

公益財団法人 お酒の科学財団
2022 年度 最終報告書

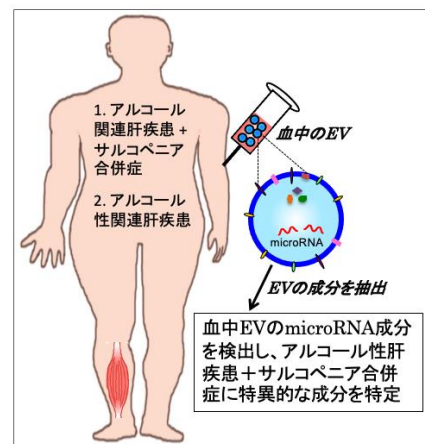
代表研究者	氏 名	江口 暁子	
	所属機関 役職	三重大学医学部附属病院 バイオバンクセンター（消化器内科） 准教授 (助成開始時：三重大学大学院医学系研究科 消化器内科学、特任准教授)	
研究領域 臨床・内科学領域			
研究課題名 アルコール性肝疾患における肝臓と筋肉をつなぐ病態情報伝達体の役割			
助成期間		2022 年 4 月～2024 年 3 月	
共同研究者			
氏 名		所属機関および役職	担当分野
三浦 光一		自治医科大学附属病院 准教授	検体採取
岩佐 元雄		三重大学 准教授	臨床データの検証
中川 良		大宮シティクリニック	検体採取

研究実績の概要

疾患に関連して骨格筋量が減少し筋力が低下する「二次性サルコペニア」のうち、慢性肝疾患における併発頻度は約 40%であるが、アルコール関連肝疾患ではその合併頻度が高い。サルコペニアの併発は肝疾患の予後不良因子であるが、サルコペニアの発症を予測できるバイオマーカーや、効果的な治療法は確立されていない。肝疾患患者の QOL や予後に影響するサルコペニアは临床上の重要な課題となっており、サルコペニアのメカニズムを解明することは急務である。

まず、血中細胞外小胞 (EV) 数と肝機能との関連を明らかにするため、アルコール関連肝疾患患者 51 人の血清を共同研究者から入手した。51 人の内訳は、男性 37 人・女性 4 人、肝硬変 41 人、年齢 40-86 歳 (median 64 歳)、albumin 4 g/dL (以下の検査値は median で表示)、alanine transaminase (ALT) 25 IU/L、asparatate transaminase (AST) 38 IU/L、alkaline phosphatase (ALP) 94 IU/mL、 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) 58 IU/L であり、Psoas Muscle Index (PMI) や Skeletal Muscle Mass Index (SMI) でサルコペニアの基準を満たす患者はそれぞれ 15 人、12 人であった。51 人の血清 EV 数を flow cytometry で測定し、相関関係を検討したところ、血中 EV 数は血中 ALT, AST, triglyceride (TG) と正の相関を示した ($P < 0.05$ 、ただし AST は $P < 0.01$)。これまでの研究において血中 EV 数は TG と強い正相関を示すことから、TG の影響を除外した血中 EV/TG 比を用いて肝機能との相関を spearman 解析により再度検討した。その結果、血中 EV/TG 値は、ALT ($P < 0.05$)、AST ($P < 0.01$)、ALP ($P < 0.05$)、albumin ($P < 0.001$)、natrium (Na) ($P < 0.05$)、ALBI score ($P < 0.001$)、Child Pugh score ($P < 0.05$) とより良好な相関関係を示した。また、肝硬変の患者で血中 EV/TG 値がやや高い傾向にあったが、有意差はなかった。さらに、サルコペニアを有する患者で血中 EV/TG 値がやや高い傾向にあったが、有意ではなかった。これらの結果から、血中 EV 数は肝機能や肝予備能を反映することを見出した。また、血中 EV は主に肝細胞から放出されていることが示唆された。

