

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07202

研究課題名（和文）制御性T細胞が決定する肝免疫環境から見た2型糖尿病の薬物性肝障害の解明

研究課題名（英文）Regulatory T cells and drug-induced liver injury in type 2 diabetes

研究代表者

濱田 和真（HAMADA, Kazuma）

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：90596884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病脂肪肝モデル動物を用いて肝免疫環境に関する解析を実施した。ミトコンドリア膜障害で漏出する自己由来の炎症・免疫応答誘導分子は非糖尿病ミトコンドリアとは異なること、糖尿病肝組織の遺伝子発現プロファイルに免疫学的相違が存在することをオミクスデータに基づき明らかとし、2型糖尿病の脂肪肝病態時における薬物性肝障害の宿主感受性を説明する機構として免疫学的背景の違いを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患・病態という宿主因子を免疫応答性の相違と捉え、2型糖尿病脂肪肝における免疫環境をオミクスデータに基づく生命情報科学的手法を用いた解析を導入して明らかとした。特に不明な点が多い肝毒性初期免疫応答としてミトコンドリアを起点とした肝細胞応答に迫った。得られた成果は肝毒性応答の全体像をシステムとして包括的に理解することにつながり、肝免疫に着目した肝障害回避、予測、治療戦略開発に加え、ライフスタイル変化に伴い世界中で増加している脂肪性肝疾患の分子病態解明、創薬標的の同定、それら研究領域の技術創出に知見を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Alterations in immune responsiveness associated with various diseases and pathological conditions are important host factors, alongside genetic predispositions, in understanding the susceptibility and mechanisms of idiosyncratic drug toxicities. This study utilized a type 2 diabetes fatty liver model to investigate the liver immune environment. The results indicate that self-derived molecules involved in immune responses leaking from mitochondria in response to a hepatotoxic compound differ between diabetic and non-diabetic states. Furthermore, immunological differences in gene expression profiles of diabetic liver tissue were observed. These findings highlight the immunological background as a key factor in explaining the host susceptibility to drug-induced liver injury in type 2 diabetes.

研究分野：代謝免疫学、システム毒性学

キーワード：2型糖尿病 脂肪肝 薬物性肝障害 ミトコンドリア 肝免疫環境 オミクス解析

1. 研究開始当初の背景

特定のヒトに発症する薬物性肝障害 (DILI) は宿主因子、化合物特性、環境因子が多層的に交錯することで発現する複雑な病態であり、潜在的风险を予測するための技術開発が重要な研究課題とされてきた。ゲノムワイド解析により抗原提示分子である HLA 遺伝子多型との関連性が明らかにされ、免疫介在性の機序解析が加速した。第 2 の免疫学的因子として CTLA4 や PD-1 が注目され、これらの遺伝子を改変したマウスモデルや阻害抗体を用いた解析から免疫学的寛容の破綻が DILI の発症に寄与することが示唆された。こうした潮流から免疫応答関連因子を基盤として、ヒト様 DILI を模倣あるいは予測する *in vivo*、*in vitro* モデルの確立を目指した研究が展開される状況にあった。

これに対し疾患・病態は遺伝的要因と並んで宿主の DILI 発症感受性を規定する非遺伝的な要因として注目されていたが分子学的メカニズムは不明であり、議論の余地が数多く残されている領域であった。糖尿病患者数は当時世界 4 億 2500 万人、2045 年には 6 億 9300 万人に到達すると予測され (IDF Diabetes Atlas, Eighth edition)、脂肪性肝疾患を筆頭に慢性炎症が根底にある、がん、心血管疾患など種々疾患の発症とも関連があり、免疫システムを標的あるいはオフターゲット効果により刺激する化合物が創薬における臨床試験の場を含め糖尿病罹患者に使用される機会が増加することは必然と言えた。また、糖尿病患者において CTLA4 依存的に T 細胞応答を負に制御する CD4CD25 陽性制御性 T 細胞 (Treg) が減少することが報告されていた。

2. 研究の目的

上述した背景のもと研究代表者は mtDNA 漏出を介した自然免疫応答誘導への関与が示唆されるミトコンドリア膜透過性遷移の化合物反応性が糖尿病モデル動物において上昇することを見出し、疾患モデルを活用することで正常肝では予測できない免疫応答性や DILI 宿主感受性を検出できる可能性を示した (挑戦的萌芽 2014)。この知見をさらに発展させて Treg が減少した肝免疫環境の応答性を明らかにすることは糖尿病と DILI 感受性の相互作用に関する知見の分子学的な理解の糸口となり、疾患特徴的な免疫応答を基盤とした DILI モデルの構築や未知病態解明につながることを期待された。そこで本研究では糖尿病を宿主免疫応答性の変容と捉え、DILI の発症感受性およびメカニズムの解明を目的として肝免疫環境を明らかにする研究を実施した。さらに、免疫制御に基づく DILI の発症予防、回復促進など新規な治療戦略の開発につなげることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 肝毒性化合物による毒性初期免疫応答の基礎的解析

