

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19557

研究課題名(和文)代謝と炎症を制御するミトコンドリアダイナミクス

研究課題名(英文)Impact of mitochondrial dynamics on metabolic disease and inflammation

研究代表者

王麗香(Wang, Lixiang)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20748793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア(Mt)は細胞内の代謝状態や様々な細胞外シグナルを感知し、動的にその構造を変化させている(Mtダイナミクス)。Mt分裂を制御するDynamin-related protein 1(Drp1)の肝細胞特異的欠損(Drp1LiKO)マウスの解析から、Mt分裂障害が、小胞体ストレスを介してFGF21の産生を亢進させ、全身のインスリン抵抗性を改善させることを明らかにした。一方、Drp1LiKOマウス肝組織では炎症所見を認めた。さらにオートファジー形成不全が炎症性サイトカインの産生増加に関与することを明らかにした。MtDIは糖・脂質代謝と炎症を制御する分子基盤であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are highly dynamic organelles that frequently fuse and divide in response to cellular energy demands, differentiation or pathological conditions. In vertebrates, dynamin-related protein 1 (DRP1) and mitochondrial fission factor control mitochondrial fission. In our previous study, by using liver specific DRP1 knockout (Drp1LiKO) mice, we reported that a defect in mitochondrial fission showed a protective role against diabetes and obesity. On the other hand, histological analysis revealed that Drp1LiKO liver exhibited severe inflammation and fibrosis, reminiscences of nonalcoholic steatohepatitis. Currently, we found that inflammatory cytokines were markedly increased in Drp1LiKO liver, possibly associated with the defective autophagic degradation and increased reactive oxygen species (ROS) generation. Thus, our results provide new insight into the role of mitochondrial dynamics in inflammasome activation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ミトコンドリアダイナミクス 糖脂質代謝 炎症反応 オートファジー 活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは (Mt) は生体内では融合と分裂を繰り返しながらダイナミックに構造を変化している (Mt ダイナミクス)。Mt と ER は、可逆的に会合と解離を繰り返しており、近年、Mt ダイナミクスの障害により生じる ER ストレスは、多くの代謝疾患の発症に関与すると考えられ始めている。

(2) 我々は Mt 分裂を規定する分子 Drp1 に注目し、肝細胞特異的 Drp1 欠損マウスを作成した。その結果: Mt と ER オルガネラネットワークの破綻により、小胞体ストレスを惹起。Drp1LiKO マウスの肝組織では高脂肪食負荷により、炎症性マーカーの増加、肝細胞死、肝繊維化がみられ、肝インスリン抵抗性を引き起こす。肝臓での表現型とは対照的に、高脂肪食下の Drp1LiKO マウス全身インスリン抵抗性の改善がみられ、個体レベルのエネルギーフローは脂肪をより多く燃焼し、高脂肪食による肥満に抵抗性を示した。その分子メカニズムとして、血中 Fgf21 が著しく増加していることを明らかにした。我々は肝臓での Mt ダイナミクスの障害が Fgf21 を介して全身のインスリン感受性や肥満抵抗性を改善させていることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

Mt ダイナミクスは多くの代謝疾患の発症に関与すると考えられ始めている。本研究では

- (1) 臓器間代謝ネットワークによるエネルギー代謝恒常性維持機構における肝 Mt ダイナミクスが果たす役割を解明するとともに、
- (2) 自然免疫における肝 Mt ダイナミクスが果たす役割を明らかにする。これらを踏まえ、肝 Mt ダイナミクスの制御を介した生活習慣病の予防法さらには革新的医薬品開発の基盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

