

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09424

研究課題名(和文) 肝疾患病態における細胞内輸送に関連する分子機構の解析

研究課題名(英文) Intracellular trafficking in liver disease

研究代表者

阪森 亮太郎 (Sakamori, Ryotaro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10644685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Rab8aとRab8bが間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に相補的にはたらいているのかどうかについては不明である。この問題を解決するために、shRNAによりRab8b KDマウス胎児線維芽細胞を樹立し、また同様の方法でRab8a^{-/-}、Rab8b KDマウス胎児線維芽細胞を作成した。Rab8b KDマウス胎児線維芽細胞では、Rab8aノックアウトマウス胎児線維芽細胞と同様に、脂肪細胞への分化が障害されていることが示され、脂肪細胞への分化過程の誘導が減弱していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) / 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、慢性肝疾患の原因の一つであり、NASH は肝硬変や肝細胞癌に進展しうる。我が国におけるNAFLD の有病率は9～30%、NASH においては3～5%と推定され、ともに増加傾向と推測されている。NAFLD/NASHは内臓脂肪と関連し、脂肪細胞の発生についての理解が脂肪肝に対する加療において不可欠である。我々は細胞内輸送の観点から、脂肪細胞の分化誘導について検討を行った。本研究成果は脂肪肝成立メカニズムを理解する上で意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is unclear whether Rab8a and Rab8b have a complementary role of the adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells. In order to investigate this problem, Rab8b KD mouse embryo fibroblasts were established with shRNA, and Rab8a^{-/-}, Rab8b KD mouse embryo fibroblasts were prepared by the same method. In Rab8b KD mouse embryo fibroblasts, similar to Rab8a^{-/-} mouse embryo fibroblasts, it was shown that differentiation into adipocytes was impaired, and induction of the differentiation process into adipocytes was attenuated.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪細胞 脂肪肝 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) / 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、慢性肝疾患の原因の一つであり、NASH は肝硬変や肝細胞癌に進展しうる。我が国における NAFLD の有病率は 9 ~ 30%、NASH においては 3 ~ 5% と推定され、NAFLD については近年増加しており、NASH についても増加傾向と推測されている。肝細胞に中性脂肪が沈着し、炎症細胞浸潤や風船様肝細胞腫大を伴う病態であるが、そのメカニズムについては明らかでない点が多い。栄養として体内に取り込まれた脂肪が肝細胞内に取り込まれ、細胞内代謝あるいは細胞外へ排出される細胞内輸送の破綻が細胞内脂肪蓄積の病態に関与している可能性があるが、肝細胞内輸送に焦点を当てた検討はほとんどなされていない。

そこで我々は細胞内輸送を制御するキープレーヤーと考えられる Rab11a に着目した。Rab11a は細胞内への取り込みや細胞外への排出を選択的に行うリサイクリングエンドソームに重要な small GTPase の一つである。特に低密度リポタンパク質 (LDL) やコレステロールの取り込み受容体がリサイクリングエンドソームを介した細胞内輸送で制御されることが報告されている。またリサイクリングエンドソームを通過するタンパク質として、鉄やグルコースの取り込みに重要なトランスフェリン受容体や Glut4 などが知られており、Rab11a により制御されていることが報告されている。肝内の鉄過剰が肝発癌を誘導すること、糖尿病が肝発癌のリスク因子であることから、リサイクリングエンドソームを含む細胞内物質輸送が肝発癌を含む病態に関与していることが考えられる。また近年、肝星細胞においても Rab11 が TGF β 受容体 2 を介して肝星細胞を活性化し、細胞外マトリックスのリモデリング、血管新生、免疫抑制に関与することが報告されている (Tu K, et al. Hepatology 2015)。しかしいずれの報告も培養細胞での検討であり、遺伝子改変動物を用いた Rab11a の報告はない。

