

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15814

研究課題名（和文）ヒト培養肝細胞を用いた非アルコール性脂肪肝炎の *in vitro* モデルの作成研究課題名（英文）Constructing *in vitro* non-alcoholic steatohepatitis model using human cultured hepatocyte

研究代表者

村上 英介（Murakami, Eisuke）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：30813175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：近年増加傾向にある非アルコール性脂肪肝炎は、肝細胞内の脂肪蓄積、単核球浸潤と壊死性炎症、肝星細胞活性化による肝線維化を特徴とする原因不明の進行性肝疾患である。本研究では、これら三系統の細胞株を用いて、非アルコール性脂肪肝炎の肝内に類似した条件で細胞間の相互作用の検証を *in vitro* で行った。活性化単核球細胞、培養肝細胞、肝星細胞の共培養にて、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の存在下で、肝星細胞の活性化を認めた。さらにTM6SF2遺伝子のノックダウンを行った細胞株による共培養にて、肝星細胞の活性化と肝細胞内の脂肪合成亢進が同時に認められ、非アルコール性脂肪肝炎の病態に類似した培養系と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、脂肪肝を特徴とする非アルコール性脂肪性肝炎が増加し、健康上の問題の一つとなっている。その背景には、正確に病態を再現した実験系が確立されていない点が挙げられる。非アルコール性脂肪性肝炎の正確な機序はまだ不明であるが、肝細胞の脂肪蓄積と膨化、腸管細菌由来因子の流入と単核球の肝内浸潤、肝星細胞活性化による膠原線維増加と肝線維化が進行し、遺伝的背景も関与する事が明らかになっている。肝細胞、単核球、肝星細胞の各培養細胞を共培養し、遺伝的ナリスク因子であるTM6SF2遺伝子の条件を加味し、非アルコール性脂肪性肝炎の病態をより正確に模倣したモデルを構築することは、社会的に意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Non-alcoholic steatohepatitis, which is characterized by fat accumulation in hepatocytes, necro-inflammatory change with monocyte infiltration, and liver fibrosis due to hepatic stellate cell activation, is an increasing chronic progressive liver disease of unknown cause. In this study, the cell-to-cell interactions were verified using *in vitro* co-culture experiments which conditions were similar to those in liver with non-alcoholic steatohepatitis. In the co-culture of activated monocyte, cultured hepatocyte, and hepatic stellate cell, activation of hepatic stellate cells was observed in the presence of high saturated fatty acid, palmitic acid condition. Furthermore, co-culture with TM6SF2- knocked down cell lines showed activation of hepatic stellate cells and increased fatty acid synthesis in hepatocytes at the same time. This result might be considered to be one of the suitable culture systems similar to the pathophysiology of human non-alcoholic steatohepatitis.