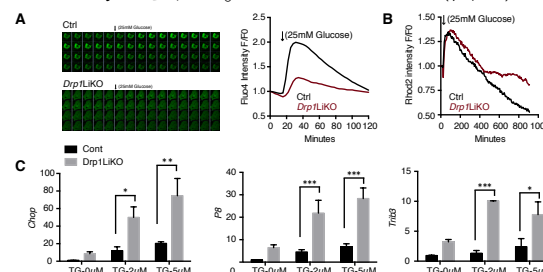
個体レベルの研究では、エネルギー代謝における Mt ダイナミクスの生理的意義を明らかにした。その後、研究を個体レベルの解析から細胞レベル、さらに分子レベルの解析へ進め、初代培養肝細胞を活用して、共焦点レーザー顕微鏡による LIVE 観察や Western Blot による発現解析や Flowcyte によるサイトカイン濃度測定などを主な手段として機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) Mt ダイナミクスの異常が如何にして ER ストレス惹起につながるか、そのメカニズムを解明した。まず、リン脂質代謝異常の有無を調べた。以前の報告によると、肥満では

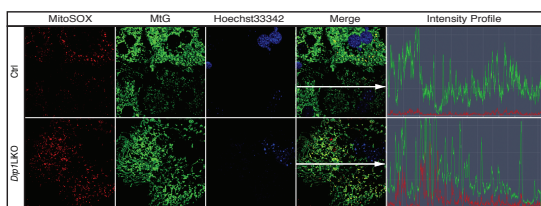
MAM におけるホスファチジルコリン/ホスファチジルエタノールアミンの割合 (PC/PE) が増加することがカルシウム恒常性を破綻させ、肝臓の ER ストレスを引き起こす。また、東大の新井教授らの報告によると、リン脂質中の脂肪酸組成が変化すると、小胞体ストレスが誘導される。HFD-Drp1LiKO マウスメタボローム解析の結果では、HFD-Drp1LiKO マウスにおいて長鎖脂肪酸の著しく増加が認められた。さらに、肝臓からリン脂質を抽出し、LC/MS においてリポドミクス分析測定を行って、PC、PE の変化を確認した。その結果、わずかな変化ではあるが、PC<sub>38:4</sub> の有意な増加及び PE<sub>36:5</sub> の有意な減少を確認した。

(2) Mt は小胞体と接近することによって Ca<sup>2+</sup> の受け渡しを行い、細胞機能を正常に維持している。次に、我々は Mt 及び ER カルシウムシグナリングを調べた。Fluo4 を使い、初代培養肝細胞を用いて Ca<sup>2+</sup> イメージングを行った結果、Drp1 欠損初代培養肝細胞において、ER からのグルコース応答性 Ca<sup>2+</sup> の放出低下を確認した (図 1 A)。また、Rhod2 を用いて、グルコース応答性 Mt からの Ca<sup>2+</sup> 放出の異常を確認した (図 1 B)。さらに、Thapsigargin (TG) 処理により ER カルシウム恒常性を破綻させた後、Drp1LiKO 肝細胞においての小胞体ストレスの亢進を確認した。結論として: Drp1LiKO マウスにおいて Mt と ER の Ca<sup>2+</sup> シグナリング異常が ER ストレスを惹起していることが考えられた。 (図 1)



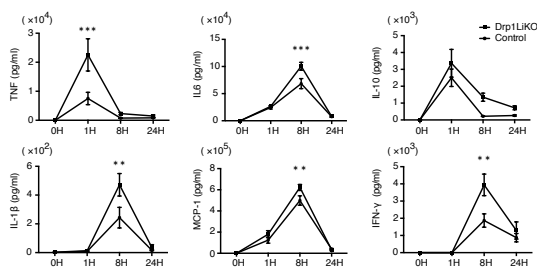
(3) Mt ダイナミクスの炎症発症における役割を解明した。Drp1LiKO マウスの肝臓では、炎症性マーカーの発現増加、肝細胞死、肝繊維化といった NASH 様所見を認めた。また、今までの報告によると、慢性炎症では、組織及び血中での活性酸素種 (ROS) が増大している事が示唆されており、酸化ストレス-炎症の関連が示唆された。そもそも、細胞内酸化ストレス生成系の重要な機序の一つとして、ミトコンドリア電子伝達系における電子の漏出であるため、ROS は ATP 産生において避けられない副産物である。そこで、我々は、ミトコンドリア分裂の障害に伴う炎症惹起の分子メカニズムを解明するため、野生型、Drp1LiKO マウスそれぞれから初代培養肝細胞を調整し、ROS 測定により、炎症反応における Mt ダイナミクスの役割を解析した。ミ