本研究では、肝細胞特異的 Rab11a ノックアウト (KO) マウスを用いて脂肪の肝細胞内輸送ならびに脂肪蓄積による肝障害を明らかにし、NAFLD/NASH における病態メカニズムを解明することで、NAFLD/NASH に対する治療ターゲットを明らかにすることを目的とする。また肝星細胞特異的 Rab11a KO マウスを作製し、細胞内輸送の肝癌への関与について解析することも目的とする。申請者は、Rab11a と同じ small GTPase である Cdc42 の腸管特異的 KO マウスを用い、腸管上皮幹細胞の極性維持や発生・分化に Cdc42 が不可欠であること、Cdc42 が大腸癌進展に関与することを *in vivo* モデルで初めて明らかにした。また同じく Rab タンパク質である Rab8a が細胞内輸送とともに Wnt シグナルを制御すること、さらに共同研究者である Nan Gao 教授 (Rutgers University, USA) とともに、腸管特異的 Rab11a KO マウスを用いて、Rab11a が TLR9、NF- κ B の経路に関与して炎症性サイトカインの産生を制御することや炎症性の腫瘍形成を制御することを見出してきた。また Rab11a の全身 KO マウスは胎生致死に至ることも明らかにしている。このように申請者は様々な KO マウスを用いて消化器臓器の遺伝子学的探索に取り組んできた。同様の手法を用いることで、肝細胞における細胞内輸送の役割を明らかにし、NASH や肝癌の病態解明や治療戦略の構築を目指したい。

2. 研究の目的

申請者らは、肝細胞の代謝機能の解析や、腸管上皮細胞における幹細胞・細胞極性のメカニズムを報告してきた。特にメンブレントラフィックに関わる small GTPase に着目し、疾患との関連を明らかにした。なかでも Rab11a は小胞のリサイクリングを制御する分子であるが、細胞極性や、受容体を含む膜蛋白の再利用など、細胞の機能・構築に重要であることが知られており、申請者らは Rab11a が炎症や発癌、免疫に関与することを見出してきた。本研究では、肝細胞特異的 Rab11a ノックアウトマウスを用いて、肝細胞における細胞内物質輸送ネットワークの視点からリサイクリングエンドソームならびに細胞内輸送の肝疾患への関与における分子機構の解明を目的として研究を行う。

リサイクリングエンドソームにより細胞内輸送される脂質関連蛋白として LDL 受容体が報告されている。LDL 受容体はコレステロール代謝に関与することから肝細胞内の脂肪の蓄積ならびに代謝を制御していると考えられる。そこで NAFLD/NASH における細胞内脂質輸送について肝細胞特異的 KO マウスを用いて検討する。さらに培養肝細胞ならびにヒト NASH サンプルを用いた解析を併せて行う。また NAFLD の病態にオートファジーが関与していることを報告しており、得られたサンプルを用いてオートファジーにおいて形成されるオートファゴソームの細胞内輸送メカニズムについても検討する。

また細胞内における脂肪生成、脂肪沈着について、*in vitro* での系を用いて検討する。マウス胎児線維芽細胞は、脂肪生成誘導剤に反応して脂肪細胞に成熟し、Canonical Wnt シグナルがその脂肪生成を阻害するが、Rab8a 欠損マウス胎児線維芽細胞における Wnt シグナルが、脂肪細胞の分化能に変化を及ぼすのかどうかについて検討を行う。

3. 研究の方法

胎生 12.5 日に妊娠メスマウスより胚を採取し、胎盤・卵黄嚢・子宮を摘出した後、頭部と内臓 (心臓、肝臓、脾臓、腸) を摘出した。尾は genotype のために保存し、残りの組織を、トリプシン-EDTA を含む 1.5 mL のエッペンドルフチューブに入れた上で、無菌状態で、組織をできるだけ細かく裁断した。37 °C の加湿チャンバー内で 10 分間インキュベートし、懸濁後、細胞をペレット化し、ピルビン酸ナトリウム、10% FBS、1.0 mg/mL PenStrep、および 0.05 mg/mL

ゲンタマイシンを含む DMEM にプレーティングした。実験開始前に細胞を 3 回継代して線維芽細胞を単離した。

細胞培養は 5%CO₂、37 °C の加湿チャンバー内で行い、胎児線維芽細胞は、ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、1.0 mg/mL PenStrep、および 0.05 mg/mL ゲンタマイシンを含む DMEM で 70%コンフルエンスで維持した。脂肪生成を誘発するために、細胞を 100%の集密度まで増殖させ、次に過密プレートとして 48 時間維持した。ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、1.0 mg/mL PenStrep、0.05 mg/mL ゲンタマイシン、1.0 μM デキサメタゾン、0.5 mM IBMX、5.0 mg/mL インスリン、および 1.0 μM ロシグリタゾンを含む DMEM で細胞を 48 時間インキュベートした。次に、ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、1.0 mg/mL PenStrep、0.05 mg/mL ゲンタマイシン、および 5.0 mg/mL インスリンを含む DMEM で細胞を 8 日間インキュベートした。誘導から 12 日以内に完全に脂肪細胞に分化した。脂肪細胞の脂肪滴を Bodipy 493/503 で染色し、Image J で定量化した。染色実験では、細胞を 6 ウェルプレートの 0.1%ゼラチンコーティングカバースリップにプレーティングし分化させた。細胞溶解物については、細胞を 10 cm² 培養プレートに播種させ分化させた。