研究分野：慢性肝疾患

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 肝星細胞 TM6SF2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、肝炎ウイルスに対する抗ウイルス治療の進歩により、B型C型肝炎ウイルス性肝炎の治療と良好な制御が可能となってきた一方で、非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)の増加が著しく、現在の本邦の有病率は25.24%と報告されている。アルコール摂取と関連のない脂肪肝として、かつては予後良好と考えられていたNAFLDであるが、肝細胞脂肪化と共に慢性炎症や肝線維化を伴う、非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)が約30%併発すると考えられ、NASHは進行慢性肝疾患および肝発癌の発生源母地として、肝疾患治療の大きな問題となっている(Hepatology, 2015)。発症に関連する因子は多岐にわたり、NASH発症のメカニズムは、未だ十分には明らかにはなっておらず、臨床的には肥満、脂質異常症、高血圧症が報告されている(Hepatology, 2015)。これらの疾患は、食生活の変化や近代的なLife-styleと密接にかかわる生活習慣病であることが知られており、昨今のNAFLD/NASHの世界的な増加とよく一致する結果となっている。基礎研究の分野では、NASH発症と病態進展に関与する分子機構は多数報告されており、主なものでは、脂肪組織由来のadiponectin(Nature, 2006)、食餌と内臓脂肪由来の飽和脂肪酸による細胞障害(Hepatology, 2007)、過剰脂質による酸化ストレス(Int J Mol Med, 2007)、小胞体ストレス(Gastroenterology, 2008)、鉄代謝異常(Hepatology, 2012)、腸内細菌由来のlipopolysaccharide(Ann Hepatol, 2012)、オートファジー障害(Hepatology, 2016)などが報告されている。これら多数の因子を一元的に説明することはいまだ困難であり、多因子が同時複合的に相関し、複数の細胞内代謝経路、シグナル経路を経て病態を進展させるmultiple parallel hits hypothesisが提唱されている(Hepatology, 2010)。また、NASH肝の炎症と線維化進行に関しては、マクロファージの活性化と肝組織への集積、肝星細胞の活性化が、重要な役割を果たしている(Gastroenterology, 2007)。肝細胞だけでなく、周辺の細胞群も関与していることが、NASHの病因が複雑である背景にあると考えられ、細胞間の情報伝達に関わるNon-coding RNAs(Gut, 2015)や分泌小胞exosome(Sci Rep, 2017)が重要な役割を担っていると報告されている。NASHの病態が十分に解明されていない要因の一つに、これら生体内小分子による細胞間の相互作用に関する知見が限られている可能性がある。NASHの発症と進展のメカニズム、および治療法を確立するためには、そのクロストークを解析する必要があると考えた。これまで報告されているNASHモデルは、主に肝脂肪化と肝線維化を伴うマウスを用いた解析が主であるため、ヒト肝細胞内の遺伝子変化に高い類似性を示すものの、完全に病態を再現したものではない可能性がある。本研究では、ヒト由来肝細胞を用いた細胞実験系を用いて、肝細胞脂肪化と肝星細胞活性化が同時進行するNASHの病態を再現することを目指した研究であり、NASHにおける細胞間相互作用の位置づけが可能となれば、その各細胞システムの抑制がNASHの治療法の一つとなりうる可能性がある。また、NASHの遺伝的要因に関して、ゲノムワイド関連解析によりpatatin-like phospholipase domain containing 3やTransmembrane 6 superfamily 2(TM6SF2)の一塩基多型は、NASHの疾患感受性と肝線維化に関連していると報告されている(PLoS Genet, 2011)。このうち、TM6SF2は小腸と肝に高発現する膜蛋白であり、肝細胞内の脂質代謝に関連すると報告されているが、正確な機能はいまだ不明であり、肝細胞と周囲細胞間における役割とクロストークとの関連も明らかではない(Hepatology, 2015)。本研究では、*in vitro*モデルにおけるTM6SF2の影響も併せて検証し、遺伝的素因も加味した実験系構築を試みた。

2. 研究の目的

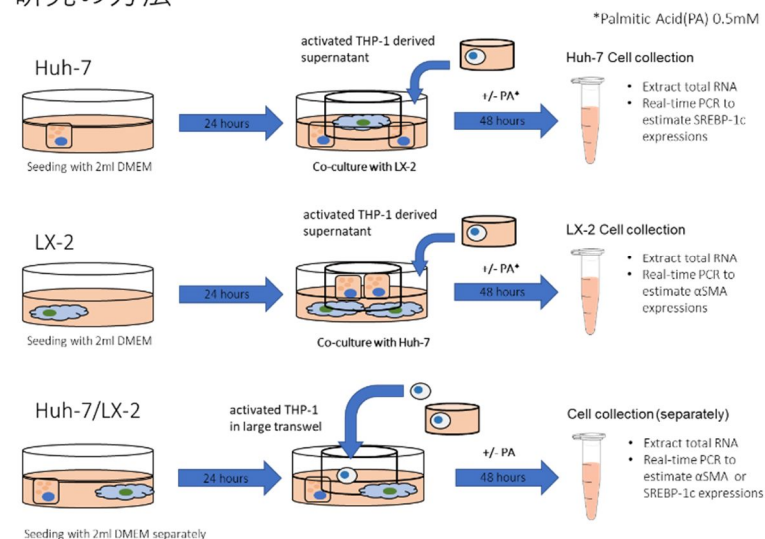
本研究では、細胞間の情報伝達に関わる生体内小分子が相互に作用し、NASH発症と関連するという仮説を立て、肝細胞、肝星細胞、単球の3系統の細胞を、NASHに関連する因子を加えて共培養する*in vitro*モデルを用いて、肝細胞と周辺細胞間における相互作用の検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト肝内微小環境に近似可能なcell-lineの実験系として、培養ヒト肝癌細胞株(Huh-7)、培養ヒト不死化肝星細胞株(LX-2)、培養ヒト単球株(THP-1)を用い、6ウェルのマルチプレートと細胞フィルターを介したトランスウェルタイプの実験系を用いる(右図)。

