

院すること、などの説明を行う。治療開始時に抗ヒスタミン剤、角化軟化剤、止痢剤などをあらかじめ処方しておくことも勧められる。血圧についても自宅で定期的な測定をしてもらうよう指導する。これらの対策は個々の患者からの十分な情報収集が重要であり、看護師・薬剤師などを含めたシステムを作る取り組みが行われている。

## おわりに

ソラフェニブは、肝細胞癌においてはじめて予後の改善を示した薬剤であり、全身化学療法が新たな治療選択として加わった意義は大きい。そのメリットを生かすには、薬剤の特徴を十分理解したうえで適切な適応と副作用対策が大切である。

## 文 献

- 1) Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., et al. : BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 64 ; 7099-7109, 2004
- 2) Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., et al. : Discovery and development of sorafenib : a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 ; 835-844, 2006
- 3) Huynh, H., Nguyen, T. T., Chow, K. H., et al. : Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma : its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol.* 3 : 19, 2003
- 4) Poon, R. T., Ho, J. W., Tong, C. S., et al. : Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Surg.* 91 ; 1354-1360, 2004
- 5) Gollob, J. A., Wilhelm, S., Carter, C., et al. : Role of Raf kinase in cancer : therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin. Oncol.* 33 ; 392-406, 2006
- 6) Strumberg, D., Richly, H., Hilger, R. A., et al. : Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 23 ; 965-972, 2005
- 7) Abou-Alfa, G. K., Schwartz, L., Ricci, S., et al. : Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 24 ; 4293-4300, 2006
- 8) Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., et al. : Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 359 ; 378-390, 2008
- 9) Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., et al. : Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma : a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 10 ; 25-34, 2009
- 10) Furuse, J., Ishii, H., Nakachi, K., et al. : Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 99 ; 159-165, 2008
- 11) Minami, H., Kawada, K., Ebi, H., et al. : Phase I and pharmacokinetic study of sorafenib, an oral multikinase inhibitor, in Japanese patients with advanced refractory solid tumors. *Cancer Sci.* 99 ; 1492-1498, 2008

## 肝硬変でのアミノ酸代謝異常が 樹状細胞に与える影響

嘉数英二\* 上野義之\*  
近藤泰輝\* 下瀬川 徹\*

索引用語：肝硬変，樹状細胞，分岐鎖アミノ酸，栄養，免疫

### はじめに

厚生労働省の報告によると平成18年の死亡原因において肝疾患は16,248人，肝臓癌は男22,754人，女11,086人と肝臓関連死の割合は極めて高く，慢性C型肝炎患者の高齢化によりこの状況は今後もしばらく継続すると考えられる。慢性肝炎が持続すると，肝硬変・非代償性肝硬変・肝不全へと進行する。臨床的には，肝硬変に対するインターフェロン治療は奏効率・副作用の面で困難であり<sup>1)</sup>，肝庇護療法や栄養療法が治療の主体となる。肝硬変では，糖・蛋白・アミノ酸・脂質・ビタミン・ミネラルなど極めて多岐に渡る栄養代謝障害が出現する。一方で，進行した肝硬変では発癌・肝不全だけでなく肺炎・特発性細菌性腹膜炎などの感染症が予後に深く関わることが知られている。これは，肝硬変では免疫機能低下から易感染性宿主となることに由

来する。

自然免疫・獲得免疫の最も重要な細胞の一つである樹状細胞(DC)は主要な抗原提示細胞であり，全身の臓器・組織・器官に存在し病原体や腫瘍に対して免疫反応を誘導・仲介する。典型的には，未熟DCは抗原を捕獲しペプチドに分解し，主要組織適合性複合体(MHC)クラスIIもしくはI分子により提示する。通常，末梢組織に存在するDCは侵入抗原から刺激を受けた後，所属リンパ節に移動して抗原をリンパ球に提示する<sup>2)</sup>。最近の報告では，末梢組織から再度血中に戻り他の遠隔組織に移行するcirculating示唆されている<sup>3,4)</sup>。

現在，基礎的研究では分子生物学的手法を用いた樹状細胞の細胞内シグナル解析や共刺激分子を介した他細胞との詳細な抗原提示メカニズムまで解析が進められている。

本章では肝硬変(肝臓癌)患者では健常人と

*Eiji KAKAZU et al* : An imbalance of plasma amino acids influences the function of dendritic cells in cirrhotic patients

\*東北大学消化器病態学 [〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1]

表1 慢性C型肝炎・肝硬変・肝臓癌患者の樹状細胞機能

慢性C型肝炎患者の樹状細胞機能低下	機能障害	使用培地	掲載
Kanto T	リンパ球刺激能・IL-12, IFN- $\gamma$ 産生低下(刺激後のCD86の低下)	血清含	J Immunol 162 : 5584-5591, 1999
Bain C	リンパ球刺激低下, 表現系は差	血清含	Gastroenterology 120 : 512-524, 2001
Auffermann-Gretzinger S	リンパ球刺激能・成熟化抑制(刺激後のCD1a CD54 CD83 HLA-DR低下) *患者背景に肝硬変が多い	無血清	Blood 97 : 3171-3176, 2001
Longman RS	機能低下なし	血清含	Blood 103 : 1026-1029, 2004

肝硬変・肝臓癌患者の樹状細胞機能低下	機能障害	掲載
Ninomiya T	リンパ球刺激能・IL-12産生低下・未熟DCのHLA-DR発現低下	J Hepatology 31 : 323-331, 1999
Kakumu S	リンパ球刺激能・IL-12産生低下	J Gastroenterology and Hepatology 15 : 431-436, 2000
Beckebaum S	IL-10の産生増加	Clin Cancer Res 10 : 7260-7269, 2004
Li L	成熟化抑制	Immunol Lett 114 : 38-45, 2007
Ohno T	IFN- $\gamma$ の産生低下	Hepatology Res 37 : 276-285, 2007
Kakazu E	リンパ球刺激能・成熟化抑制(刺激後のCD40 CD83 HLA-DR低下)	J Immunol 179 : 7137-7146, 2007

比較して樹状細胞にどのような変化が生じているのかを過去の文献から考察するとともに、肝硬変で出現する栄養代謝異常が樹状細胞にいかなる影響を与えるのかをわれわれの施設で中心的に研究を進めているアミノ酸インバランスを中心に解説する。

**2 肝硬変（肝臓癌）ではどのような樹状細胞の機能抑制が生じるのか**

1999年に考藤らが<sup>5)</sup>、慢性C型肝炎患者の樹状細胞機能低下を報告して以来、各施設から同様な報告が追従した。健常人とC型慢性肝炎患者の樹状細胞機能を比較したものを表にした(表1)。

臨床的に慢性肝炎の進行により汎血球減少が出現することはよく経験するが、その中でも樹状細胞の割合が慢性C型肝炎では低下しているとの報告が多い<sup>6-8)</sup>。

機能に関してして樹状細胞のallostimulative capacity, IL-12産生低下, 共刺激分子の発現低下などが報告されている。in vitroにおいてはHCVのコア蛋白, NS3蛋白が樹状細胞の分化を抑制する報告が存在し<sup>9)</sup>、さらに最近ではJFH-1株を用いた樹状細胞機能解析も行われている<sup>10)</sup>。しかし慢性C型肝炎での樹状細胞機能抑制はサブセットにより若干結果が異なり、一部には健常人と機能は変わらないとの報告も存在する<sup>7,11)</sup>。一方肝硬変

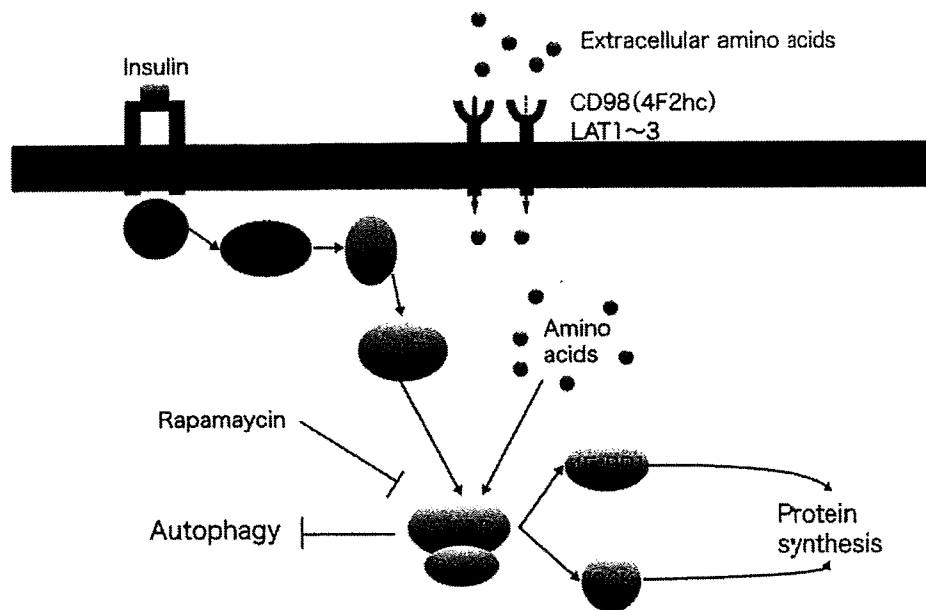


図1 mTORを中心とした栄養感受性シグナル

または肝臓癌では樹状細胞の細胞数低下、分化・成熟抑制による共刺激分子・MHCクラスII発現低下、リンパ球刺激能の低下が生じることは各施設の報告で比較的一致しており、肝炎の進行・発癌により樹状細胞の数・機能低下が明瞭となる可能性が示唆される。もちろん、肝硬変とはさまざまな慢性肝疾患の最終的な病態のことであり、その病因(HCV, HBV, アルコール, NASH, 肝臓癌の有無など)が樹状細胞に与える影響を解析することが優先される。しかし、肝硬変という病態が樹状細胞に与える影響を解析するには細胞自体だけでなく細胞外環境による影響も十分考慮しなければならない。なぜなら、樹状細胞の分化・成熟は周囲環境にも大きく左右されるからである。例えば樹状細胞の培養にはヒト・ウシ血清を10%程度添加した血清培地がよく用いられるが、当然のごとく血清にはさまざまなサイトカインや未知の活性化物質が含まれそのロットにより大きく機能が左右される。健常人と患者の樹状細胞機能を比較する際に血清を用いた場合本来

の樹状細胞の機能が血清によりマスクされる可能性もある。機能解析に無血清培地を用いたAuffermann-Gretzinger, S.の結果とわれわれの施設の結果が非常に類似していることからこのことが示唆される。つまり培地に添加する糖・アミノ酸・アルブミン・脂質・PH・電解質などさまざまな細胞外の要素により樹状細胞の機能は修飾を受けるため、この点を考慮しなければ肝硬変の病態が樹状細胞機能に与える影響を説明するのは不可能である。さらに、これまでの多くの報告は末梢血単球から人工的に誘導した単球由来樹状細胞もしくは末梢血中を循環している樹状細胞を用いた解析であり、各種肝炎・肝硬変の病態を研究するには実際の肝臓内・所属リンパ節の樹状細胞機能を解析する必要がある。

**3 肝硬変で出現するアミノ酸代謝異常が樹状細胞に及ぼす影響を与えるのか**

肝臓は栄養・代謝を司る生体内の最大の臓器であり肝硬変では糖質、蛋白・アミノ酸、

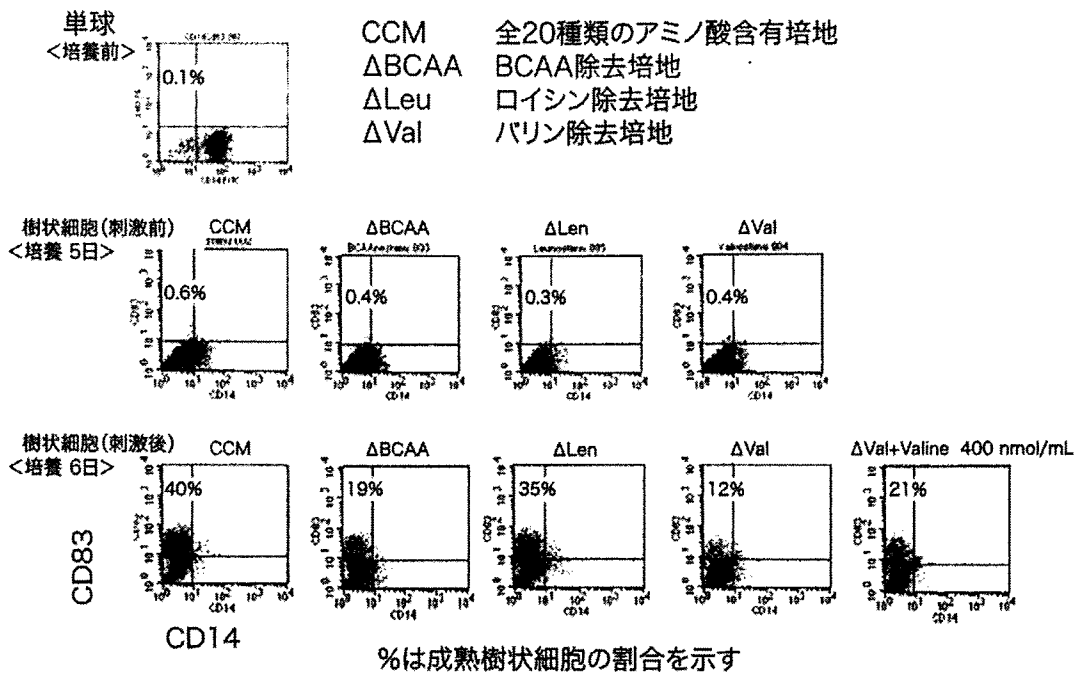


図2 分岐鎖アミノ酸の単球由来樹状細胞の分化・成熟に与える影響 (文献22より引用)

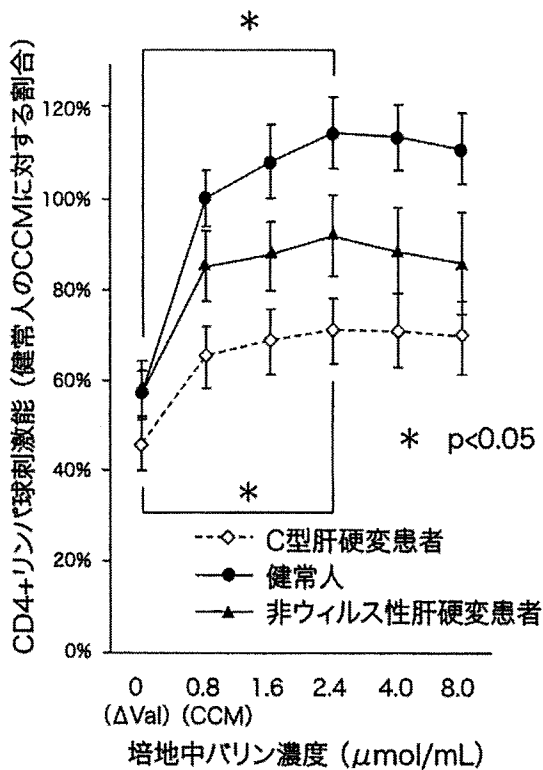


図3 培地中のバリン濃度に対する健康人と肝硬変患者の樹状細胞リンパ球刺激能 (文献22より引用)

脂質, ビタミン, 微量元素など極めて多岐にわたる栄養代謝異常が認められる。アミノ酸

代謝異常に関しては肝硬変では血漿アミノ酸濃度の不均衡が出現することは当時から報告<sup>12,13)</sup>されており, 芳香族アミノ酸(AAA: aromatic amino acid)が増加し分岐鎖アミノ酸(BCAA: branched chain amino acid)が低下する。最近では, 肝臓の線維化に伴いこれらの異常が出現するため, 肝硬変の線維化の指標として有用であるとの報告もある<sup>14)</sup>。このような肝硬変患者のアミノ酸代謝異常を補正するBCAA製剤は最も中心的な栄養療法のひとつである。必須アミノ酸のL-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリンから構成され, 肝性脳症・低アルブミン血症・腹水出現予防などの効果が得られる。近年, 前向き研究によりBCAA製剤は肝硬変患者に対して肝不全イベントの低下, QOLの改善, さらに発癌リスクを低下させる効果を持つことが報告され<sup>15-17)</sup>, *in vivo*でのBCAA製剤の有効性が証明されている。しかし, BCAA製剤がなぜこのような効果をもたらすのかの実験レベルでのエビデンスは少ない。近年*in vitro*では

表2 当研究で使用した無血清培地のアミノ酸組成(単位nmol/mL)

	CCM	Δ BCAA	Δ Val	Δ Leu	Δ Ile	HCM	ACM
Glycine	400	400	400	400	400	251	280
L-Alanine	400	400	400	400	400	366	307
L-Serine	400	400	400	400	400	118	151
L-Threonine	800	800	800	800	800	128	138
L-Cystine 2HCl	200	200	200	200	200	39	67
L-Methionine	200	200	200	200	200	30	75
L-Glutamine	4000	4000	4000	4000	4000	563	689
L-Asparagine	400	400	400	400	400	71	64
L-Glutamic Acid	400	400	400	400	400	38	53
L-Aspartic Acid	400	400	400	400	400	2	4
L-Valine	800	0	0	800	800	227	175
L-Leucine	800	0	800	0	800	124	100
L-Isoleucine	800	0	800	800	0	78	53
L-Phenylalanine	400	400	400	400	400	59	99
L-Tyrosine	400	400	400	400	400	65	133
L-Tryptophan	80	80	80	80	80	56	45
L-Lysine-HCl	800	800	800	800	800	175	184
L-Arginine-HCl	400	400	400	400	400	94	92
L-Histidine HCl-H <sub>2</sub> O	200	200	200	200	200	76	85
L-Proline	400	400	400	400	400	175	176
Fisher's rate	3.00	0.00	2.00	2.00	2.00	3.45	1.42

アミノ酸はただ単に細胞骨格やさまざまな代謝経路の基質となるだけでなく、インスリンと共にmTORを介した栄養感受性シグナル経路(図1)に作用し、細胞機能を調節することが解明されてきている<sup>18~20)</sup>。しかし、そのメカニズムに関しては依然として不明な点が多く特に分岐鎖アミノ酸が免疫機構に与える影響については現在までほとんど知られていない<sup>21)</sup>。

最近、われわれは単球由来樹状細胞(MoDC)の成熟化が、細胞外のBCAA特に、バリンにより影響をうけること(図2)、肝硬変患者では健常人と比較しMoDC機能が抑制されており、細胞外のバリン濃度を高めることにより一部改善できること(図3)を報告した<sup>22)</sup>。

*in vivo*の実験では、BCAAの制限食を与えたマウスと制限しないマウスにSalmonella合に前者で死亡率が有意に上昇するとの報告がある<sup>23)</sup>。

現在、われわれの施設では健常人と非代償性肝硬変の血漿中アミノ酸濃度に一致させた2種類の無血清培地(HCM: Healthy control medium, ACM: Advanced cirrhotic medium)を新たに作製し(表2)、より生体内に近い環境で樹状細胞を中心とした免疫細胞機能の解析を進めている(図4)。非代償性肝硬変の血漿中のアミノ酸濃度と一致した培地において樹状細胞の成熟化・IL-12産生が低下すること、さらにこのことにより末梢血単核球(PBMC)からのIFN- $\gamma$ の産生が低下することが明らかとなった。これらの結果は肝細胞

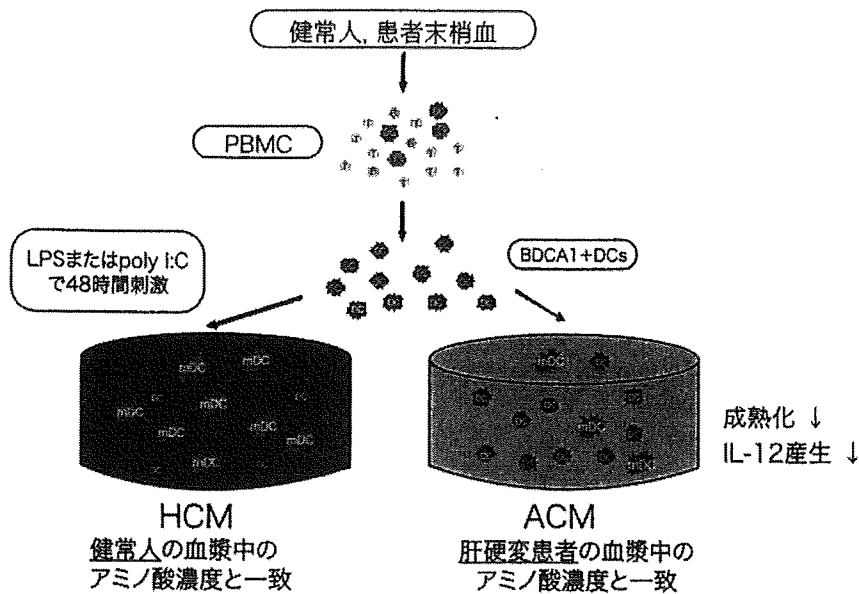


図4 健康人と肝硬変患者の血漿アミノ酸濃度と一致した培地下での樹状細胞機能

癌の有無にかかわらず、非代償性肝硬変で出現する血漿アミノ酸インバランスが樹状細胞をはじめとした免疫細胞全体の反応を抑制している可能性が示している。

細胞外アミノ酸濃度が免疫細胞機能に大きな影響を与えていることは確実であるが、それを解析する際にいくつかの問題が存在する。

①生体内の蛋白質を構成するアミノ酸は20種類存在し、それらのどのアミノ酸がどのような割合で存在するときに樹状細胞機能はじめ免疫反応全体に最も影響を与えるのか依然として不明である。また、機能解析の際に一般的に用いられるRPMI 1640, IMDM, D-MEMの組成の培地は各種アミノ酸濃度が生体内の濃度よりもはるかに高濃度であるためこの中で機能解析はできない。

②生体内においては、食事、体内水分量、さらにその局在(末梢血、門脈血、各種臓器・リンパ節など)により細胞外のアミノ酸濃度は変化し、それらが免疫細胞にいかなる影響を与えているのかを解析するのは困難な課題である。

③BCAAをはじめとした各種アミノ酸の生体に対する効果は、短期的な効果と長期的な効果(アルブミンの増加など付随的な効果)をそれぞれ分けて解析する必要がある。

以上これらの課題を解決していくことが重要である。

#### 4 おわりに

2004年10月にペグインターフェロン+リバビリン併用療法が保険適応になって以降多くの慢性C型肝炎患者の根治が可能となった。しかし今後は患者の高齢化により、肝硬変・非代償性肝硬変に対する加療(栄養療法)の重要性が増していくことは明白である。BCAAをはじめとした遊離アミノ酸の免疫細胞に与える影響がより詳細に解析されれば、先に述べた肝硬変患者の①感染症予防②発癌抑制③インターフェロン療法の奏効率増加などにつながる可能性がある。さらに、アミノ酸と免疫の研究は肝臓分野にとどまらず、

①免疫細胞療法において、各種癌種に対するより有効な細胞誘導法の樹立

②炎症性腸疾患に対するより有効な経腸栄養

養剤の開発

に発展する可能性もある。

L-システイン, L-トリプトファンなどの一部の単独アミノ酸の過剰投与において毒性を有するものも存在するが, アミノ酸は基本的に少量であれば副作用はほとんどないことも長所である。

近年, 樹状細胞機能とmTORシグナルの解析がトップジャーナルに掲載されている<sup>24-26)</sup>。ようやく, 遊離アミノ酸⇒mTOR⇒樹状細胞機能解析の流れができはじめ, 今後は細胞内外の遊離アミノ酸が樹状細胞をはじめとした免疫細胞に与える影響を解析することに重要性が高まると考える。

#### 文 献

- 1) Wright TL : Treatment of patients with hepatitis C and cirrhosis. *Hepatology* 36:S185-194, 2002
- 2) Banchereau J, Steinman RM : Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 : 245-252, 1998
- 3) Bonasio R, von Andrian UH : Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 18 : 503-511, 2006
- 4) Ninomiya T, Akbar SM, Masumoto T et al : Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 31 : 323-331, 1999
- 5) Kanto T, Hayashi N, Takehara T et al : Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 162 : 5584-5591, 1999
- 6) Kanto T, Inoue M, Miyatake H et al : Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190 : 1919-1926, 2004
- 7) Longman RS, Talal AH, Jacobson IM et al : Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 192 : 497-503, 2005
- 8) Nattermann J, Zimmermann H, Iwan A et al : Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* 44 : 945-954, 2006
- 9) Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A et al : Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 170 : 5615-5624, 2003
- 10) Shiina M, Rehermann B : Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function. *Hepatology* 47 : 385-395, 2008
- 11) Longman RS, Talal AH, Jacobson IM et al : Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 103 : 1026-1029, 2004
- 12) Morgan MY, Milsom JP, Sherlock S : Plasma ratio of valine, leucine and isoleucine to phenylalanine and tyrosine in liver disease. *Gut* 19 : 1068-1073, 1978
- 13) Morgan MY, Marshall AW, Milsom JP et al : Plasma amino-acid patterns in liver disease. *Gut* 23 : 362-370, 1982
- 14) Zhang Q, Takahashi M, Noguchi Y et al : Plasma amino acid profiles applied for diagnosis of advanced liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatol Res* 34 : 170-177, 2006
- 15) Marchesini G, Bianchi G, Merli M et al : Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis: a double-blind, randomized trial. *Gastroenterology* 124 : 1792-1801, 2003
- 16) Muto Y, Sato S, Watanabe A et al : Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 35 : 204-214, 2006
- 17) Kobayashi M, Ikeda K, Arase Y et al : Inhibitory effect of branched-chain amino acid granules on progression of compensated liver cirrhosis due to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 43 : 63-70, 2008
- 18) Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM et al : mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110 : 163-175, 2002
- 19) Tremblay F, Marette A : Amino acid and insulin



- signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 276 : 38052-38060, 2001
- 20) Inoki K, Corradetti MN, Guan KL : Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 37 : 19-24, 2005
- 21) Calder PC : Branched-chain amino acids and immunity. *J Nutr* 136 : 288S-293S, 2006
- 22) Kakazu E, Kanno N, Ueno Y et al : Extracellular branched-chain amino acids, especially valine, regulate maturation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 179 : 7137-7146, 2007
- 23) Petro TM, Bhattacharjee JK : Effect of dietary essential amino acid limitations upon the susceptibility to *Salmonella typhimurium* and the effect upon humoral and cellular immune responses in mice. *Infect Immun* 32 : 251-259, 1981
- 24) Ohtani M, Nagai S, Kondo S et al : Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* 112 : 635-643, 2008
- 25) Cao W, Manicassamy S, Tang H et al : Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI (3) K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol* 9 : 1157-1164, 2008
- 26) Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M et al : The TSC-mTOR Signaling Pathway Regulates the Innate Inflammatory Response. *Immunity* 29 : 565-577, 2008

\* \* \*

## 15. 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

東北大学医学部 消化器内科

嘉 数 英 二    上 野 義 之  
近 藤 泰 輝    下 瀬 川    徹

### An Imbalance in Plasma Amino Acids Suppress the Maturation of Myeloiddendritic Cells in Advanced Cirrhotic Patients

Eiji Kakazu, Yoshiyuki Ueno, Yasuteru Kondo  
and Tooru Shimosegawa

Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine

#### KEY WORDS

Dendritic cells, BCAA, Cirrhosis

#### はじめに

近年アミノ酸はただ単に細胞骨格やさまざまな代謝経路の基質となるだけでなく、インスリンとともに栄養感受性シグナル経路に作用し、細胞機能を調節することが解明されてきている<sup>1)</sup>。最近われわれは、①免疫応答において中心的な役割を果たす樹状細胞 (DC) が細胞外に分岐鎖アミノ酸 (BCAA)、とくに valine によりその成熟化が調節されること、②肝硬変患者では健常人と比較し DC の機能が抑制されており、細胞外の valine 濃度を高めることにより一部改善されることを報告した<sup>2)</sup>。しかし、この検討で独自に作製した無血清培地は、各種アミノ酸

濃度が生体の血漿中アミノ酸濃度よりも高濃度であり、実際の生理的環境と大きな乖離があった。さらに、非代償性肝硬変では BCAA だけでなくさまざまなアミノ酸の変動が起こり、そのインバランスが DC をはじめとした免疫細胞に与える影響は依然として不明である。通常、末梢組織に存在する DC は侵入抗原から刺激を受けた後、所属リンパ節に移動して外来抗原をリンパ球に提示する。しかし最近の報告では、末梢組織から再度血中に戻り、他の遠隔組織に移行する circulating DC の存在が示唆されている<sup>3)</sup>。そこで本研究では、健常人と非代償性肝硬変患者の実際の末梢血アミノ酸濃度と一致した無血清培地をそれぞれ作製し、非代償性肝硬変患者にお

けるアミノ酸インバランスが circulating DC に与える影響を解析することを目的とした。

なお、本稿は口演抄録である。

## I 対象と方法

本研究では、健常人 ( $n=25$ ) および、非代償性肝硬変患者 (child pugh grade B or C:  $n=43$ ) の血漿アミノ酸値の平均値を求め、それらのアミノ酸濃度と合致した無血清培地を作製し、HCM (healthy control medium), ACM (advanced cirrhotic medium) と定義した。HCM と ACM はアミノ酸以外の組成はすべて一致している (表 1)。基礎検討において、作製した培地のアミノ酸濃度を HPLC で測定し理論値と差がないことを確認し、48 時間の PBMC の培養後に、培地のアミノ酸濃度に大きな変動がないことを確認した。さらに、annexin V-FITC/Propidium Iodide 染色で 48 時間後の PBMC の viability を評価し、HCM, ACM が市販の X-VIVO10™ と同程度の viability があることを確認した。これらの基礎検討をもとに HCM, ACM 下で、myeloid DC (BDCA1+ DCs) または単球由来樹状細胞 (MoDCs) を LPS, poly I : C で 48 時間刺激し樹状細胞の成熟化・機能を評価した。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貪食能 (FITC-dextran uptake), ④CD4+リンパ球刺激能 (CFSE assay または MTS assay), ⑤細胞内シグナル (ウェスタンブロットティング) を行った (図 1)。さらに、*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 100 mL 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。

## II 結 果

まず健常人から採取した BDCA1+DCs 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

表 1 当研究で使用した無血清培地のアミノ酸組成 (nmol/mL)

	CCM	HCM	ACM
Glycine	400	225	280
L-Alanine	400	391	307
L-Serine	400	119	151
L-Threonine	800	142	138
L-Cystine 2HCl	200	38	67
L-Methionine	200	29	75
L-Glutamine	4000	564	689
L-Asparagine	400	51	64
L-Glutamic acid	400	42	53
L-Aspartic acid	400	3	4
L-Valine	800	249	175
L-Leucine	800	132	100
L-Isoleucine	800	76	53
L-Phenylalanine	400	63	99
L-Tyrosine	400	65	133
L-Tryptophan	80	62	45
L-Lysine-HCl	800	183	184
L-Arginine-HCl	400	78	92
L-Histidine HCl-H <sub>2</sub> O	200	83	85
L-Proline	400	204	176
Fischer's ratio	3.00	3.57	1.42

\*CCM: コントロールの培地

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、貪食能に関しては両培地間で差を認めなかった。これらの現象にあわせて、BDCA1+DCs 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。

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、刺激した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 (図 2)。

細胞内のシグナルに関しては、mTOR の下流にある S6K のリン酸化が HCM と比較して ACM 下では抑制されていた。

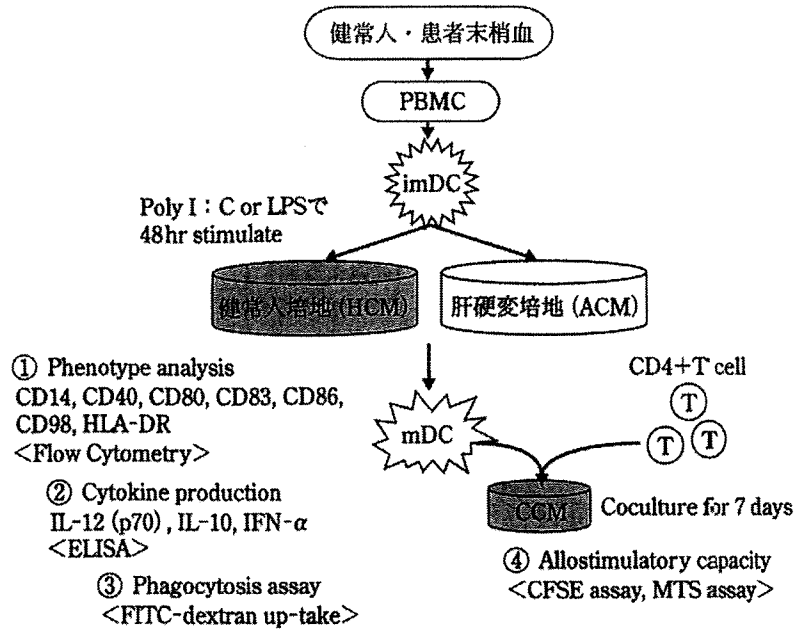


図 1 当研究の実験方法

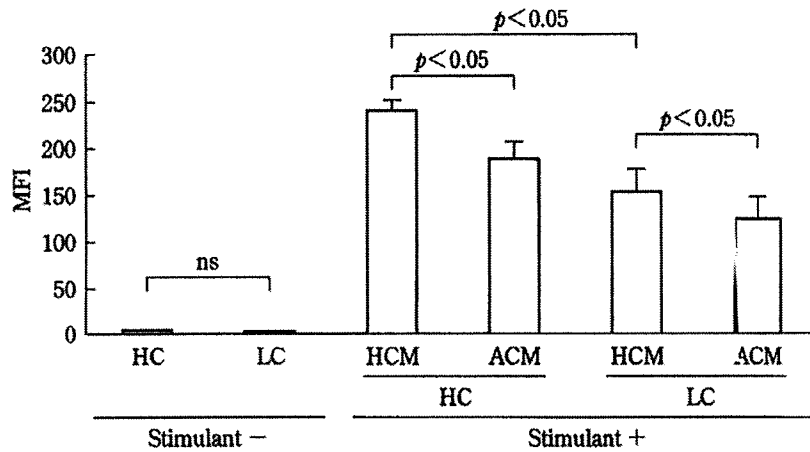


図 2 健康人、非代償性肝硬変患者の刺激前後の樹状細胞成熟化マーカー (CD83) の発現レベル (flow cytometry)

HC: 健康人から採取した DCs

LC: 非代償性肝硬変患者から採取した DCs

*ex vivo* の検討では、BCAA 内服前と比較して内服後では有意に PBMC からの IFN- $\gamma$  産生が上昇した。

### III 考 察

今回、新たに 2 種類の培地 (HCM, ACM) を作製することでより生体のアミノ酸環境に近い状態で樹状細胞の機能解析を行うことが可能となった。非代償性肝硬変患者では刺激に対する樹状細胞自体の成熟化が抑制されているだけでなく血漿中のアミノ

酸不均衡も成熟化を抑制することが明らかとなった。また、そのアミノ酸不均衡を補正することで部分的に成熟能を改善できる可能性が示唆され、*ex vivo* においても BCAA の経口内服により PBMC からの IFN- $\gamma$  の産生がさらにこれらの現象は mTOR シグナルが関与していることが明らかとなった。

### 結 論

非代償性肝硬変では細菌・ウイルスの刺激に対して樹状細胞自体が成熟抑制されているだけでなく、

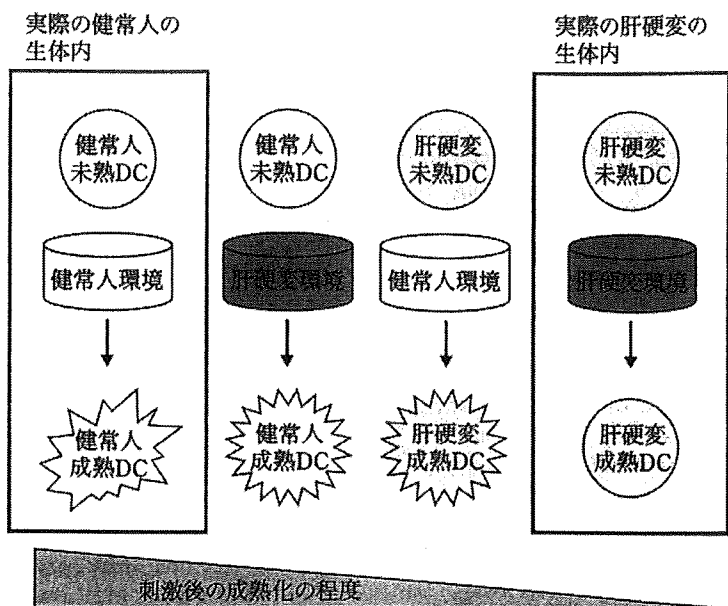


図 3 非代償性肝硬変患者では樹状細胞自体が成熟抑制にあるだけでなく周囲のアミノ酸インバランスが成熟を抑制する

細胞周囲のアミノ酸不均衡により成熟化が抑制されることが示された(図3)。非代償性肝硬変で出現する血漿アミノ酸不均衡は樹状細胞の成熟化を抑制し、それを健康人のレベルに補正することで改善する可能性が示唆された。

### 文 献

1) Cohen A, Hall MN. An amino acid shuffle activates

mTORC1. Cell 2009 ; 136 : 399-400.

2) Kakazu E, Kanno N, Ueno Y, Shimosegawa T. Extracellular branched-chain amino acids, especially valine, regulate maturation and function of monocyte-derived dendritic cells. J Immunol 2007 ; 179 : 7137-46.

3) Bonasio R, von Andrian UH. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. Curr Opin Immunol 2006 ; 18 : 503-11.

\* \* \*

## 特集II 肝硬変・肝癌の栄養代謝異常とその対策

# 肝硬変・肝癌の栄養代謝異常とその対策「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」\*

嘉数英二\*\*  
上野義之\*\*  
近藤泰輝\*\*  
下瀬川徹\*\*

**Key Words :** dendritic cell, decompensated cirrhosis, BCAA, nutrition, immunology

### はじめに

肝臓は栄養代謝をつかさどる最重要臓器であり、肝硬変では、糖・蛋白・アミノ酸・脂質・ビタミン・ミネラルなどきわめて多岐にわたる栄養代謝障害が出現する。特に非代償性肝硬変・肝不全へと進行するにつれそれらの栄養代謝異常は著明となる。アミノ酸に関しては、以前より肝硬変が進行するにつれ血漿中の分岐鎖アミノ酸(BCAA)が低下し芳香族アミノ酸(AAA)が増加することが知られている<sup>1)2)</sup>。肝硬変でアミノ酸imbalanceが出現する詳細な機序は現在でも明らかではないが、AAAの上昇は肝臓での代謝能の低下による結果とされ、BCAAの低下は肝硬変では肝臓に効果的なグリコーゲンの貯蔵が行われず、骨格筋での糖の取り込みが低下し、BCAAがエネルギー源として利用されることによる結果と考えられている。

非代償性肝硬変患者の三大死因は、①肝細胞癌、②食道静脈瘤破裂、③肝不全であり、肝不全に関しては肝性脳症と感染症が死因の大部分を占める。肝硬変患者は易感染性宿主であり、免疫機構の機能低下が出現していることは疑いようのない事実である。

免疫機構は多種多様な免疫細胞のネットワークにより構築される。自然免疫・獲得免疫の最も重要な細胞の一つである樹状細胞(DC)は1973年にロックフェラー大学のスタインマン博士らによって発見された抗原提示細胞であり、全身の臓器・組織・器官に存在し病原体や腫瘍に対して免疫反応を誘導・仲介する。典型的には、未熟DCは抗原を捕獲しペプチドに分解し、主要組織適合性複合体(MHC)クラスIIもしくはI分子により提示し成熟化(活性化)する。通常、末梢組織に存在するDCは侵入抗原から刺激を受けたあと、所属リンパ節に移動して抗原をリンパ球に提示する<sup>3)</sup>。最近の報告では、末梢組織から再度血中に戻り他の遠隔組織に移行するcirculating DCの存在が示唆されている<sup>4)</sup>。現在、基礎的研究では分子生物学的手法を用いた樹状細胞の細胞内シグナル解析や共刺激分子を介した他細胞との詳細な抗原提示メカニズムまで解析が進められている。

非代償性肝硬変におけるアミノ酸imbalanceが引き起こす病態として、これまで肝性脳症、低アルブミン血症がよく知られているがこれらに関しては他の総説<sup>5)</sup>を参考にされたい。本稿ではわれわれの研究室で中心的に研究を進めている非代償性肝硬変におけるアミノ酸imbalanceが免疫細胞、特に樹状細胞に与える影響を中心に解説する。

\* An imbalance of plasma amino acids influences the immune mechanism in patients with decompensated cirrhosis.

\*\* Eiji KAKAZU, M.D., Ph.D., Yoshiyuki UENO, M.D., Ph.D., Yasuteru KONDO, M.D., Ph.D. & Tooru SHIMOSEGAWA, M.D.: 東北大学病院消化器内科〔〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1〕; Division of Gastroenterology, Tohoku University Hospital, Sendai 980-8574, JAPAN

表 1 各施設の肝硬変・肝臓癌患者の樹状細胞機能低下

発表者	機能障害	掲載
・Ninomiya T	リンパ球刺激能・IL-12産生低下・未熟DCのHLA-DR発現低下	J Hepatol 1999 ; 31 : 323-31.
・Kakumu S	リンパ球刺激能・IL-12産生低下	J Gastroenterol Hepatol 2000 ; 15 : 431-6.
・Beckebaum S	IL-10の産生増加	Clin Cancer Res 2004 ; 10 : 7260-9.
・Li L	成熟化抑制	Immunol Lett 2007 ; 114 : 38-45.
・Ohno T	IFN- $\gamma$ の産生低下	Hepatol Res 2007 ; 37 : 276-85.
・Kakazu E	リンパ球刺激能・成熟化抑制(刺激後のCD40 CD83 HLA-DR低下)	J Immunol 2007 ; 179 : 7137-46.

### 非代償性肝硬変ではどのような樹状細胞の機能抑制が生じるのか

肝硬変ではさまざまな免疫細胞の機能低下がこれまで報告されている<sup>6)~8)</sup>。樹状細胞に関しては、1999年にKantoらが、慢性C型肝炎患者の樹状細胞機能低下を報告<sup>9)</sup>して以降、各種肝疾患と樹状細胞機能低下について盛んに研究がなされた。肝硬変または肝臓癌では、樹状細胞の細胞数低下、分化・成熟抑制による共刺激分子・MHCクラスII発現低下、リンパ球刺激能の低下が生じることが各施設より報告され、肝硬変の進行・発癌により樹状細胞の数・機能低下が明瞭となる可能性が示唆される(表1)。われわれの施設での結果も、非代償性肝硬変患者の樹状細胞はLPSで刺激した場合に健常人よりも成熟化(活性化)が抑制されていることを報告した<sup>10)</sup>。

### 非代償性肝硬変で出現するアミノ酸 imbalanceが樹状細胞に及ぼす影響を与えるのか

肝硬変とは、さまざまな慢性肝疾患の最終的な病態のことであり、その病因(HCV, HBV, アルコール, NASH, 肝臓癌の有無など)が樹状細胞に与える影響を解析することが優先される。しかし、肝硬変という病態が引き起こす細胞外環境の変化が樹状細胞に与える影響も合わせて解析する必要がある。たとえば、樹状細胞の培養にはヒト・ウシ血清を10%程度添加した血清培地がよく用いられるが、そのロットにより解析の結果が大きく異なることをよく経験する。これは血清にはさまざまなサイトカインや未知の活性化物質が含まれ機能修飾を受けるからである。つまり、培地

表 2 当研究で使用した無血清培地のアミノ酸組成(単位nmol/ml)

	CCM	HCM	ACM
Glycine	400	225	280
L-Alanine	400	391	307
L-Serine	400	119	151
L-Threonine	800	142	138
L-Cystine 2HCl	200	38	67
L-Methionine	200	29	75
L-Glutamine	4,000	564	689
L-Asparagine	400	51	64
L-Glutamic Acid	400	42	53
L-Aspartic Acid	400	3	4
L-Valine	800	249	175
L-Leucine	800	132	100
L-Isoleucine	800	76	53
L-Phenylalanine	400	63	99
L-Tyrosine	400	65	133
L-Tryptophan	80	62	45
L-Lysine-HCl	800	183	184
L-Arginine-HCl	400	78	92
L-Histidine HCl-H2O	200	83	85
L-Proline	400	204	176
Fischer's ratio	3.00	3.57	1.42

に添加する糖・アミノ酸・アルブミン・脂質・PH・電解質などさまざまな細胞外の要素により樹状細胞の機能は修飾を受けるため、この点を考慮しなければ肝硬変の病態が樹状細胞機能に与える影響を説明するのは困難である。現在われわれの施設では、非代償性肝硬変で出現するアミノ酸 imbalanceに注目し、健常人と非代償性肝硬変の血漿中アミノ酸濃度に一致させた2種類の無血清培地(HCM: Healthy control medium, ACM: Advanced cirrhotic medium)を作製し(表2)、より生体内に近い環境で樹状細胞を中心とした免疫細胞機能の解析を進めている。非代償性肝硬変の血

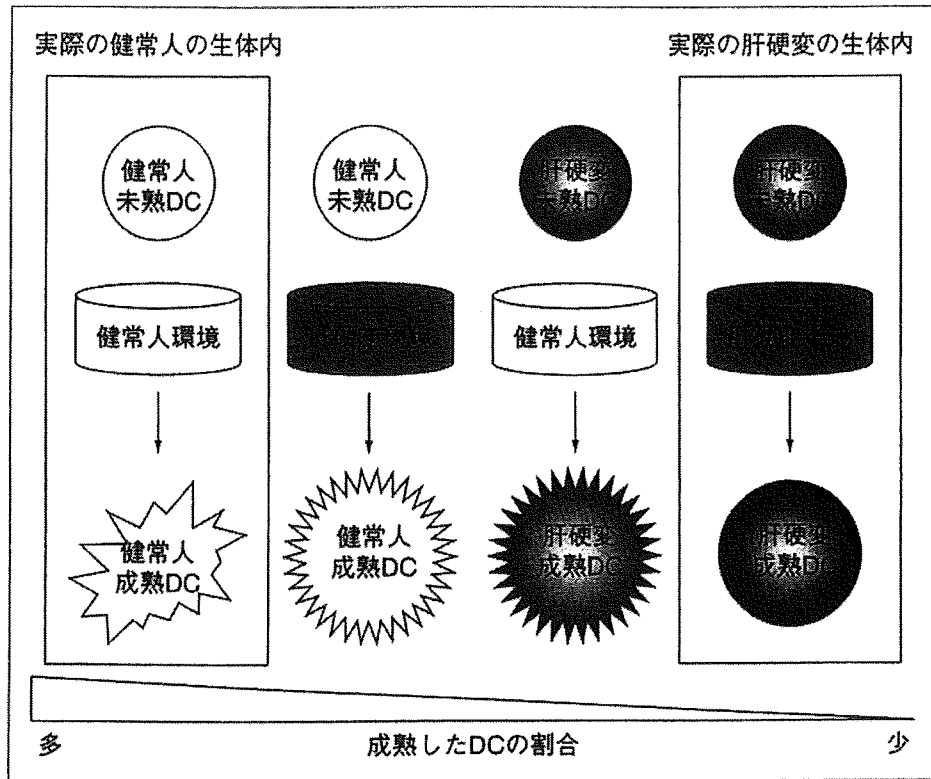


図1 非代償性肝硬変の生体内での結果  
 非代償性肝硬変では樹状細胞自体の成熟化が抑制されているだけでなく周囲のアミノ酸imbalanceが樹状細胞の成熟化を抑制する。

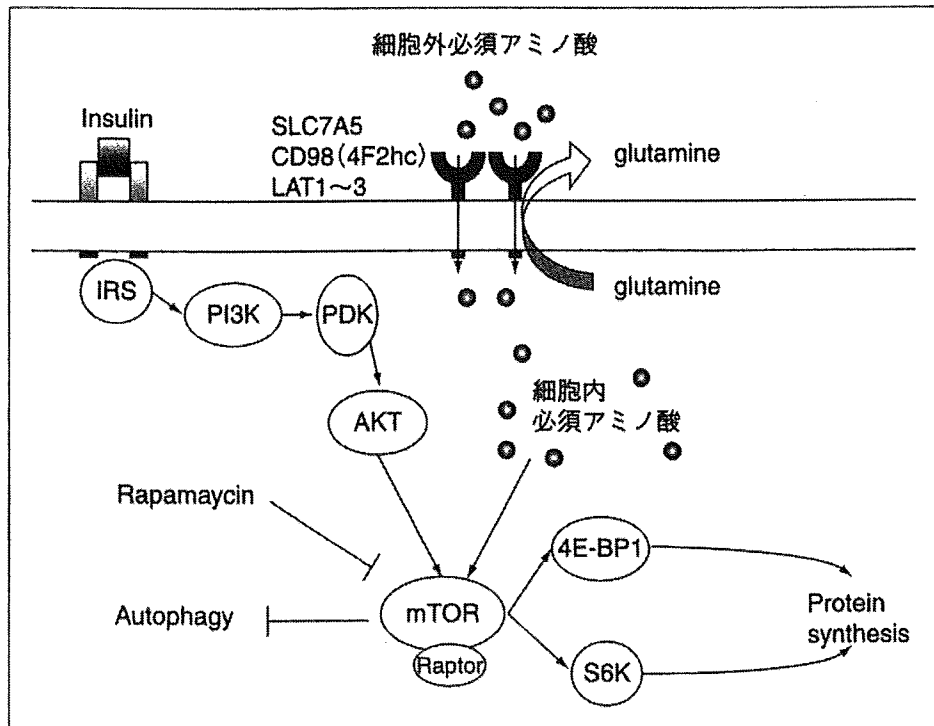


図2 mTORを中心とした栄養感受性シグナル

漿中アミノ酸濃度と一致した培地において、樹状細胞の成熟抑制(CD83の発現低下)・IL-12産生が低下すること、さらにこのことにより末梢血単核

球(PBMC)からのIFN- $\gamma$ の産生が低下することが明らかとなった。これまでの結果から、非代償性肝硬変では樹状細胞自体の機能抑制が起きるだけ



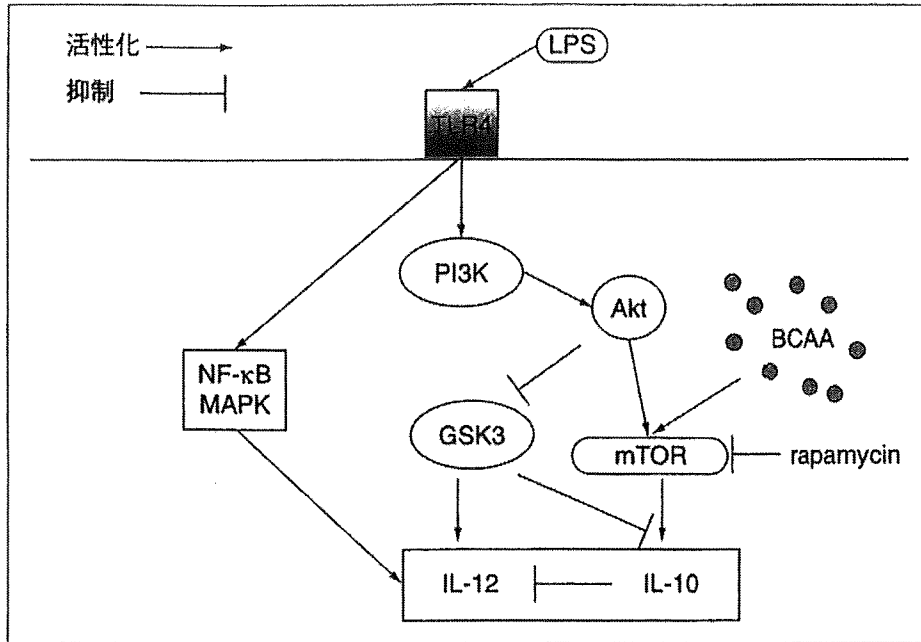


図3 樹状細胞のサイトカイン産生とmTORシグナルの関係

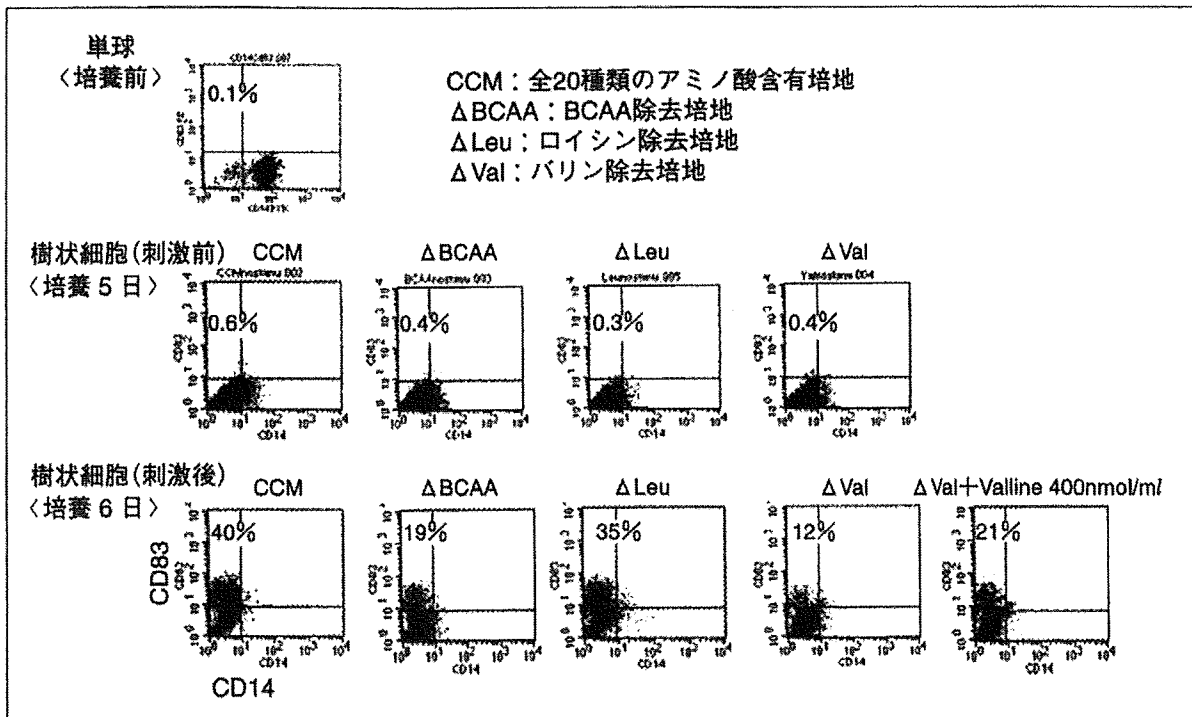


図4 分岐鎖アミノ酸の単球由来樹状細胞の分化・成熟に与える影響  
%は成熟樹状細胞の割合を示す。(文献<sup>10)</sup>より引用改変)

でなく、細胞外のアミノ酸imbalanceが樹状細胞機能を抑制することが明らかとなった(図1)。

非代償性肝硬変のアミノ酸imbalanceが樹状細胞機能を抑制するメカニズム

近年、アミノ酸はただ単に細胞骨格やさまざまな代謝経路の基質となるだけでなく、インスリン

とともに栄養感受性シグナル経路に作用し、細胞機能を調節することが解明されてきている<sup>11)~13)</sup>。その代表的なものとしてmTORシグナルが知られているが、mTORシグナルはDNAの転写・翻訳の制御、細胞の大きさや細胞骨格の再構成の制御、自食作用の制御などに関係している。これまでの報告では、分岐鎖アミノ酸の中でL-ロイシンが