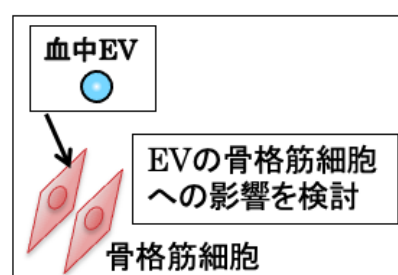
EV が含有する全 microRNA 成分 (EV-miR 成分) を同定するために、EV から miRNA を抽出して miR シーケンスを行った。なお、この解析には、アルコール、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、脂肪性 (アルコールを除く) の 4 成因を含むコホートを用いた。まず検出結果から、肝細胞に多く含有される miR-122 が高値で検出されたことから、血中 EV は主に肝細胞から放出されていることが証明された。次に、検出された EV-miR 値を基に統計解析を行っ



たところ、サルコペニアなしとサルコペニアありの 2 群比較で有意に変動した EV-miR は 47 種あり、このうちサルコペニアで低下したものが 42 種で、サルコペニアで上昇したものが 5 種であった。さらに、握力を除外し PMI 基準を用いて統計解析を行ったところ、PMI 正常と低下の 2 群比較で有意に変動した EV-miR は 118 種あり、PMI 低下で低下したものが 116 種で、PMI 低下で上昇したものが 2 種であった。アルコール関連肝疾患で特異的に変動する血中 EV-miR を見出すために成因別の解析を行ったところ、サルコペニア有無と成因（アルコール）で有意にかつ特異的に変動する EV-miR が 10 種類見つかった。この 10 種類が制御する経路をデータベースから検索したところ、筋肉の分解制御に関する経路が含まれていることが分かった。

次に、アルコール関連肝疾患でサルコペニアを合併した患者と合併していない患者と健常者の血中 EV が骨格筋細胞に与える影響を検討した。

まず、アルコール関連肝疾患でサルコペニアを合併した患者 3 名と合併していない患者 3 名を抽出した。サルコペニアありとなしのグループは、PMI と SMI



に有意差があるが（PMI: $P < 0.05$, SMI: $P < 0.01$ ）、性別・年齢・ALT, AST, Albuminx などの一般血液検査数値には差がないことを確認した。また、コントロールとして健常者 3 人の検体を準備した。精製した粒子の特性を nano sight にて検討したところ、アルコール関連肝疾患患者からの粒子は、健常者よりもサイズが大きく 200 nm 前後であることや、サイズは均一ではなく様々なサイズの粒子から構成されていることがわかった。現在、この精製した粒子成分の網羅的解析をすすめている。さらに、骨格筋細胞への作用をみる実験を遂行している。

EV-miR は、細胞の変化を鋭敏にとらえる細胞シグニチャーであることから、経時的な解析を行うことで、アルコール関連肝疾患に併発するサルコペニアを予測する血中バイオマーカーの開発へとつながることが期待できる。さらに、EV が骨格筋細胞に変化をもたらす可能性が示唆されたことから、EV を用いた肝—筋連関のメカニズムを明らかにできる可能性もある。サルコペニア合併の予兆を把握し制御できるようになれば、患者の QOL 向上や予後改善にも貢献しうることが期待される。