下層に相当するマルチプレート内、および上層に相当するトランスウェル内に対象とする細胞を播種し、24時間後に共通の

研究の方法



DMEM 培養液に交換して共培養を開始し、24 ないしは 48 時間後に細胞を回収する。回収した細胞溶解液から RNA を精製し、標的とする遺伝子の発現量の変化を、GAPDH で補正したリアルタイム PCR 法で解析する。対象細胞はマルチプレート下層からのみ回収し、LX-2 の活性化は細胞内 α -smooth muscle actin(α SMA)の変化で、Huh-7 の脂肪合成は細胞内 sterol regulatory element-binding protein 1c(SREBP-1c)の変化で評価した。共培養の際に、代表的な飽和脂肪酸の一つであるパルミチン酸(PA: 0.5 mmol/L)の添加/非添加の比較を行った。また、単球との共培養は、活性化 THP-1 を 24 時間培養した培養上清の添加を行う方法と、THP-1 をトランスウェル内で活性化し 72 時間後に共培養する方法の 2 つを用いた。THP-1 の活性化は、phorbol myristate acetate(PMA)の刺激を用いた。さらに、共培養系において TM6SF2 遺伝子を強制発現ないしはノックダウンした場合においても比較検討するため、クローニングした野生型 TM6SF2 の全長配列を、ベクターに挿入し TM6SF2 発現プラスミドを作成した。また、TM6SF2 遺伝子配列をターゲットとする siRNA を作成した。プラスミドおよび siRNA を Huh-7 ないしは LX-2 にトランスフェクションした後に共培養し、上記と同様の解析を行った。

4. 研究成果

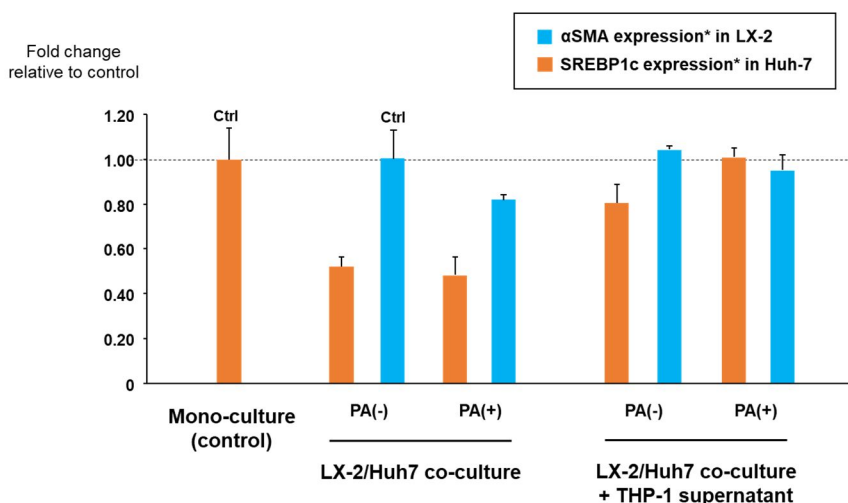
肝星細胞株 LX-2 と活性化した単球株 THP-1 の培養上清を用いた予備実験において、活性化 THP-1 の培養上清と PA は相加的に LX-2 内 α -SMA 発現を 1.2-1.5 倍程度上昇させる結果であった。また、肝癌細胞株 Huh-7 の予備実験において、活性化 THP-1 の培養上清の影響は認められなかったが、PA

