

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20915

研究課題名（和文）脂肪肝の細胞ストレス応答に關与するTCA回路中間体の解析と治療応用に向けた研究

研究課題名（英文）Analysis of TCA cycle intermediates related intracellular stress response on fatty liver

研究代表者

佐野 晃俊（SANO, AKITOSHI）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：20906060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪肝を含む慢性肝疾患では筋肉量減少（サルコペニア）が進行しやすく、サルコペニアの存在は肝疾患の予後を悪化させる。本研究ではマウス筋芽細胞を用いた細胞実験において、慢性肝疾患による肝機能の低下で上昇するアンモニアによって、TCA回路中間体のインバランスが生じ、Nrf2の核内発現が低下することで酸化ストレス感受性が亢進することが示唆された。本研究により、TCA回路中間体やKeap1-Nrf2システムに着目した治療開発につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肝疾患では筋肉量減少（サルコペニア）が進行しやすいとされており、サルコペニアの存在は肝疾患の予後を悪化させる。疾患人口も高齢化が進み、今後サルコペニアの対策はより重要視されると推測されるが、治療法は確立していない。肝硬変にサルコペニアが合併しやすい病態は、蛋白エネルギー低栄養や門脈圧亢進症の存在など多岐に渡るが、これまで細胞のストレス反応に着目した報告は少なかった。本研究では、肝障害によって血中に上昇するアンモニアによって、クエン酸回路の代謝産物やストレス応答を調整する因子（Nrf2）の変化を介してストレスへの感受性を亢進させる可能性が示唆され、今後の治療応用に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Chronic liver disease is associated with progressive muscle loss (sarcopenia), and the presence of sarcopenia worsens the prognosis of liver disease. In vitro experiments using mouse myoblasts, it was suggested that ammonia, which is elevated by impaired liver function due to chronic liver disease, causes an imbalance in TCA circuit intermediates, resulting in decreased nuclear expression of Nrf2 and increased susceptibility to oxidative stress. This study may lead to the development of therapies focused on TCA cycle intermediates and the Keap1-Nrf2 system.

研究分野：肝臓病

キーワード：慢性肝疾患 肝硬変 酸化ストレス TCA回路 サルコペニア

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は肥満人口の増加とともに世界的に急増している慢性肝疾患である。肝硬変・肝がんの原因となりうるため対策が必要であるが、現時点では食事・運動療法による減量が治療のメインであり、有効な薬物療法は確立されていない。我々の先行研究では、脂肪肝において門脈血中の L-methionine、L-tyrosine の低下が TCA 回路の中間体であるフマル酸代謝を介して酸化ストレス応答 (Keap1-Nrf2 system) に関与し、NAFLD の病態進行に関与している可能性が示された。Keap1-Nrf2 制御系は、生体の酸化ストレス応答において重要な役割を担う調節機構である。通常状態では転写因子である Nrf2 は細胞質タンパク質の Keap1 と結合し Nrf2 の核内移行が阻害され、プロテアソーム系により分解される(25)。酸化ストレスに暴露すると、Keap1 のシステイン残基が修飾を受け Keap1 の抑制機構が解除され、核内に移行した Nrf2 が酸化ストレス防御遺伝子の発現を誘導する。Nrf2 ノックアウトマウスでは脂肪肝が悪化するなど、Keap1-Nrf2 制御系による酸化ストレス防御機構は慢性肝疾患の病態に抑制的に働くとの報告が多いが、現時点で解析は十分ではない。我々の先行研究では、フマル酸を始めとする TCA 回路中間体が Keap1 に作用し Keap1-Nrf2 系に影響し、これらが治療ターゲットとなる可能性を示した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、NAFLD を始めとする慢性肝疾患における TCA 回路中間体に着目し病態との関連を検討し治療ターゲットを探索することである。

### 3. 研究の方法

C57BL/6 マウスに FFC diet を与え NASH モデルマウスを作成した。同時にフマル酸前駆物質であるフマル酸ジメチル (DMF) 100mg/kg/day を 20 週間投与し、肝病理像・血清学的所見を評価した。

マウス骨格筋由来筋芽細胞株 C2C12 を DMEM 培地でコンフルエントまで培養後、分化培地(2%ウマ血清含有 DMEM 培地)に切り替え、様々なアンモニア濃度に暴露することによる ROS の蓄積についてフローサイトメトリー等で評価した。myosin heavy chain (MYH) タンパクや核内の Nrf2 タンパク等のストレス応答因子についてウエスタンブロット法で評価した。筋管における TCA 回路中間体について吸光度測定により評価した。さらに進行肝硬変患者のアミノ酸濃度に一致させた培地 (Amino Acid-modified Medium: AMM (Kakazu E, et al. Hepatology. 2009 Dec; 50(6):1936-45)) の L-glutamine を GlutaMAX™ に置換した培地を用いて同様の検討を実施した。