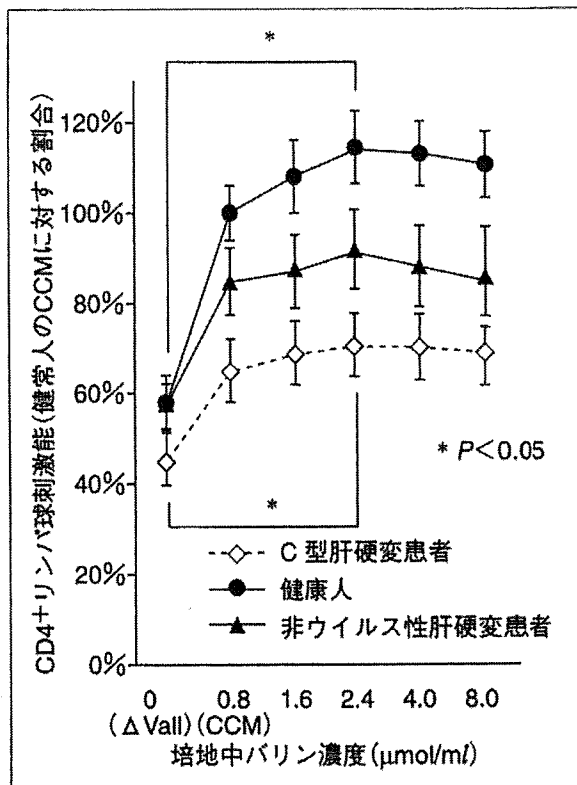


図5 培地中のバリン濃度に対する健康人と肝硬変患者の樹状細胞リンパ球刺激能 (文献<sup>10)</sup>より引用改変)

mTORシグナルに深く関与しているとされており<sup>14)</sup>、さらに最近の報告では、細胞内のグルタミンが細胞外に排出するのに合わせてロイシンを含めた必須アミノ酸が細胞内に流入しmTORを活性

化することが明らかになっている<sup>15)</sup>(図2)。一方で樹状細胞とmTORに関しては、mTORの阻害剤であるラパマイシンで樹状細胞を処理するとアポトーシスが誘導されたり<sup>16)</sup>、LPSで刺激した際にIL-12産生が亢進しIL-10産生が抑制されるとの報告がある(17,18)。われわれの検討では、非代償性肝硬変患者で出現するアミノ酸環境は樹状細胞のmTORシグナルを抑制すると同時にIL-12の産生が低下し、BCAAを添加することで部分的に改善することが明らかとなった。この結果はこれまでの報告と相反するが、BCAAはmTOR以外のシグナルにも影響している可能性がある(図3)。

### 非代償性肝硬変に対する BCAA製剤の免疫学的な有効性

肝硬変患者のアミノ酸代謝異常を補正するBCAA製剤は最も中心的な栄養療法の一つである。必須アミノ酸のL-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリンから構成され、肝性脳症・低アルブミン血症・腹水出現予防などの効果が得られる。しかし、そのメカニズムに関しては依然として不明な点が多く、特に分岐鎖アミノ酸が免疫機構に与える影響については現在までほとんど知られていない<sup>19)</sup>。過去の報告では、BCAAの制限食を与えたマウスと制限しないマウスに*Salmonella typhimurium*を感染させた場合に、前者で死亡率が有意に上昇す

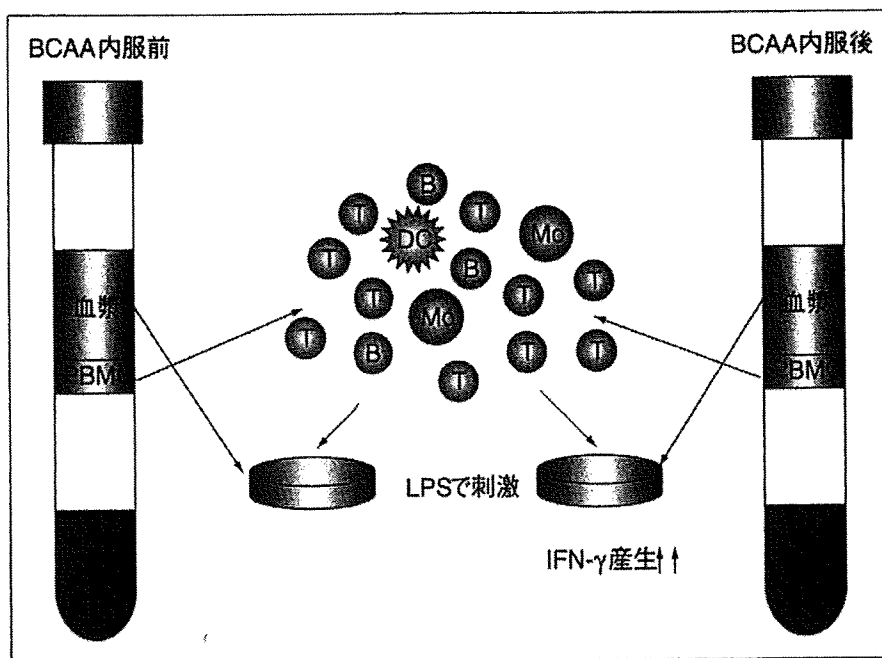


図6 ex vivoにおけるBCAAの免疫賦活作用の検討

るとの報告がある<sup>20)</sup>。

われわれは*in vitro*において単球由来樹状細胞 (MoDC) の成熟化が、細胞外のBCAA特に、バリンにより影響をうけること (図4)、肝硬変患者では健常人と比較しMoDC機能が抑制されており、細胞外のバリン濃度を高めることにより一部改善できること (図5) を報告した<sup>10)</sup>。さらに、*ex vivo* の検討として、早朝空腹時に非代償性肝硬変患者にBCAA顆粒を経口内服させ、内服前の血漿下で末梢血単核球を刺激した場合と内服後の血漿下で刺激した場合で産生するサイトカインを比較したところ、内服後では有意にIFN- $\gamma$ の産生が増加した (図6)。

### おわりに

近年、前向き研究によりBCAA製剤は肝硬変患者に対して肝不全イベントの低下、QOLの改善、さらに発癌リスクを低下させる効果を持つことが報告され<sup>21)~23)</sup>、*in vivo*でのBCAA製剤の有効性が証明されている。今後、これらのエビデンスを示す基礎的研究のよりいっそうの充実が必要と考える。

### 文 献

- 1) Morgan MY, Marshall AW, Milsom JP, et al. Plasma amino-acid patterns in liver disease. *Gut* 1982 ; 23 : 362-70.
- 2) Morgan MY, Milsom JP, Sherlock S. Plasma ratio of valine, leucine and isoleucine to phenylalanine and tyrosine in liver disease. *Gut* 1978 ; 19 : 1068-73.
- 3) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 ; 392 : 245-52.
- 4) Bonasio R, von Andrian UH. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2006 ; 18 : 503-11.
- 5) Haussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 2008 ; 57 : 1156-65.
- 6) Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, et al. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis* 2000 ; 182 : 526-33.
- 7) Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology* 2007 ; 45 : 831-40.
- 8) Nakamura I, Ochiai K, Imai Y, et al. Restoration of innate host defense responses by oral supplementation of branched-chain amino acids in decompensated cirrhotic patients. *Hepatol Res* 2007 ; 37 : 1062-7.
- 9) Kanto T, Hayashi N, Takehara T, et al. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999 ; 162 : 5584-91.
- 10) Kakazu E, Kanno N, Ueno Y, et al. Extracellular branched-chain amino acids, especially valine, regulate maturation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2007 ; 179 : 7137-46.
- 11) Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 19-24.
- 12) Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002 ; 110 : 163-75.
- 13) Tremblay F, Marette A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 38052-60.
- 14) Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr* 2006 ; 136 : 227S-31S.
- 15) Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 2009 ; 136 : 521-34.
- 16) Woltman AM, van der Kooij SW, Coffey PJ, et al. Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood* 2003 ; 101 : 1439-45.
- 17) Ohtani M, Nagai S, Kondo S, et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* 2008 ; 112 : 635-43.

- 18) Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 2008 ; 29 : 565-77.
- 19) Calder PC. Branched-chain amino acids and immunity. *J Nutr* 2006 ; 136 : 288S-93S.
- 20) Petro TM, Bhattacharjee JK. Effect of dietary essential amino acid limitations upon the susceptibility to *Salmonella typhimurium* and the effect upon humoral and cellular immune responses in mice. *Infect Immun* 1981 ; 32 : 251-9.
- 21) Kobayashi M, Ikeda K, Arase Y, et al. Inhibitory effect of branched-chain amino acid granules on progression of compensated liver cirrhosis due to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2008 ; 43 : 63-70.
- 22) Marchesini G, Bianchi G, Merli M, et al. Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis : a double-blind, randomized trial. *Gastroenterology* 2003 ; 124 : 1792-801.
- 23) Muto Y, Sato S, Watanabe A, et al. Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2006 ; 35 : 204-14.

\* \* \*