は Huh-7 内 SREBP 発現を 1.5 倍程度上昇させる結果であった。活性化 THP-1 培養上清中には、複数の炎症性サイトカインの濃度上昇が認められ、LX-2 活性化の一因子と推定された。LX-2 と Huh-7 の共培養では、PA 添加と活性化 THP-1 の培養上清は、それぞれが相加的に LX-2 内 α -SMA と Huh-7 内 SREBP の発現を上昇させる結果であった(右図、結果 1)。

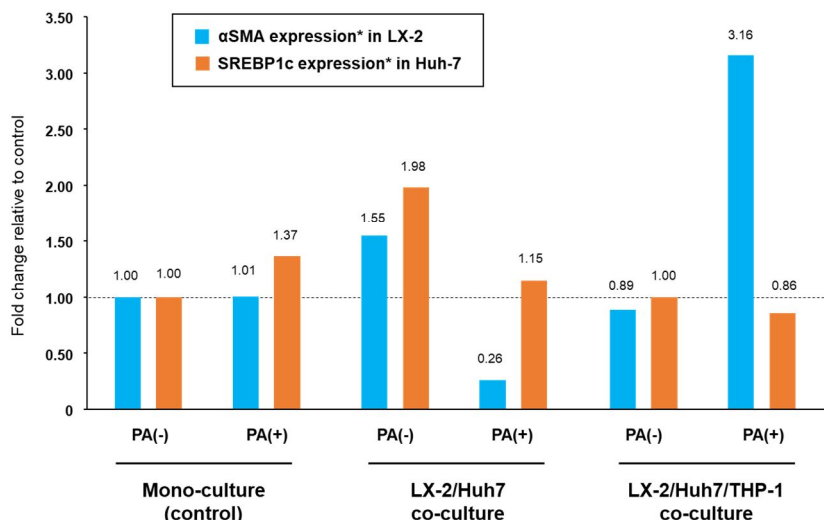
活性化 THP-1 培養上清に替えて、THP-1 をトランスウェル内で PMA を添加にて活性化した後に、LX-2 および Huh-7 と共培養する実験系の検討では、それぞれの細胞株を単独で培養したコントロールと比較し、LX-2 内 α -SMA の発現は一定の傾向を示さず、Huh-7 内 SREBP の発現はむしろ抑制される結果であった(右図、結果 2)。

3 種類の培養細胞が共培養される場合は、別の因子の介在する可能性を想定し、NASH の疾患感受性遺伝子の一つとして知られている TM6SF2 の一塩基多型の影響を検討した。当研究室の別の解析にて、TM6SF2 は Huh-7 および LX-2 の両方の細胞株において恒常的に発現し、細胞質に局在することを免疫染色にて確認しており、TM6SF2 の配列特異的な siRNA を用いたノックダウンにおいて、両方の細胞株

結果1



結果2

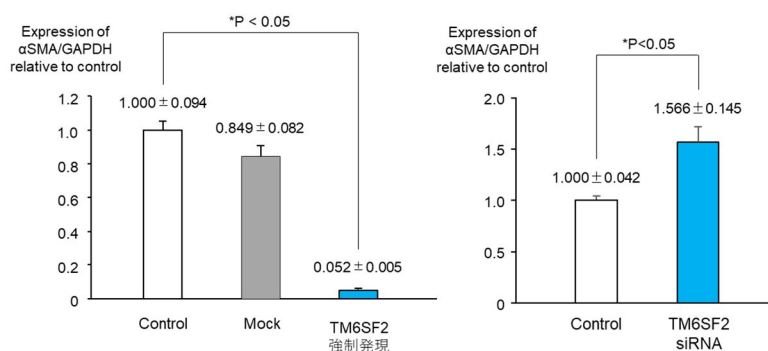


確認しており、TM6SF2 の配列特異的な siRNA を用いたノックダウンにおいて、両方の細胞株

において遺伝子発現が抑制されることも確認していた。TM6SF2 発現プラスミドをトランスフェクションする強制発現系の解析では、コントロールと比較して LX-2 内 α -SMA が有意に抑制され、逆にノックダウンの解析では LX-2 内 α -SMA が有意に上昇する結果であり、TM6SF2 は LX-2 内 α -SMA を負に制御する結果であった(右図、結果 3)。