また、肝硬変患者約 700 例の血中代謝産物を含むデータベースを作成し、予後や筋肉量との関連と統計学的に検討した。

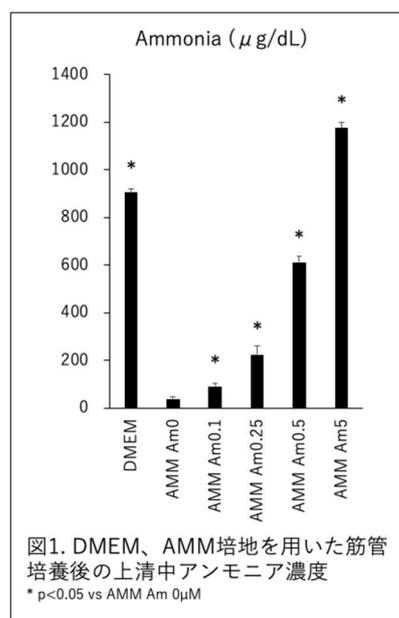


図1. DMEM、AMM培地を用いた筋管培養後の上清中アンモニア濃度

### 4. 研究成果

初年度の検討では高脂肪食 (FFC diet) に加え Fumarate の前駆体であるジメチルフマル酸を投与した群は、体重増加が抑制された。しかし検討を進めると、長年に飼育することで一部のマウスに肝線維化所見、または肝内結節を認めた。体重減少効果もジメチルフマル酸の毒性に起因する可能性があり、それ以上の検討は断念した。

慢性肝疾患において近年は骨格筋の減少(サルコペニア)が予後に強く影響すると報告されているが、治療法は確立されていない。骨格筋は酸化ストレスにさらされやすく、ROS の蓄積は骨格筋維持に影響する。一方で、慢性肝疾患で増加する血中のアンモニアは、筋肉で代謝される際に一部の TCA 回路中間体を消費する。

そこで、慢性肝疾患における筋組織において、高アンモニア血症が TCA 回路中間体を介して Keap1-Nrf2 に作用し酸化ストレス応答に影響するのではないかと仮説を立て検討した。

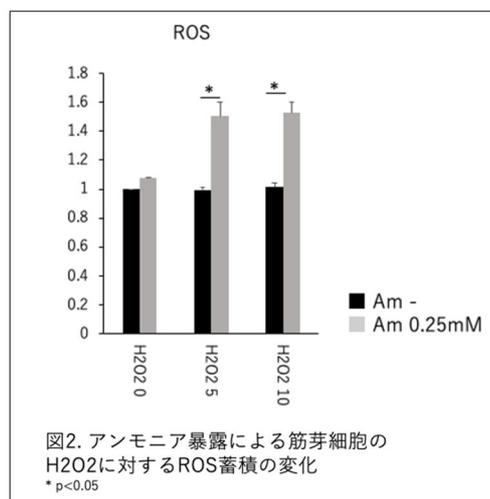


図2. アンモニア暴露による筋芽細胞の H2O2 に対する ROS 蓄積の変化

通常の細胞培養液(DMEM)にはL-グルタミンが多量に含まれるため通常培養のみでもアンモニアが多量に産生されることがわかり、アンモニア添加実験には不向きであることが分かった。そこで、生体内の条件を適切に反映させるために慢性肝疾患のアミノ酸組成に一致させた培地(AMM)を使用し、L-グルタミンはGlutaMAX™で置換することにより、アンモニア添加によって適切に濃度勾配をつけられる培養系を確立した(図1)。アンモニア0.25mM添加下の筋管細胞では、MYH蛋白の発現が低下し、またH2O2感受性が亢進しROSの蓄積が亢進した(図2)。その一方で核内のNrf2蛋白発現は抑制されていた(図3)。またアンモニア添加下におけるTCA回路中間体を測定すると、KG、Fumarateの低下を認め、これらのTCA回路中間体が慢性肝疾患における筋組織での酸化ストレス感受性亢進に關与する可能性が示唆された。上記実験結果は2023年6月に開催される第59回日本肝臓学会総会にて報告予定である。

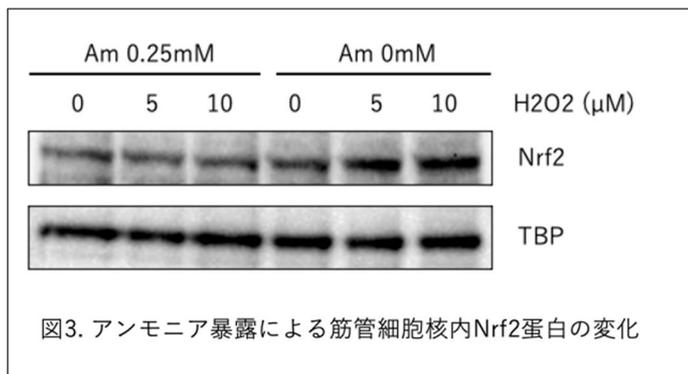


図3. アンモニア暴露による筋管細胞核内Nrf2蛋白の変化

臨床検討では、約700例の代謝産物データベースを含む肝硬変患者データベースを作成し、各種代謝産物と肝硬変患者の予後、筋肉量との関連について統計学的に検討した。その結果、微量元素である亜鉛は血漿BCAAと強い相関関係を示し( $R=0.46$ ,  $p<0.0001$ )、アルブミン値を含めた重回帰分析でもBCAAレベルに關与する変数であった( $p<0.0001$ )。そしてアルブミン値を含めた多変量解析

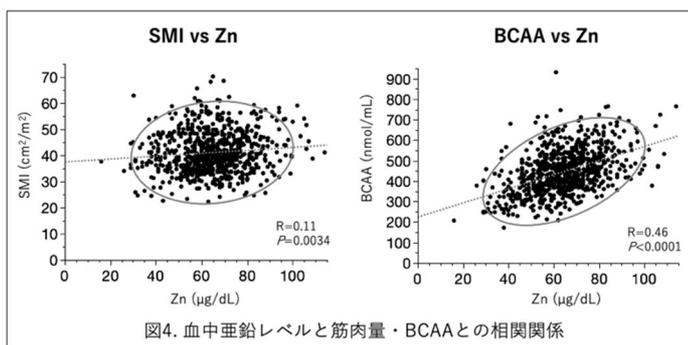


図4. 血中亜鉛レベルと筋肉量・BCAAとの相関関係

においてサルコペニアにも關連する独立因子であることがわかり(OR: 0.9834(0.9724-0.9946)、 $P=0.0035$ )、プロペンシティスコアマッチングを用いた比較検討においても亜鉛低下群において筋肉量は有意に低値であった( $p=0.0044$ )。第58回日本肝臓学会総会で報告した(図4)。

さらに血中脂肪酸組成と筋肉量にも相関関係があることが分かった。脂肪酸分画のうち、筋肉量と有意な相関関係を認めたのはn-3多価不飽和脂肪酸のみであった(図5)。多変量解析においてもn-3多価不飽和脂肪酸の低下は筋肉量の低下に關連する独立変数であった。また多価不飽和脂肪酸組成の低い患者群はその予後も悪化することがわかり、この内容は第58回日本肝臓学会総会の主題演題で報告したほか、現在論文投稿中である。

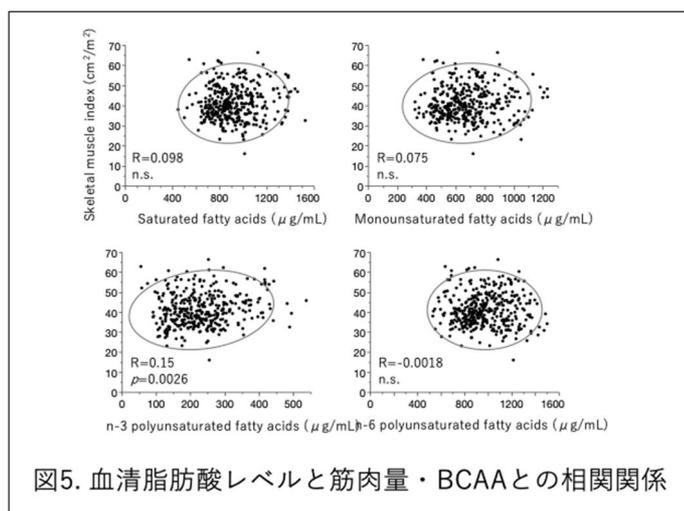


図5. 血清脂肪酸レベルと筋肉量・BCAAとの相関関係

上記のように、研究期間中において慢性肝疾患におけるTCA回路の中間体とKeap1-Nrf2システムを

介した酸化ストレスについて、主に肝硬変におけるサルコペニア・筋管退縮の観点から解析を進めてきた。さらにサルコペニアについて慢性肝疾患患者の代謝産物データと体組成の関連の解析を進め、複数の成果を報告することが出来た。今後は慢性肝疾患の筋組織におけるTCA回路中間体や酸化ストレス応答をターゲットとした治療法の開発、およびデータベースに基づく食事療法の開発による慢性肝疾患の予後改善を目標にさらなる研究を展開していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤橋里子、佐野晃俊、井上 淳、嘉数英二、二宮匡史、岩田朋晃、鶴岡未央、佐藤公亮、小貫真純、正宗 淳
2. 発表標題 肝癌合併肝硬変患者における血清亜鉛値と血漿BCAAレベル・サルコペニアの関係
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 佐野晃俊、井上淳、正宗淳
2. 発表標題 肝癌合併肝硬変患者のサルコペニアに関する血中脂肪酸組成の検討
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 佐野晃俊、井上淳、正宗淳
2. 発表標題 骨格筋管退縮における高アンモニア血症と酸化ストレスの関連
3. 学会等名 第59回 日本肝臓学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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