肝細胞特異的 Rab11a KO マウスを用いた。Rab11a を flox 化した Rab11a lox/lox マウスは前述の Nan Gao 教授より供与され、当研究室が保有する Alb-Cre マウスと交配させることで Cre-loxP システムにより肝細胞特異的 KO マウスを作製した。また成長後にノックアウトを誘導するために Mx1Cre マウスとの交配も併せて行い、polyI.C.投与により Cre 発現を誘導する KO マウスも作製した。また仔マウスの尾より DNA を抽出し PCR 法によりマウスの遺伝子型 (Rab11a loxP 及び Cre) を同定した。KO マウスには Rab11a lox/lox; AlbCre マウスを使用し、コントロールには Rab11a lox/lox マウスを用いた。また適宜ヘテロタイプとして Rab11a lox/+; AlbCre マウスを使用した。Rab11a KO マウスマウスの尾より DNA を抽出し PCR 法によりマウスの遺伝子型を同定した。また shRNA により Rab8b KD マウス胎児線維芽細胞を樹立し細胞分化を観察した。

4. 研究成果

野生型のマウス胎児線維芽細胞を脂肪細胞に分化させたところ、脂肪生成とともに細胞内に Rab8a を認めた。Fabp4 や Glu4 の強発現がみられる成熟脂肪細胞では、未分化細胞に比べ、Rab8 と Rab11 の蛋白発現レベルが上昇していた。続いて、Rab8a 欠損マウス胎児線維芽細胞の脂肪生成能を評価した。野生型マウス胎児線維芽細胞は、分化誘導後、Rab8a 欠損マウス胎児線維芽細胞に比べ、早期に成熟し、成熟脂肪細胞はより大きな脂肪滴を有していた。分化した野生型マウス胎児線維芽細胞は β カテニンの発現、Tcf1 の発現レベルが低下しており、脂肪生成分化において Canonical Wnt シグナルが抑制されていた。一方、分化誘導された Rab8a 欠損マウス胎児線維芽細胞では、β カテニンや Tcf1 の発現レベルはむしろ増加していた。Rab8a 欠損マウス胎児線維芽細胞で Canonical Wnt シグナルを増強すると脂肪細胞の分化を低減させることを示していた。

次に、ショ糖勾配沈降アッセイを用いて、Wnt 刺激胎児線維芽細胞における LRP6 シグナルソームの細胞区画化を評価した。野生型胎児線維芽細胞では、Wnt3a 刺激の前に、LRP6 は主にフラクション 8~11 に出現したが、pLRP6 は長時間の曝露後でも細胞フラクションのいずれにおいてもほとんど検出されなかった。野生型胎児線維芽細胞の Wnt3a 刺激の 4 時間後、分画 8~11 に加えて、LRP6 レベルが増加し、分画 6 および 7 に拡大した (より重いショ糖勾配へのシフト)。pLRP6 は Dvl2 と GSK3β の共沈降が検出されたフラクション 8~10 で顕著に認められた。以前に報告された LRP6 小胞と Rab7+エンドソームの共局在、およびこれらの構造の多小胞体 (MVB) への成熟を反映して、Rab7 と Rab9 がこれらの分画に共沈殿していた。Wnt 刺激 pLRP6 は、Rab5 と Rab11 に富む初期エンドソームとリサイクルエンドソームでそれぞれ弱く観察された。野生型胎児線維芽細胞の Wnt 処理は、LRP6 および Rab9 とは逆の区画化となる Rab8a 小胞分画の顕著な右シフトをもたらした。これらの結果は、Wnt 誘発の動的 LRP6 シグナルソーム区画化が、野生型胎児線維芽細胞の Rab8a 小胞と逆相関していることを示唆していた。