結果3

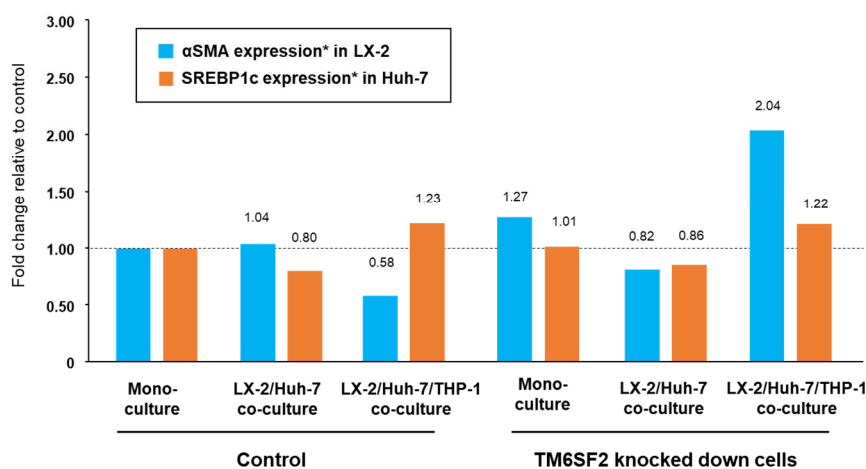
α SMA expression in LX-2



既報では、TM6SF2 のノックダウンにより、*in vitro* で肝細胞の脂肪化が促進されることが報告されているため(Sci Rep, 2019)、TM6SF2 をノックダウンした

結果4

Huh-7 と、同じく TM6SF2 をノックダウンした LX-2 の共培養の解析を行った。TM6SF2 をノックダウンした共培養では、コントロールと比較して LX-2 内 α -SMA と Huh-7 内 SREBP の発現を上昇させる結果であった(右図、結果 4)。



以上の結果より、肝細胞脂肪

合成亢進および肝星細胞活性化が同時進行で確認される結果が得られ、本研究の共培養モデルはヒト NASH の微小環境に類似した状態が再現可能であったと考察した。これらの結果の一部は、Molecular Medicine Reports 誌に報告した (Mol Med Rep. 2021;23(1):16. doi: 10.3892/mmr.2020.11654.)。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Liu Songyao, Murakami Eisuke, Nakahara Takashi, Ohya Kazuki, Teraoka Yuji, Makokha Grace, Uchida Takuro, Morio Kei, Fujino Hatsue, Ono Atsushi, Yamauchi Masami, Kawaoka Tomokazu, Miki Daiki, Tsuge Masataka, Hiramatsu Akira, Abe-Chayama Hiromi, Hayes Nelson, Imamura Michio, Aikata Hiroshi, Chayama Kazuaki	4. 巻 23
2. 論文標題 In vitro analysis of hepatic stellate cell activation influenced by transmembrane 6 superfamily 2 polymorphism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上英介
2. 発表標題 推定内臓脂肪重量を用いた非アルコール性脂肪性肝炎の病態評価
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上英介
2. 発表標題 治療介入を要する門脈圧亢進症を伴った非アルコール性脂肪性肝炎の臨床的特徴,
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上英介
2. 発表標題 2型糖尿病合併NASHに対するGLP-1受容体作動薬とSGLT2阻害薬の治療効果の解析
3. 学会等名 第23回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上英介
2. 発表標題 基準未満の習慣飲酒を伴う非アルコール性脂肪肝炎の臨床的特徴
3. 学会等名 第42回日本肝臓学会西武会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上英介
2. 発表標題 治療介入を要する門脈圧亢進症を伴った非アルコール性脂肪性肝炎の臨床的特徴
3. 学会等名 第55回日本門脈圧亢進症学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------