トコンドリアの ROS 産生は MitoSOX 試薬を用い、生細胞イメージング (図 2) とフローサイトメトリーにより評価した。その結果、Drp1LiKO 肝細胞ミトコンドリアの ROS 産生亢進が肝臓の炎症発症に関与することを明らかにした。(図 2)



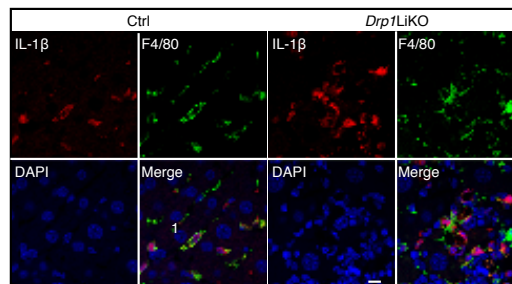
(4) Drp1LiKO マウスでは、Mt ダイナミクスの欠損により ER ストレスが惹起された。近年、しばしば ER ストレスが慢性炎症を引き起こすと報告され、Drp1LiKO マウス肝臓においての炎症反応の発症に ER ストレス応答が関与するかどうかを確認するために、野生型及び Drp1LiKO マウス由来の初代培養肝細胞を Thapsigargin で刺激し、ER ストレスの亢進を確認するとともに、IL6 や Tnf $\alpha$  などの炎症性サイトカイン発現をリアルタイム PCR および ELISA により定量評価した。その結果、野生型及び Drp1LiKO 細胞に有意な変化は見られなかった。

(5) TLR は膜貫通型レセプターで、自然免疫における病原体の認識に必須とされている。宿主細胞の Mt ダイナミクスが直接的に病原体認識、炎症発症にどのような役割を担っているかを調べるため、TLR リガンドとして代表的な分子、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) を用いて、野生型及び Drp1LiKO マウス及びこれらのマウス由来の初代培養肝細胞に投与し、炎症に関わる遺伝子の発現誘導をし、免疫応答を惹起した。具体的に、LPS を用いて、野生型及び Drp1LiKO マウスに腹腔内投与 (*In vivo*)、また初代培養肝細胞の培養液中に添加 (*In vitro*) し、血中及び培養上清中の炎症性サイトカインの産生を調べた。その結果、Drp1LiKO マウス血中 (図 3) および初代培養肝細胞で炎症性サイトカインの著明な産生亢進を認めた。(図 3)

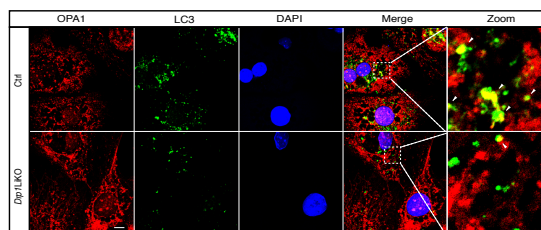


(6) インフラマソームは細胞質に存在するタンパク質の複合体で、炎症に際して活性化され、主には IL-1 $\beta$  や IL-18 の分泌を引き起こす。通常インフラマソームは、単球やマクロファージなどの骨髄系細胞に存在する

が、脂肪化肝細胞にも形成すると報告された。Drp1LiKO マウスの肝臓では IL-1 $\beta$  の著明な産生亢進が見られたため、インフラマソームによって開始された炎症応答の研究にも取り組み、野生型及び Drp1LiKO マウス及びこれらのマウス由来の初代培養肝細胞に LPS 及び ATP 刺激を加え、インフラマソームの活性化を確認した。その結果、インフラマソーム形成している細胞 (IL-1 $\beta$  陽性細胞) は主に肝臓マクロファージ (F4/80 陽性細胞) であることを分かった。(図 4)