本文

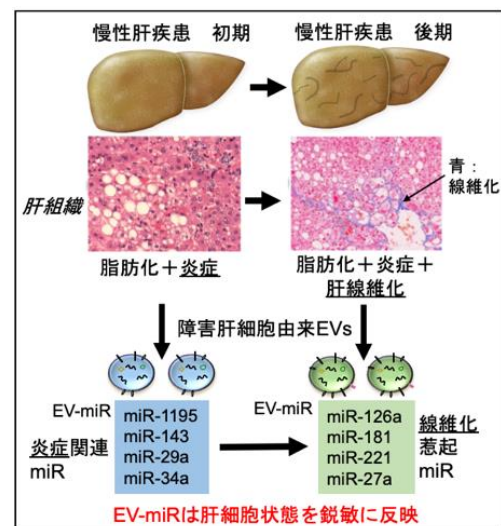
1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患では肝関連サルコペニア（骨格筋量が減少し筋力が低下）を併発することで予後不良になることが報告されている（*Ebadi et al. 2019, Hara et al. 2016, Iwasa et al. Hep Res 2014*）。肝関連サルコペニアで変動する既知の因子として、血中分岐鎖アミノ酸の低下（*Tajiri and Shimizu, 2018*）、血中ビタミンDレベルの低下（*Okubo et al., 2024*）、胆汁酸成分の増加（*Kobayashi et al. 2017*）、血中リトコール酸の低下（*Tamai, Eguchi et al., eLife 2022*）、血中活性酸素種や炎症サイトカインの上昇（*Ebadi et al., 2019; Allen et al., 2021*）、インシュリン成長因子と mTOR シグナルの異常（*Allen et al., 2021*）、ミオスタチンの増加などが報告されているが、肝筋連関の全容はわかっていない。肝関連サルコペニアの併発頻度は約 40%とされているが、アルコール関連肝疾患では約 60%とその併発頻度が高い。この要因として、エタノールの分解産物であるアセトアルデヒド、高アンモニア血症、腸管細菌の関与、成長ホルモンなどが報告されているが（*Dasarathy et al. Alcohol Clin Exp Res, 2017*）、全容は解明されていない。患者の QOL や予後に影響するサルコペニアは、臨床上的重要な課題となっており、サルコペニアのメカニズムを解明し、サルコペニアを予測できるバイオマーカーや効果的な治療法を確立することは喫緊の課題である。

2. 研究の目的

代表研究者は、アルコール性肝障害時に肝細胞が放出する細胞外小胞（EV）が、肝星細胞や肝マクロファージを活性化することで病態進展に寄与することを明らかにした（*Eguchi et al., Liver Int. 2023*）。さらに、EV-miR 成分は肝細胞の状況を鋭敏に反映することや肝組織を反映する血中バイオマーカーになることも見出した（*Eguchi et al., J. Mol Med 2020, Hepatol 2017*）（右図）。また、EV は臓器間病態情報体として、合併症に関与しているとの成果も得ている。

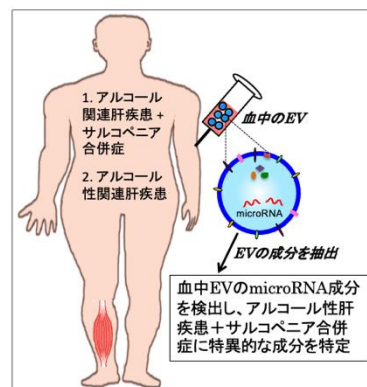
そこで本研究では、ヒトアルコール関連肝疾患に併発するサルコペニアに EV が関与しているとの仮説を立て、（１）EV 成分はヒトアルコール関連肝疾患に併発するサルコペニアのバイオマーカーになるか？ （２）ヒトアルコール関連肝疾患由来 EV は骨格筋細胞に作用することでサルコペニア発症に関与するか？の解明を目指す。



3. 研究の方法

(1) アルコール関連肝疾患でサルコペニアを合併した患者の血中 EV 数の測定と EV 成分の同定：

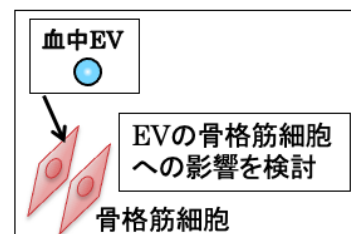
アルコール関連肝疾患をサルコペニアを併発した患者と骨格筋が保たれた患者に分類し、それぞれの血清を使用する。まず、血中の EV を蛍光染色することで EV 数を flow cytometry を用いて測定し、肝機能数値等を含む一般生化学検査の各測定項目との相関関係を、Spearman test により検討した。



