



SHOWA
University

2022年4月19日

肝臓内のアミノ酸が脂肪肝を増悪化するメカニズムを解明 –肝疾患の新たな治療法開発に期待–

ポイント

- ・細胞内プロテアーゼ「カルpain」によるタンパク質分解により、肝臓中のアミノ酸が増加する仕組みを解明
- ・肝臓内アミノ酸バランスの変化が脂肪肝を引き起こす
- ・抗プロテアーゼ薬による脂肪肝治療に期待

概要 昭和大学（東京都品川区／学長：久光正）の赤須 里沙子 大学院生、宮崎 拓郎 准教授、宮崎 章 教授（昭和大学医学部生化学講座）を中心とした研究グループは、慶應義塾大学、九州大学、ロンドン大学との共同研究により、細胞内プロテアーゼ「カルpain」により肝臓内でアミノ酸が産生され、脂肪肝の発症につながる仕組みを世界で初めて明らかにしました。本研究成果は、2022年4月18日（米国東部標準時間）に米国生化学分子生物学会誌『Journal of Biological Chemistry』のオンライン版に掲載されました。

【背景】 非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）には軽度の脂肪肝から非アルコール性脂肪肝炎（NASH）が含まれ、しばしば糖尿病や脂質異常症などの代謝性疾患、ならびに肥満に合併することが知られています。NAFLDの進展は肝硬変や肝がんなどの致死的な病変の原因になると考えられていますが、このような代謝性疾患にアミノ酸代謝異常が合併することが古くから知られています。特に、ロイシン、イソロイシン、バリンからなる分枝鎖アミノ酸（BCAA）は悪液質やサルコペニアなどの治療に有用ですが、一方で2型糖尿病、肥満、虚血性心疾患を増悪化させるとの報告もあります。アミノ酸トランスポーターを肝臓に導入すると脂肪肝が増悪化すると報告もあり（1）、少なくとも一部のアミノ酸は肝細胞における脂肪蓄積を助長する役割を持っているようです。一方、私たちはこれまで生活習慣病におけるストレス応答性細胞内プロテアーゼカルpainの役割を検討してきました。カルpainは1970年代に見出されたカルシウム感受性細胞内プロテアーゼのファミリーであり、同ファミリーの中でカルpain-1および-2は従来型に分類されます。これまでカルpainは細胞内シグナル伝達に関わる「制御性プロテアーゼ」と位置づけられて、解析が進められてきました（2-4）。その結果、カルpainは血管内皮細胞において動脈硬化の関連因子により活性化し、病態が増悪化することが明らかとなりました（2）。私たちはカルpainが広範囲の標的タンパク質を切断する特徴に着目し、同分子がタンパク質分解性のアミノ酸産生に関係すると考えました。

【研究成果】

高グルコース条件下で血管内皮細胞において calpain 依存的にアミノ酸が産生される

糖尿病を再現する目的で培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞*1の培養液中のグルコース濃度を増加させたところ、細胞内のカルpainが活性化するとともに、細胞外にアミノ酸が遊離しまし

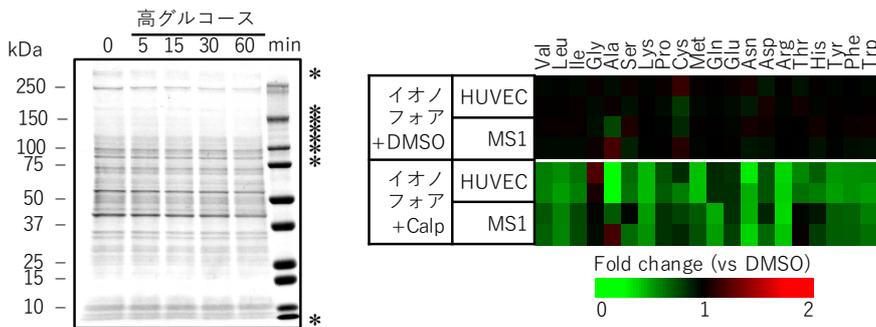


図1 血管内皮細胞におけるタンパク質分解（左）と細胞外へのカルパイン依存的なアミノ酸遊離
 （左）血管内皮細胞を高グルコース培地で培養し、全細胞ライセートのタンパク質組成を検討した。アスタリスクで示したサイズのタンパク質がグルコース添加から60分後に低下した。（右）イオノフォアにてカルパインを活性化し、カルパイン阻害剤（calp）が培地中のアミノ酸組成におよぼす影響をヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）およびマウス微小血管内皮細胞（MS1）にて検討した。緑色はカルパイン阻害によりアミノ酸が低下したことを示す。

た。この際比較的高分子量の細胞内タンパク質の分解が目立ち、細胞外に存在する少なくとも16種類のアミノ酸が細胞内のカルパイン活性に依存することも明らかとなりました（図1）。

血管内皮条件培地に含まれるアミノ酸は肝細胞における脂肪滴形成を促進する

肝細胞において、細胞内のアミノ酸レベルは栄養センサーである mTORC1 により検知され、分子の影響で S6K がリン酸化^{*2}を受けることで脂肪新生が惹起されます。そこで、培養肝細胞における S6K のリン酸化を指標として、血管内皮細胞の条件培地^{*3}を評価しました。血管内皮細胞の細胞内にカルシウムを導入し、カルパイン依存的にアミノ酸をリリースさせ、条件培地としました。条件培地を肝細胞株 HepG2 に負荷し、さらにインスリンで刺激したところ、S6K のリン酸化が認められましたが、コントロールである溶媒群（すなわちアミノ酸を含まない培地）ではそのようなリン酸化は検出されませんでした。この条件培地負荷群に脂肪酸であるオレイン酸を添加したところ、脂肪滴の形成が認められました。上記実験群で、mTORC1 阻害剤 ラパマイシンとアミノ酸トランスポーター LAT1 阻害剤の JPH203 の作用を検討したところ、両薬物とも S6K のリン酸化と脂肪滴形成を顕著に抑制しました（図2）。したがって、条件培地に含まれるアミノ酸が mTORC1 を介して脂肪新生を引き起こすと考えられます。

血管内皮由来アミノ酸は脂肪肝を促進する

野生型マウスに高脂肪食を負荷したところ糖尿病と脂肪肝の症状が出現し、肝臓においては高レベルのカルパインを発現する CD31 陽性血管内皮細胞^{*4}が出現しました。Cre/LoxP システム^{*5}を用いて血管内皮細胞および骨髄系細胞においてカルパインをノックアウトしたところ、肝臓の脂肪蓄積は抑制されましたが、血中の中性脂肪・コレステロールプロファイルには影響

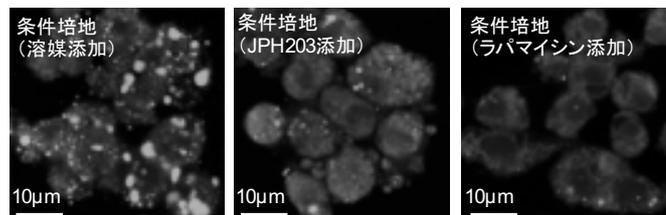


図2 条件培地による肝細胞の脂肪新生はアミノ酸トランスポーター阻害（JPH203）ならびに mTORC1阻害（ラパマイシン）により低下する

血管内皮細胞をアミノ酸不含培地で培養し、一過的にカルシウムイオノフォアを負荷してアミノ酸をリリースさせ、条件培地とした。条件培地を肝細胞株 HepG2 に負荷し、脂肪酸であるオレイン酸を添加したところ、脂肪滴の形成が認められた（溶媒添加）。条件培地にアミノ酸トランスポーター阻害剤（JPH203）ならびに mTORC1 阻害剤（ラパマイシン）を添加したところ、脂肪新生が低下した。