(7) 近年、細胞内浄化システムとしてのオートファジーが 2 型糖尿病のような生活習慣病や各種の炎症の発症を抑止していることが報告され、また自然免疫においても重要な生理機能を持つことが明らかになった。吉森らは、哺乳類細胞のオートファゴソームは小胞体とミトコンドリアとの接触部位において形成されることを報告した。そこで、Drp1LiKO マウスを用い、Mt ダイナミクス欠損のオートファジー形成における役割を解明するとともに、オートファジーが Drp1 欠損マウスにおいての炎症発症に関与するかどうかを調べた。その結果、Drp1 欠損マウスにおいてのオートファジー形成不全が確認され、また、このオートファジー形成不全が炎症性サイトカインの産生増加にも関与することが明らかになった (図 5, OPA1: Mt マーカー; LC3: オートファージのマーカー; DAPI: 核)。(図 5)



## 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 2 件)

- ① Yano S, Ashida K, Nagata H, Ohe K, Wada N, Takeichi Y, Hanada Y, Ibayashi Y, Wang L, Sakamoto S, Sakamoto R, Uchi H, Shiratsuchi M, Furue M, Nomura M, Ogawa Y. Nivolumab-induced thyroid

dysfunction lacking antithyroid antibody is frequently evoked in Japanese patients with malignant melanoma. BMC Endocr Disord. 2018 Jun 8;18(1):36. doi: 10.1186/s12902-018-0267-x. 査読有

- ② Inoue C, Zhao C, Tsuduki Y, Udono M, Wang L, Nomura M, Katakura Y. SMARCD1 regulates senescence-associated lipid accumulation in hepatocytes. NPJ Aging Mech Dis. 2017 Aug 30; 3:11. doi: 10.1038/s41514-017-0011-1. eCollection 2017. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Lixiang Wang, Yuki Hanada, Naotada Ishihara, Masatoshi Nomura Ken Yamamoto. The role of mitochondrial fission in liver physiology and pathology. The 1st international YoungMito 2018. Kyoto, Japan. April 20-22, 2018
- ② 王麗香、野村政壽、蘆田健二、坂本昌平、井林雄太、武市幸奈、花田有希、小川佳宏。演題名:代謝と炎症を制御するミトコンドリアダイナミクス。第90回日本内分泌学会学術総会、ロームシアター京都と京都市勧業館みやこめっせ、2017年4月20日-22日
- ③ 王麗香、野村政壽。演題名: Mitochondrial fission in liver physiology。第94回日本生理学会大会、アクトシティ浜松、2017年3月28日-30日
- ④ Lixiang Wang, Yuki Hanada, Yuta Ibayashi, Yukina Takeichi, Shohei Sakamoto, Kenji Ashida, Masatoshi Nomura. Impact of mitochondrial dynamics on metabolic disease and inflammation. 7<sup>th</sup> World Congress on Targeting Mitochondria 2016. Berlin, Germany. October 24-26, 2016
- ⑤ 王麗香、蘆田健二、坂本昌平、井林雄太、嶋田伸吾、武市幸奈、花田有希、野村政壽。演題名:代謝と炎症を制御するミトコンドリアダイナミクス。第34回内分泌代謝学サマーセミナー、久山温泉ホテル夢家(福岡県久山町)、平成2016年7月14日-16日
- ⑥ 王麗香、蘆田健二、坂本昌平、井林雄太、嶋田伸吾、武市幸奈、花田有希、野村政壽。演題名:ミトコンドリア分裂の炎症における役割。第89回日本内分泌学会学術

総会、国立京都国際会館、2016年4月21日-23日

[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 0 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  
王麗香 (WANG Lixiang)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号: 20748793

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号:

(4) 研究協力者  
( )