EV が含有する全 microRNA 成分 (EV-miR 成分) を同定するために、EV から miRNA を抽出して miRNA シークエンスを行い、解析は統計学者を中心に施行した。まず、2 群間で有意に変動する EV-miR 成分を検出した。またこの解析の際には、PMI でのサルコペニア判定と SMI でのサルコペニア判定の 2 種で解析した。さらに、成因別にアルコール関連、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、脂肪性の 4 グループに分け、さらにそれぞれのグループでサルコペニア有無での解析を行い、サルコペニアを伴うアルコール関連肝疾患のみで有意に変動する EV-miR を検出し、その miR が関与する経路についてデータベースを基に探索した。

(2) アルコール関連肝疾患でサルコペニアを合併した患者の血中 EV が骨格筋細胞に及ぼす影響の解析：

アルコール関連肝疾患のうちサルコペニアを併発した患者と骨格筋が保たれた患者からそれぞれ 3 名の検体を抽出した。選択基準として、男性、年齢 61-64 歳、採血時も飲酒を継続、肝障害の程度を含む臨床背景の一致と



した。なお、PMI と SMI はグループ間で有意差を認めた。これらの患者の血清から EV を精製し、nanoparticle tracking analysis (NTA) で粒子径を測定した。なお、コントロールとして健常者 3 名の血清からも EV を精製した。

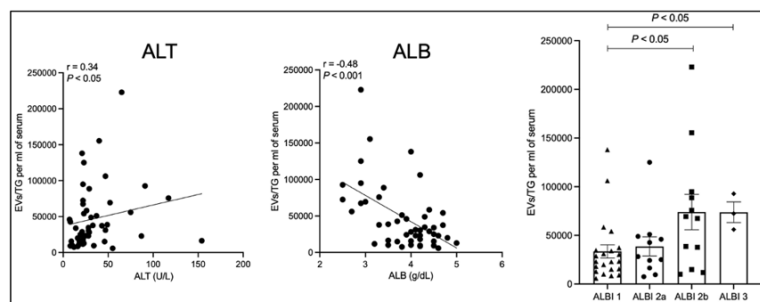
これらの精製 EV-miR 成分を網羅的に解析した。さらに、ヒト筋芽細胞への作用を検討した。

4. 研究成果

(1) アルコール関連肝疾患でサルコペニアを合併した患者の血中 EV 数の測定と EV 成分の同定：

まず、血中 EV 数と肝機能との関連を明らかにするため、アルコール関連肝疾患患者 51 人の血清を共同研究者から入手した。51 人の内訳は、男性 37 人・女性 4 人、肝硬変 41 人、年齢 40-86 歳 (median 64 歳)、アルブミン 4 g/dL (以下検査値は median で表示)、

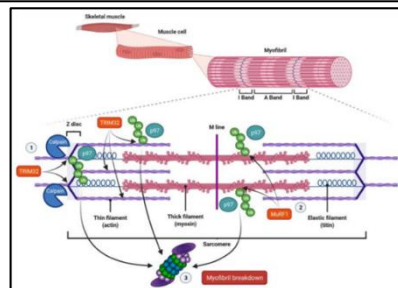
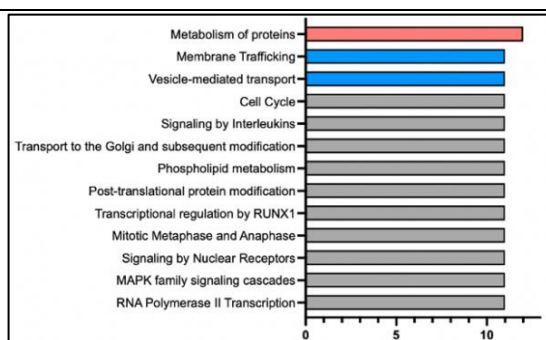
alanine transaminase (ALT) 25.0 IU/L, aspartate transaminase (AST) 38.0 IU/L, alkaline phosphatase (ALP) 94 IU/mL, γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) 58 IU/L であり、Psoas Muscle Index (PMI)基準でのサルコペニアは 15 人、Skeletal Muscle Mass Index (SMI)基準でのサルコペニアは 12 人であった。51 人の血清 EV 数を flow cytometry で測定したところ、血中 EV 数は血中 ALT, AST, triglyceride (TG)と正の相関を示した ($P<0.05$ 、ただし AST は $P<0.01$)。これまでの研究から、血中 EV 数は TG と強い正相関を示すことから、TG の影響を除外した血中 EV/TG 比と肝機能との相関関係を spearman 解析により追加検討した。その結果、血中 EV/TG 値は、ALT ($r=0.34$, $P<0.05$)、AST ($r=0.40$, $P<0.01$)、ALP ($r=0.36$, $P<0.05$)、albumin ($r=-0.48$, $P<0.001$)、natrium (Na) ($r=-0.30$, $P<0.05$)、ALBI score ($r=0.48$, $P<0.001$)、Child Pugh score ($r=0.30$, $P<0.05$)との相関を示した (下図)。また、肝硬変進展例で血中 EV/TG 値が高い傾向にあったが、有意差はなかった (なし vs. あり : 27000 vs. 52000)。さらに、PM や SMI でサルコペニアの基準を満たした患者では、血中 EV/TG 値がやや高い傾向にあったが、有意ではなかった (PMI なし vs. あり : 41000 vs. 62600、SMI なし vs. あり : 41000 vs. 65000)。これらの結果から、血中 EV 数は肝機能や肝予備能を反映することが明らかになり、血中 EV は主に肝細胞から放出されていることを見出した。



EV が含有する全 microRNA 成分 (EV-miR 成分) を同定するために、EV から miRNA を抽出して miR シーケンスを行った。なお、この解析には、アルコール、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、脂肪性 (非アルコール) の主要 4 成因を含むコホートを用いた。まず検出結果から、肝細胞に多く含有される miR-122 が高値で検出され、血中 EV は主に肝細胞から放出されていることが証明された。次に、検出された EV-miR 値を基に統計解析を行ったところ、サルコペニアなし 88 人とサルコペニアあり 57 人の 2 群比較で有意に変動した EV-miR は 47 種あり、このうちサルコペニアで低下したものが 42 種で、サルコペニアで上昇したものが 5 種であった。さらに、握力を除外し PMI 基準を用いて統計解析を行ったところ、PMI 正常 42 人と低下 107 人の 2 群比較で有意に変動した EV-miR は 118 種あり、PMI 低下で低下したものが 116 種で、PMI 低下で上昇したものが 2 種であった。このサルコペニアと PMI の 2 つの解析において、共通して検出された EV-miR は 13 種あった。Reactome analysis から、この 13 種は metabolism of proteins だけでなく、EV 形成や放出に関わる membrane trafficking, vesicle-mediated