をおよぼしませんでした。骨髓移植法により骨髓由来細胞のカルパインのみを欠損したマウスを作出し、高脂肪食を負荷しましたが、少なくとも脂肪肝については再現されませんでした。したがって、血管内皮細胞のカルパインが脂肪肝の進展に寄与すると考えられます(図3)。このようなマウスで肝臓組織中のアミノ酸レベルを定量したところ、ロイシン、イソロイシンおよびグリシンの含量が血管内皮カルパインのノックアウトで低下しましたが、血中のアミノ酸レベルは変動しませんでした。なお、このような高脂肪食誘発性肝アミノ酸低下に骨髓由来細胞の寄与は認められませんでした。高脂肪食負荷マウスに LAT1 阻害剤 JPH203 を連続投与したところ、肝臓における中性脂肪レベルの低下が認められましたが、これはカルパインのコンディショナルノックアウトマウスと同等でした。一方、JPH203 の投与は血中の中性脂肪および

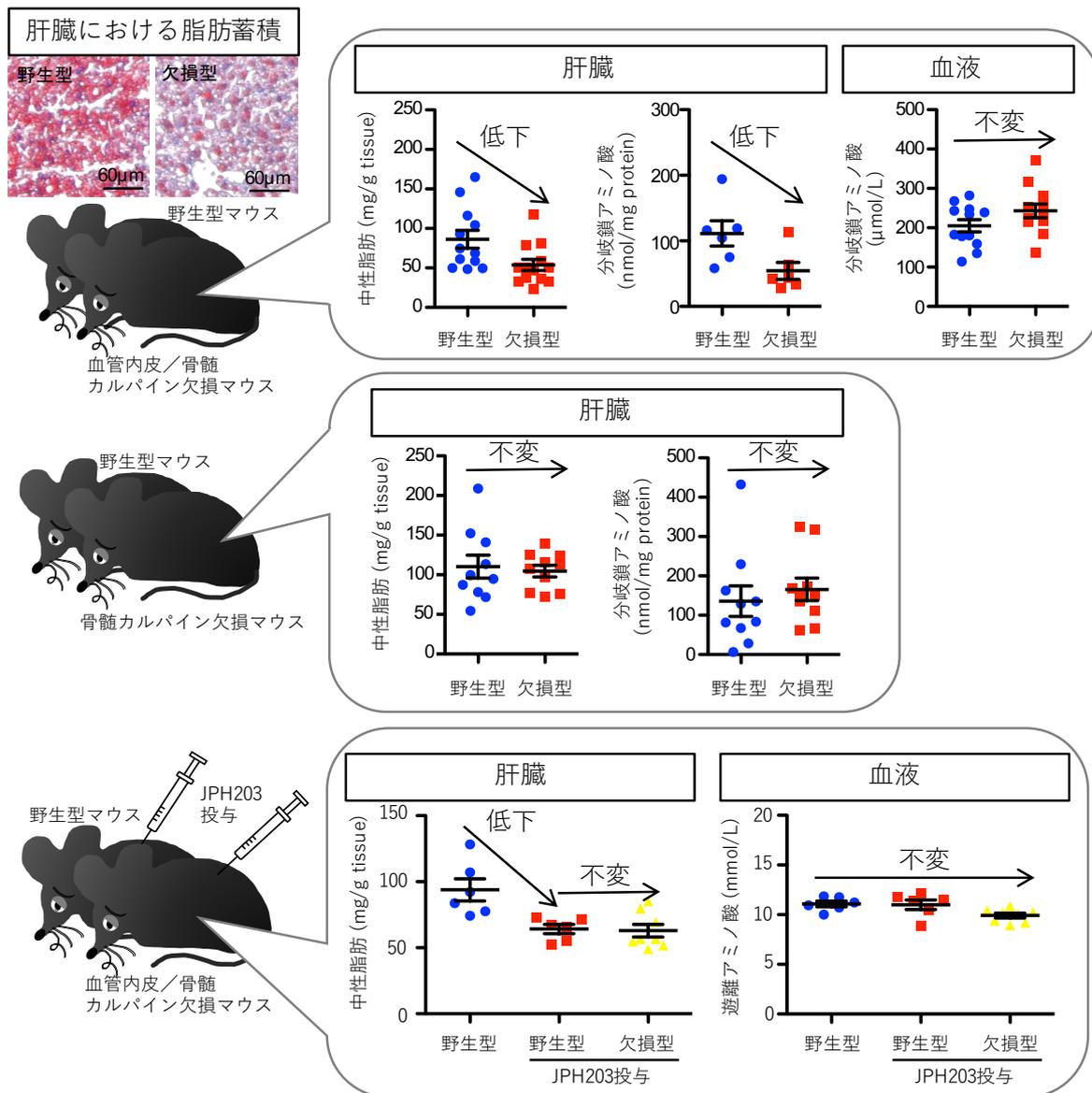


図3 血管内皮細胞のカルパインは肝臓内のアミノ酸維持に寄与する

マウスに高脂肪食を摂取させ、脂肪肝を誘発した。(上段)血管内皮・骨髓細胞特異的カルパイン欠損により、肝臓の中性脂肪蓄積が抑制され、同時に肝臓中の分岐鎖アミノ酸も低下した。一方、血液中のアミノ酸は変化しなかった。(中段)骨髓細胞特異的カルパイン欠損は、肝臓の中性脂肪蓄積や分岐鎖アミノ酸レベルに影響を及ぼさなかった。(下段)アミノ酸取り込み阻害剤JPH203の投与により肝臓の中性脂肪蓄積が抑制された。JPH203投与マウスにおいてさらにカルパインを欠損させたが、中性脂肪レベルは低下しなかった。この際、血中のアミノ酸レベルは変化しなかった。

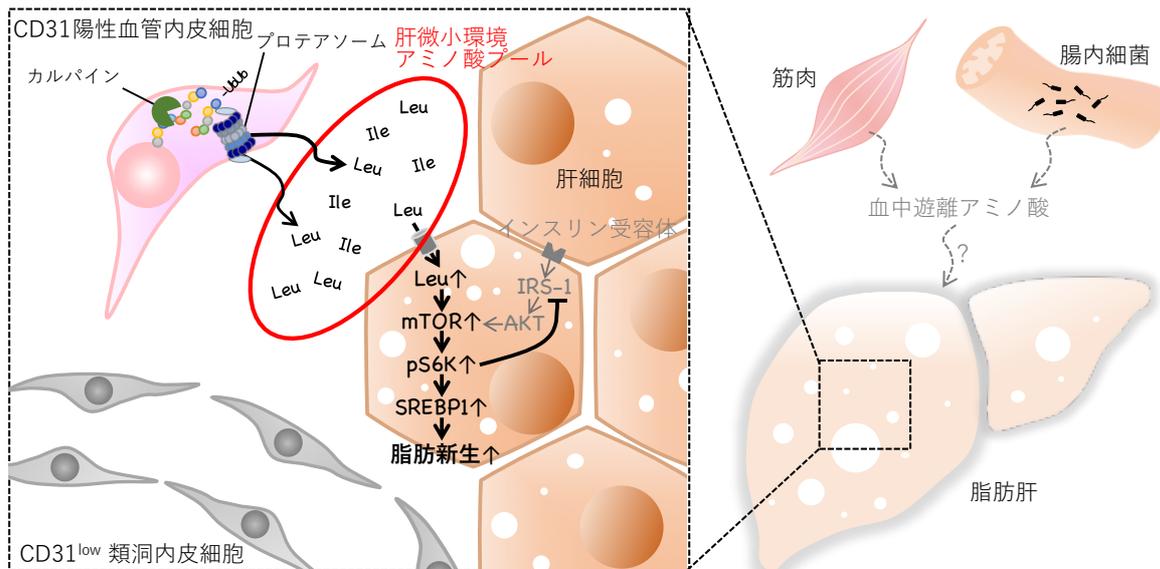


図4 血管内皮細胞のカルパインは肝臓微小環境にアミノ酸を供給する役割を担う

CD31陽性血管内皮細胞より分泌されたアミノ酸は、近傍の肝細胞のmTORC1/S6K/SREBP1c分子軸を活性化するのに十分であり、これが脂肪肝においてインスリン/Akt非依存的な脂肪新生に寄与する。

アミノ酸レベルには影響をおよぼしませんでした。肝内皮細胞が類洞構造をとり、血中由来成分の輸送にあまり影響をおよぼさないことも勘案し、脂肪肝の形成には血管内皮由来のアミノ酸が大きく寄与するとの結論に至りました。

以上をまとめると、血管内皮細胞のカルパインは高血糖条件で活性化し、肝臓微小環境にアミノ酸を供給する役割を担うと考えられます(図4)。このアミノ酸バランスの変化は、脂肪肝において近傍の肝細胞の脂肪新生を活性化するのに十分であると考えられます。抗カルパイン薬はすでにアルツハイマー型認知症などで創薬研究が実施されており、今後上記薬剤が代謝性疾患にも応用されることが期待されます。

注釈

- *¹ 代表的な血管内腔の細胞で、動脈血管の性質を反映すると言われています。
- *² S6Kはリン酸基が付与されることで活性化する酵素で、自身も他のタンパク質をリン酸化する働きを持ちます。
- *³ 条件培地とは、一定の条件で細胞を培養した際の培養液を指し、アミノ酸などの細胞から分泌される物質が含まれます。
- *⁴ CD31は一般的な内皮細胞では代表的なタンパク質と考えられていますが、健康な状態の肝臓の内皮細胞はこれを持たないことが知られています。
- *⁵ バクテリアの酵素を用いて、体内の特定の細胞種のみを遺伝子改変する技術です。

参考論文

- (1) Uno, K., Yamada, T., Ishigaki, Y., Imai, J., Hasegawa, Y., Sawada, S., Kaneko, K., Ono, H., Asano, T., Oka, Y., and Katagiri, H. (2015) A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nat Commun* 6, 7940
- (2) Miyazaki, T., Taketomi, Y., Takimoto, M., Lei, X. F., Arita, S., Kim-Kaneyama, J. R., Arata, S., Ohata, H., Ota, H., Murakami, M., and Miyazaki, A. (2011) m-Calpain induction in

vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation* 124, 2522-2532

(3) Miyazaki, T., Haraguchi, S., Kim-Kaneyama, J. R., and Miyazaki, A. (2019) Endothelial calpain systems orchestrate myofibroblast differentiation during wound healing. *FASEB J* 33, 2037-2046

(4) Miyazaki, T., Taketomi, Y., Saito, Y., Hosono, T., Lei, X. F., Kim-Kaneyama, J. R., Arata, S., Takahashi, H., Murakami, M., and Miyazaki, A. (2015) Calpastatin counteracts pathological angiogenesis by inhibiting suppressor of cytokine signaling 3 degradation in vascular endothelial cells. *Circ Res* 116, 1170-1181

掲載論文について

【掲載誌】

米国生化学分子生物学会誌「*Journal of Biological Chemistry*」

(DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101953>)(オンライン掲載 4月 18日 米国東部時間)

【掲載論文の英文表題と著者およびその和訳】

Calpain-mediated proteolytic production of free amino acids in vascular endothelial cells augments obesity-induced hepatic steatosis

Risako Akasu, Takuro Miyazaki*, Mohamed Z. Elhussiny, Yuki Sugiura, Yuki Tomitsuka, Shogo Haraguchi, Kinya Otsu, Vishwajit S. Chowdhury, Akira Miyazaki (*Corresponding author)

血管内皮細胞におけるカルパインによるアミノ酸産生は肥満誘発性の脂肪肝を増悪化する
赤須 里沙子, 宮崎 拓郎*, Mohamed Z. Elhussiny, 杉浦 悠毅, 冨塚 祐希, 原口 省吾, 大津 欣也, Vishwajit S. Chowdhury, 宮崎 章 (*Corresponding author)

▼本件に関する問い合わせ先

昭和大学医学部生化学講座

東京都品川区旗の台 1 - 5 - 8

准教授 宮崎 拓郎(みやざき たくろう)

TEL : 03-3784-8116 FAX : 03-3784-2346

E-mail: taku@pharm.showa-u.ac.jp

▼本件リリース元

学校法人 昭和大学 総務部 総務課 大学広報係

TEL : 03-3784-8059

E-mail : press@ofc.showa-u.ac.jp