Rab8 は Rab8a と Rab8b の二つのアイソフォームから構成され、Rab8b は Rab8a と同様に、cargo protein の apical 側への輸送や、LRP6 caveolae 依存的エンドサイトーシスを促進することによる Wnt シグナルの制御に関与している。Rab8a と Rab8b が間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に相補的にはたっているのかどうかについては不明である。この問題を解決するために、shRNA により Rab8b KD マウス胎児線維芽細胞を樹立し、また同様の方法で Rab8a^{-/-}、Rab8b KD マウス胎児線維芽細胞を作成した。Rab8a^{-/-}、Rab8bKD マウス胎児線維芽細胞は、通常のカバーガラスに接着しなかったため、0.1%ゼラチンコーティングしたカバーガラス上で培養し、培養期間を 5-6 日間から 12 日間に延長することで、接着が得られた。

Rab8b KD マウス胎児線維芽細胞では、Rab8a ノックアウトマウス胎児線維芽細胞と同様に、脂肪滴のサイズは小さく、Rab8a^{-/-}、Rab8b KD マウス胎児線維芽細胞においても小さい脂肪滴サイズであったことから、脂肪細胞への分化が障害されていることが示された。Rab8bKD 胎児線維芽細胞は、Kif3a^{-/-}胎児線維芽細胞と同様に脂肪滴の不足がみられた。脂肪細胞のマーカーである Glut4 と Fabp4 はいずれも Rab8a^{-/-}、Rab8b KD マウス胎児線維芽細胞において mRNA の発現が有意に低下していた。PPAR γ は軽度低下を認めていた。Rab8bKD 胎児線維芽細胞は、

野生型マウスの胎児線維芽細胞と比較して、これらの細胞における脂肪生成分化プログラムの誘導が弱いことを示された。また新生児 (P0) の無刺激の Rab8a^{-/-} マウスで皮下脂肪組織を調べたところ、明らかに脂肪組織が減少していた。骨格筋に隣接する脂肪組織においても同様の結果であった。これらのことから、Rab8 の欠失は脂肪細胞の分化を弱め、Rab8 が生理学的に脂肪生成を促進する可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 D'Agostino L, Nie Y, Goswami S, Tong K, Yu S, Bandyopadhyay S, Flores J, Zhang X, Balasubramanian I, Joseph I, Sakamori R, Farrell V, Li Q, Yang CS, Gao B, Ferraris RP, Yehia G, Bonder EM, Goldenring JR, Verzi MP, Zhang L, Ip YT, Gao N	4. 巻 79
2. 論文標題 Recycling Endosomes in Mature Epithelia Restrain Tumorigenic Signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4099 ~ 4112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-4075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Murai Kazuhiro, Hikita Hayato, Kai Yugo, Kondo Yasuteru, Fukuoka Makoto, Fukutomi Keisuke, Doi Akira, Yamai Takuo, Nakabori Tasuku, Fukuda Ryo, Takahashi Takeshi, Miyakawa Kei, Suemizu Hiroshi, Ryo Akihide, Yamada Ryoko, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Hepatitis C virus infection suppresses hepatitis B virus replication via the RIG-I-like helicase pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57603-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurahashi Tomohide, Yoshida Yuichi, Ogura Satoshi, Egawa Mayumi, Furuta Kunimaro, Hikita Hayato, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Kiso Shinichi, Kamada Yoshihiro, Wang I-Ching, Eguchi Hidetoshi, Morii Eiichi, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Kalinichenko Vladimir V., Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Forkhead Box M1 Transcription Factor Drives Liver Inflammation Linking to Hepatocarcinogenesis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 425 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2019.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suemura Shigeki, Kodama Takahiro, Myojin Yuta, Yamada Ryoko, Shigekawa Minoru, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 CRISPR Loss-of-Function Screen Identifies the Hippo Signaling Pathway as the Mediator of Regorafenib Efficacy in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1362 ~ 1362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11091362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kegasawa Tadashi, Tatsumi Tomohide, Yoshioka Teppei, Suda Takahiro, Ikezawa Kenji, Nakabori Tasuku, Yamada Ryoko, Kodama Takahiro, Shigekawa Minoru, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Takehara Tetsuo	4. 巻 517
2. 論文標題 Soluble UL16-binding protein 2 is associated with a poor prognosis in pancreatic cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 84 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	巽 智秀 (Tatsumi Tomohide) (20397699)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	疋田 隼人 (Hikita Hayato) (20623044)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究協力者	G a o N a n (Gao Nan)	Rutgers University・Associate Professor	