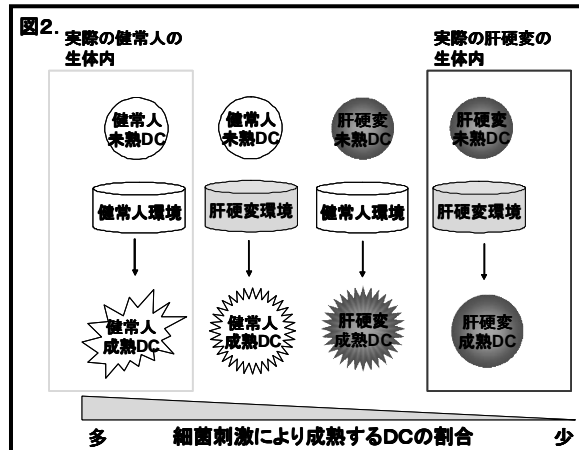
まず免疫細胞全体の反応として、健常人の PBMC を HCM, ACM 下で刺激したところ ACM 下では PBMC からの IFN- $\gamma$  の産生が有意に低下した。次に BDCA1+DC の刺激後の表現型を HCM, ACM 下で比較したところ ACM では HCM と比較し成熟化マーカーである CD83, CD86 の発現が有意に低下していた。培養上清中のサイトカイン測定では ACM 下では有意に IL-12 の産

生が低下した。CD4+リンパ球刺激能も ACM 下では低下を認め、食食能に関しては両培地間で差を認めなかった。これらの現象に合わせて、BDCA1+DC の細胞内のシグナルを解析したところ ACM 下では mTOR signal の下流である S6K のリン酸化が抑制されていた。

これまでの結果から肝硬変のアミノ酸環境下では刺激時の樹状細胞 mTOR signal・成熟化が抑制され PBMC からの IFN- $\gamma$  の産生が抑制されることが明らかとなった。

同様な検討を非代償性肝硬変患者の BDCA1+DCs においても解析を行った。刺激前の表現型は健常人と差を認めないものの、刺激し後では非代償性肝硬変患者の成熟化マーカー (CD83, CD86) の発現は HCM, ACM いずれにおいても健常人よりも有意に低下していた。興味深いことに健常人と同様に非代償性肝硬変患者の BDCA1+DCs においても HCM と比較して ACM 下では CD83, CD86 の発現が有意に低下していた。つまり、非代償性肝硬変患者では樹状細胞自体が成熟抑制にあるだけでなく周囲のアミノ酸インバランスが成熟を抑制することが明らかとなった。(図 2.)

最後に ex vivo の検討では、非代償性肝硬変患者は BCAA 内服後 60 分後に血中濃度が最高値に達し、内服前の血漿と 60 分後の自家血漿下で PBMC を刺激したところ後者で有意に PBMC からの IFN gamma 産生が上昇した。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Kondo Y, Ueno Y, Kakazu E, Kobayashi K, Shiina M, Tamai K, Machida K, Inoue J, Wakui Y, Fukushima K, Obara N, Kimura O, Shimosegawa T. Lymphotropic HCV strain can infect human primary naïve CD4+ cells and

affect their proliferation and IFN- $\gamma$  secretion activity.

J Gastroenterol. 2011, 46(2):232-41. 査読あり

2. Kimura O, Takahashi T, Ishii N, Inoue Y, Ueno Y, Kogure T, Fukushima K, Shiina M, Yamagiwa Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Iwasaki T, Kawagishi N, Shimosegawa T, Sugamura K. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. Cancer Sci 2010, 101:2145-55. 査読あり

3. Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Wakui Y, Tanaka Y, Ninomiya M, Obara N, Fukushima K, Ishii M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kon S, Shimosegawa T. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. J Infect Dis 2010, 202:202-13. 査読あり

4. 嘉数英二 肝硬変患者の免疫機構に関与する遊離アミノ酸の研究  
東北医学会雑誌 122 巻 30-32 2010 査読なし

5. Obara N, Fukushima K, Ueno Y, Wakui Y, Kimura O, Tamai K, Kakazu E, Inoue J, Kondo Y, Ogawa N, Sato K, Tsuduki T, Ishida K, Shimosegawa T. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. J Hepatol 2010, 53:326-34. 査読あり

6. Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. Biochem Biophys Res Commun 2010, 399:384-90. 査読あり

7. Wakui Y, Inoue J, Ueno Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, Obara N, Kimura O, Shimosegawa T. Inhibitory effect on hepatitis B virus in vitro by a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligand, rosiglitazone. Biochem Biophys Res Commun 2010, 396:508-14. 査読あり

8. Kakazu E, Ueno Y, Kondo Y, Fukushima K, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Ninomiya M, Shimosegawa T. Branched chain amino acids

enhance the maturation and function of myeloid dendritic cells ex vivo in patients with advanced cirrhosis. Hepatology 2009;50:1936-45. 査読あり

9. Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Akahane T, Fukushima K, Kogure T, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Kido O, Nakagome Y, Ninomiya M, Obara N, Wakui Y, Takahashi M, Okamoto H, Shimosegawa T. Sporadic acute hepatitis E occurred constantly during the last decade in northeast Japan. J Gastroenterol 2009;44:329-37. 査読あり

10. 嘉数英二, 上野義之, 菅野記豊, 下瀬川徹 肝硬変でのアミノ酸代謝異常が樹状細胞に与える影響  
肝・胆・膵 58 巻 2 号:247-254 2009 査読なし

11. 嘉数英二, 上野義之, 近藤泰輝, 下瀬川徹 非代償性肝硬変で出現する血漿アミノ酸 imbalance は樹状細胞成熟化を抑制し、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) により改善する  
「薬理と治療」VOL 37 Supplement 93-98 2009 査読なし

12. 嘉数英二, 上野義之, 近藤泰輝, 下瀬川徹 非代償性肝硬変におけるアミノ酸 imbalance が免疫機構に及ぼす影響。  
消化器科 Vol. 49 No. 2 190-196 Aug/2009 査読なし

[学会発表] (計5件)

1. 嘉数英二 上野義之 近藤泰輝 福島耕治 井上淳 二宮匡史 涌井祐太 岩崎隆雄 下瀬川徹 L-cystine はLPS 刺激時の単球からのTNF- $\alpha$  産生を高め、非代償性肝硬変の腎機能低下に関与する JDDW 2010 年 10/13 ~10/17 横浜

2. EIJI KAKAZU, YOSHIYUKI UENO, YASUTERU KONDO, KOJI FUKUSHIMA, MASA AKI SHIINA YOKO YAMAGIWA, JUN INOUE, KEIICHI TAMAI, NORIYUKI OBARA, OSAMU KIMURA, YUTA WAKUI TOORU SHIMOSEGAWA Branched-chain amino acids improve the maturation of dendritic cells in patients with advanced cirrhosis ex vivo. APASL 2010 年 3/25~3/28 北京

3. EIJI KAKAZU, YOSHIYUKI UENO, YASUTERU KONDO, KOJI FUKUSHIMA, MASA AKI SHIINA, YOKO YAMAGIWA, JUN INOUE, KEIICHI TAMAI, TOORU SHIMOSEGAWA An imbalance in plasma amino acids of advanced cirrhotic patients impairs the maturation of dendritic cells

via mTOR/S6K signaling pathway. APASL 2010  
年 2/12~2/16 香港

4. 嘉数英二 上野義之 近藤泰輝 福島  
耕治 山極洋子 椎名正明 井上 淳 玉  
井恵一 二宮匡史 城戸治 中込悠  
小原範之 木村修 涌井祐太 岩崎隆  
雄 下瀬川徹 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の樹  
状細胞成熟化に対する影響と BCAA 製剤内服  
後の血行動態が末梢血単核球に与える影響  
について 肝臓学会総会 2009 年 6/5 神戸

5. 嘉数英二 非代償性肝硬変のアミノ酸イ  
ンバランスが樹状細胞成熟化に及ぼす影響  
について 肝臓学会総会 2009 年  
6/4 神戸

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

嘉数 英二 (KAKAZU EIJI)

東北大学・病院・医員

研究者番号：20509377

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )