

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460972

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)におけるアミノ酸代謝と免疫病態の解析

研究課題名(英文)amino acids metabolism and immune abnormality in non alcoholic steatohepatitis

研究代表者

嘉数 英二(KAKAZU, Eiji)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教

研究者番号：20509377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で行ったCE-TOFMSメタボローム解析により、遺伝子改変脂肪肝モデルマウス(ob/ob, kk-Ay)の門脈血中代謝産物のプロファイルが通常のマウスと異なることが明らかとなった。マウス門脈において高い上位5%の代謝産物は、Trimethylamine N-oxide (TMAO), phenaceturic acid, isethionic acid, 3-Indoxylsulfuric acid, pipecolic acidであった。また、TMAOやTMAOの前駆物質であるTrimethylamine (TMA)は肝細胞脂肪変性に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the differences of metabolite profiles in portal blood between normal mice and fatty liver genetic model mice (ob/ob and kk-Ay) by CE-TOFMS. The top 5% metabolites of portal blood that were higher in ob/ob compared to wild-type were Trimethylamine N-oxide (TMAO), phenaceturic acid, isethionic acid, 3-Indoxylsulfuric acid and pipecolic acid. Furthermore, It is possible that TMAO or Trimethylamine (TMA) which is metabolized from TMAO, progress steatosis.

研究分野：肝臓学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓での表現型と考えられ、最近急速に患者数が増加している。NASH は通常の脂肪肝と異なり肝硬変・肝癌に進行するため対策が必要であるが、現在でも食事・運動療法が中心であり著効する薬物療法はない。NASH の病態には門脈より流入した栄養素が深く関係しており、*in vitro* の実験で病態を再現することは困難である。さらに、NASH の病態を忠実に反映するモデルマウスは現在のところ存在しない。申請者等はこれまで細胞外のアミノ酸組成により免疫応答が変化することを研究してきた。このことから、まず脂肪肝モデルマウスの門脈血中の代謝産物を一斉に解析し、アミノ酸を含めた特定の代謝産物が肝内の免疫応答に影響を与え肝脂肪化・肝線維化を誘導できるのではないかと着想に至った。

2. 研究の目的

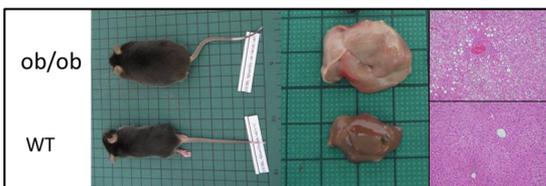
非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) におけるアミノ酸代謝と免疫病態の解析

3. 研究の方法

空腹時の門脈血を ob/ob マウス、kk-Ay マウス、通常マウスから採取し CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。代謝産物プロファイルを 3 群間で比較し、通常マウスより ob/ob マウスの門脈血で最も高くなっている代謝産物に関して *in vitro* で肝細胞に対する脂肪変性作用を BODIPY 染色、Oil red O 染色で解析した。また、NASH 発症の要因として考えられているパルミチン酸 (PA) に関して肝細胞に与える小胞体ストレスを解析した。NASH におけるマクロファージを中心とした免疫細胞の集積に関して、肝細胞から放出される細胞外分泌顆粒 (EV) を超遠心分離器で回収したのちにナノ粒子解析装置で測定し、EV に対するマクロファージの遊走能を解析した。

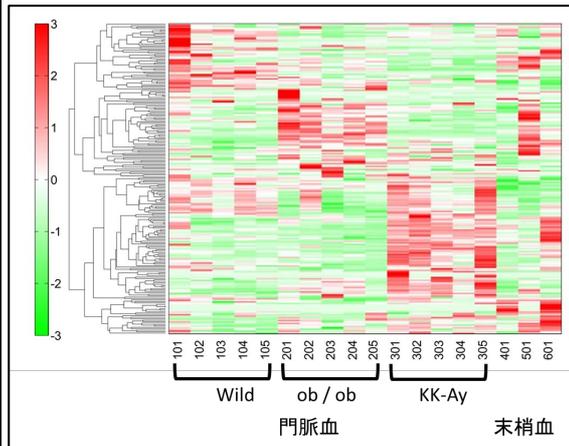
4. 研究成果

6 週齢の時点で各種マウスの体重は ob/ob マウスが $29.2 \pm 1.44g$ 、KK-Ay マウスが $24.8 \pm 0.65g$ WT マウスが $18.2 \pm 1.62g$ であった。ob/ob マウスのみ黄色調の肝腫大を認めた。マクロ像に一致して ob/ob マウスのみ HE 染色で肝細胞脂肪変性を認めた。炎症細胞浸潤、線維化はいずれのマウスでも認めなかった。



CE-TOFMS によりそれぞれの門脈血から 216 のピーク (カチオン 119/アニオン 97) が検出

され、169 の代謝産物が解析可能であった。その中で、ob/ob マウスにおいて 12 種類の代謝産物が有意に高く 10 種類の代謝産物が有意に低かった。ヒートマップではそれぞれの



マウスの集団が明瞭に分別されている事を確認し、門脈血と末梢血ではそのプロファイルが大きく異なることを明らかにした。ob/ob マウス門脈において高い上位 5% の代謝産物は、Trimethylamine N-oxide (TMAO), phenaceturic acid, isethionic acid, 3-Indoxylsulfuric acid, pipecolic acid であった。

ob/ob で高値の代謝産物

	Ratio	p-value
TMAO	8.2	0.003 *
Phenaceturic acid	4.7	0.008 *
Isethionic acid	4.2	0.001 *
4-Guanidinobutyric acid	3.4	0.010
3-Indoxylsulfuric acid	2.9	0.005 *
Pipecolic acid	2.9	0.0004 **
Butyric acid	2.2	0.142
Homocitrulline	2.2	0.041

* p<0.01

** p<0.001

更に、TMAO, 3-Indoxylsulfuric acid, pipecolic acid は kk-Ay マウスよりも高値であった。アミノ酸に関しては、L-glycine (Gly), L-methionine (Met)、L-tyrosine (Tyr) が WT と比較して ob/ob マウスで定値であった。最も差を認めた TMAO 及び前駆物質である Trimethylamine (TMA) に関して *in vitro* で肝細胞に添加実験を行った。小胞体ストレスを介してアポトーシスを誘導するパルミチン酸 (PA) をコントロールとした。PA 単独、TMA 単独、PA+TMA を添加した HepG2 細胞において脂肪変性を認めた。TMAO の添加

では脂肪変性を認めなかった。高濃度の TMA を添加すると細胞内に脂肪滴と共に空胞形成を認めた。ライソソームを LAMP1 で標識した HepG2 で同様な検討を行うと急速にライソソームが空胞化をきたすことがセルライブイメージングで確認された。

パルミチン酸は有意に肝細胞に小胞体ストレスを与えるとともに肝細胞からの EV の放出を増加させた。さらに、PA で処理した肝細胞から採取した EV はコントロールの肝細胞から採取した EV よりも有意にマクロファージの遊走能を高めた。

以上より、本研究では肥満モデルマウスのも門脈血中の代謝産物プロファイルは通常マウスとは大きく異なり、TMA/TMAO などの代謝産物が肝細胞脂肪変性に関与している可能性が示された。また、マクロファージ等の免疫細胞集積のメカニズムとして細胞外分泌顆粒の関与が考えられた。

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 4 件)

1. Kakazu E, Mauer AS, YinM, Malhi H. Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 -dependent manner. J Lipid Res. 2016 Feb;57(2):233-45. 査読あり
2. Kakazu E, Kondo Y, Kogure T, Ninomiya M, Kimura O, Ueno Y, Shimosegawa T. Plasma amino acids imbalance in cirrhotic patients disturbs the tricarboxylic acid cycle of dendritic cell. Sci Rep. 2013 Dec 10;3:3459. doi: 10.1038/srep03459. 査読あり
3. Kakazu E, Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Nagasaki F, Ueno Y, Shimosegawa T. The influence of pioglitazone on the plasma amino acid profile in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Hepatol Int. 2013 Jun;7(2):577-85. doi: 10.1007/s12072-012-9395-y. 査読あり
4. Kakazu E, Kondo Y, Kogure T, Ninomiya M, Kimura O, Iwata T, Morosawa T, Iwasaki T, Shimosegawa T. Supplementation of branched-chain amino acids maintains the serum albumin level in the course of hepatocellular carcinoma recurrence. Tohoku J Exp Med. 2013;230(4):191-6. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1. Eiji Kakazu, Harmeet Malhi, Jun Inoue, Yasuhiro Miyamoto, Yasuteru Kondo, Tooru Shimosegawa. Metabolomics of Hepatic Portal Blood in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Mice by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. DDW 2015/5/17 Washington DC, USA
2. Eiji Kakazu, Amy S. Mauer, Harmeet Malhi. Hepatocytes Release Ceraamide-rich Proinflammatory Extracellular Vesicles in an IRE1alpha-dependent manner. AASLD 2015/11/15 San Francisco, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

嘉数英二(KAKAZU Eiji)

東北大学 高度教養教育・学生支援機構
助教

研究者番号: 20509377

(2)研究分担者

小暮高之(KOGURE Takayuki)

東北大学 病院 助教

研究者番号: 70400330

近藤泰輝(KONDO Yasuteru)

東北大学 医学系研究科 非常勤講師

研究者番号：70455822

(3)連携研究者
()

研究者番号：