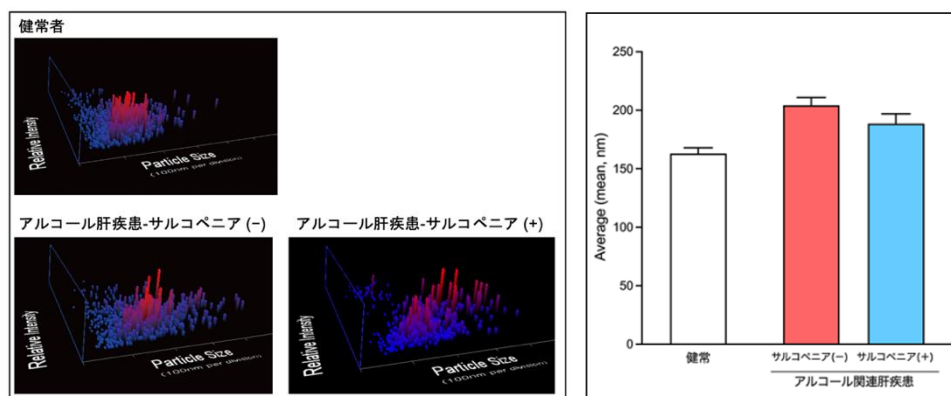
transport を含む複数の経路を制御していることが判明した（右図）。

アルコール関連肝疾患に特異的な血中 EV-miR が存在するかを検討するため、成因別の解析を行ったところ、サルコペニアの有無と成因（アルコール）で有意かつ特異的に変動する EV-miR が 10 種見つかった。この 10 種が制御する経路をデータベースから検索したところ、骨格筋で重要な経路である ubiquitin mediated proteolysis が含まれていることが分かった（右図）。



（２）アルコール関連肝疾患でサルコペニアを合併した患者の血中 EV が骨格筋細胞に及ぼす影響の解析：

アルコール関連肝疾患のうちサルコペニアを併発した患者と骨格筋が保たれた患者からそれぞれ 3 名の検体を選択した。この 6 名は全員男性で飲酒継続者であり、平均年齢はそれぞれ 64 歳と 61 歳であった。FIB4 index は、それぞれ 2.34 と 7.79 とグループ間で有意な差があったが ($P < 0.05$)、ALT、AST、albumin 等の一般検査数値には有意差はなかった。サルコペニアの有無に加え、PMI ($4.41 \text{ cm}^2/\text{m}^2$) vs. $6.66 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ ($P < 0.05$) および SMI ($6.1 \text{ kg}/\text{m}^2$) vs. $7.3 \text{ kg}/\text{m}^2$ ($P < 0.01$) にも 2 群間に有意差が認められた。さらにコントロールとして健常者 3 名の血清から EV を精製した。これらの精製 EV の粒子径を測定したところ、健常者の粒子径は均一であるのに比べて、アルコール関連肝疾患患者の粒子径には幅があることがわかった（下図 左）。粒子径は、健常者が 163 nm、アルコール関連肝疾患が 204.3 nm、アルコール関連肝疾患-サルコペニアが 188.7 nm であり、アルコール関連肝疾患由来 EV の粒子径が若干大きいことが分かった（下図 右）



精製したこれらの EV-miR の網羅的検出を現在おこなっており、これらの EV-miR が (1) から得られたプロファイルと一致するかについて検証する。

さらに、ヒト骨格筋細胞に EV を添加する実験を実施しているが、これまで実験系を確立していたマウス骨格筋細胞とは分化スピードが異なることから、現在実験系の最適化を目指して実験を遂行している。

5. 結果に対する考察・結論

アルコール関連肝疾患患者の血中 EV 数は、肝機能や肝予備能 (ALBI) と有意に関係したことから、血中 EV の多くは肝臓由来で占められていることが示唆された。ただし、血中の EV 数はサルコペニアの有無では変動しなかったことから、当初の予想通り、サルコペニアの有無に関しては EV-miR 成分が重要であることが確認できた。実際、サルコペニア有無と成因 (アルコール) で有意かつ特異的に変動する 10 種の EV-miR の同定に成功し、さらに、この EV-miR は骨格筋の制御に関与することも見出した。これらの結果から、血中 EV 数により肝疾患を、血中 EV-miR 成分によりサルコペニアを合併したアルコール関連肝疾患を判別できることを明らかになった。

さらに、アルコール関連肝疾患でサルコペニアを合併した患者の血液から精製した EV は、健常者の EV よりも粒子径が大きく、含有されている EV 成分に違いがあることが示唆された。現在、成分の網羅解析を行い、この仮説を検証中である。アルコール関連肝疾患 EV-miR が骨格筋細胞に影響をあたえると予想されているが、アルコール関連肝疾患患者の血中 EV-protein の中に、骨格筋細胞への作用を高める成分が含まれている可能性もあり、将来的に、EV-protein 成分の網羅的解析を実施し、検証する必要がある。

6. 今後の展望

本研究で新たに見出した、サルコペニア有無と成因 (アルコール) で有意かつ特異的に変動する 10 種の EV-miR を基に、アルコール関連肝疾患のサルコペニア合併症を予測できるバイオマーカーの開発へと発展させたい。また、データベースからは、この 10 種の EV-miR が標的とする遺伝子リストの中に骨格筋細胞内で変動した遺伝子は含まれていなかったが、骨格筋細胞の mRNA-シーケンスを行い変動した遺伝子を網羅的解析することで、新たな標的が見いだせる可能性がある。EV-miR をバイオマーカーとして使用するだけでなく、肝-筋連関を担う臓器間病態伝達体としての役割を明らかにし、将来的には治療につなげていきたい。

引用文献

- Ebadi M, Bhanji RA, Mazurak VC. et al. Sarcopenia in cirrhosis: from pathogenesis to interventions. *J Gastroenterol.* 54:845-859. 2019.
- Hara N, Iwasa M, Sugimoto R. et al. Sarcopenia and Sarcopenic obesity are prognostic factors for overall survival in patients with cirrhosis. *Intern Med.* 55:863-870. 2016.
- Iwasa M, Hara N, Terasaka E. et al. Evaluation and prognosis of sarcopenia using impedance analysis in patients with liver cirrhosis. *Hep Res.* 44:E316-317. 2014.
- Tajiri K and Shimizu Y. Branched-chain amino acids in liver disease. *TGH.* 3:47. 2018.
- Okubo T, Atsukawa M, Tsubota A. et al. Low vitamin D levels accelerates muscle mass loss in patients with chronic liver disease. *Plos One.* 19(3):e0299313. 2024.
- Kobayashi Y, Hara N, Sugimoto R. et al. The associations between circulating bile acids and the muscle volume in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Inter Med.* 56(7):755-762. 2017.
- Tamai Y, Egechi A, Shigefuku R. et al. Association of lithocholic acid with skeletal muscle hypertrophy through TGR5-IGF-1 and skeletal muscle mass in cultured mouse myotubes, chronic liver disease rats and humans. *Elife.* 11:e80638. 2022.
- Allen SL, Quinlan JJ, Dhaliwal A. et al. Sarcopenia in chronic liver disease: mechanisms and countermeasures. *Am J Physiol Gastrointest liver Physiol.* 320:G241-257. 2020. *Alcohol Clin Exp Res.* 41(8):1419-1431. 2017.
- Eguchi A, Iwasa M and Nakagawa H. Extracellular vesicles in fatty liver disease and steatohepatitis: role as biomarkers and therapeutic targets. *Liver Int.* 43(2):292-298. 2023.
- Eguchi A, Lazaro RG, Wang J. et al. Extracellular vesicles released by hepatocytes from gastric infusion model of alcoholic liver disease contain a microRNA barcode that can be detected in blood. *Hepatology.* 65(2):475-490. 2017.
- Eguchi A, Yan R, Pan SQ. et al. Comprehensive characterization of hepatocyte-derived extracellular vesicles identifies direct miRNA-based regulation of hepatic stellate cells and DAMP-based hepatic macrophage IL-1b and IL-17 upregulation in alcoholic hepatitis mice. *J Mol Med.* 98(7):1021-1034. 2020.

特記事項 ＜論文発表＞ なし
＜学会発表＞ Hayashi H, Miura K, Morimoto N, Watanabe S, Maeda H, Goka R, Eguchi A and Ymamoto H. The significant of extracellular vesicles number in patients with alcoholic liver injury. Internarional Liver Conference 2023
＜図書発表＞ 江口暁子、慢性肝疾患における細胞外小胞の役割。膜（特集：細胞外小胞研究の最前線 2024: 機能解明・制御と疾患連関）49(3):151-158. 2024.
＜産業財産権＞ なし