これまで肥満 2 型糖尿病脂肪肝モデル db/db マウスは非糖尿病マウスと比して肝毒性化合物により誘発されるミトコンドリア膜透過性遷移の感受性が高いことを見出している。ミトコンドリア膜透過性遷移は膨潤、膜障害により mtDNA や膜間腔分子 cytochrome c (cyt c) など炎症、細胞死シグナルの放出につながると考えられており、db/db マウスではそれらシグナルの放出も同様に強いと想定された。そこで肝毒性化合物を介した肝細胞内における毒性初期免疫応答としてミトコンドリア膜透過性遷移誘発後の上清を用いて mtDNA、cyt c の放出を real time-PCR、ウエスタンブロットにより評価した。ミトコンドリア画分は既報に従い摘出肝から遠心分離法により調製した (Nat Protoc.2009;4 (11))。

(2) 肝障害シグナルとしてのミトコンドリア漏出分子の網羅的解析

ミトコンドリアはシグナル伝達を担うオルガネラであり、上述した炎症関連分子のみならずストレスを受けると様々な自己由来成分が細胞質あるいは細胞外に放出され種々細胞応答を誘発すると考えられた。そこでミトコンドリア膜透過性遷移誘発後に漏出する分子群の全体像を理解する目的で方法 (1) と同様ミトコンドリア上清を用いて data-independent acquisition (DIA) プロテオーム解析を実施した。さらに同定した分子群を用いて、プロファイリングおよび分子同士の制御関係を加味したネットワーク解析等を実施した。

(3) 糖尿病マウスにおけるミトコンドリアを介した免疫応答の適用性の検証

現在様々な糖尿病モデルマウスが存在する。そこで db/db マウスで観察される肝ミトコンドリアストレス応答が他の糖尿病モデルマウスにおいても適用できる現象であるか検証した。具体的には過食、体重増加・肥満など類似した表現型を呈するが血糖プロファイル、炎症部位等に相違が報告されている他の糖尿病脂肪肝モデルマウスの肝ミトコンドリアにおいて肝毒性化合物を処置してミトコンドリア膜透過性遷移を評価した。

(4) 肝組織における免疫環境の定量的解析

一連の解析で見出した糖尿病脂肪肝モデル db/db マウス肝細胞における初期免疫応答としてのミトコンドリア毒性感受性、漏出分子が関連するイベントとのつながりを解析し、肝細胞における薬物応答性、免疫環境をシステムとして包括的に理解する目的で、肝組織を用いて RNA-Seq による網羅的な遺伝子発現解析を実施した。また、取得したデータに対してさらなる知見や解釈を得る目的で生命情報科学的手法を用いた解析を実施した。

4. 研究成果

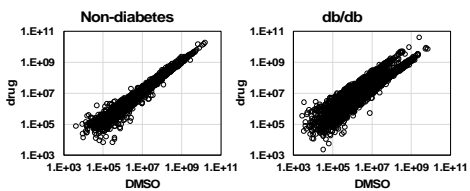
(1) 肝毒性化合物による毒性初期免疫応答の基礎的解析

db/db マウス肝ミトコンドリアは非糖尿病マウス肝ミトコンドリアと比べて肝毒性誘発化合物によるミトコンドリア膜透過性遷移が強く起こり、mtDNA、cyt c が顕著に放出された。肝毒性の弱い化合物に対する反応性は糖尿病群と非糖尿病群に差は見られなかった。したがって 2 型糖尿病脂肪肝ではミトコンドリア障害性を持つ薬物に対する毒性感受性が高いことに連動して免疫・炎症、細胞死シグナルの放出が顕著であることが明らかとなった。

(2) 肝障害シグナルとしてのミトコンドリア漏出分子の網羅的解析

DIA 質量分析による定量プロテオーム解析を実施して肝ミトコンドリア上清から 3000 種類以上の分子を同定した。その中で 500 種類以上および 100 種類以上の分子が db/db および非糖尿病対照マウスにおいてミトコンドリア膜透過性遷移誘発後の上清で変動した(上図)。したがって、ミトコンドリア膜透過性遷移に依存して漏出する分子は db/db マウスにおいて顕著であることが明らかとなった。さらに同定した分子群に対して GO 情報を付与して mitochondrion (GO:0005739) でフィルタリングしたところ、多くのミトコンドリア発現分子が漏出・変動していることがわかった。またそれら変動分子群の中から免疫応答、細胞死制御に関連する分子を同定した。さらに変動した分子群に対して KeyMolnet によるネットワーク解析を実施し、糖尿病マウスと非糖尿病マウスにおけるミトコンドリア漏出分子の違いを可視化するとともに、それら分子群と関連が深い生物学的イベント、病態、パスウェイを統計学的に記述し、糖尿病脂肪肝と非糖尿病正常肝の応答性の違いに関する全体像を示した(下図)。関連が深いイベントとして、ミトコンドリアダイナミクス、sirtuin シグナル、肝毒性等が検出された。

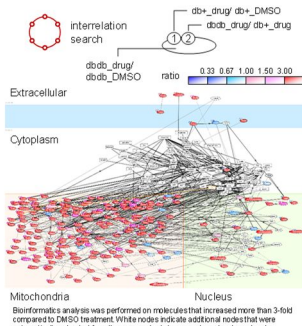
Proteomic analysis of the supernatant of liver mitochondria prepared from diabetes and non-diabetes mice



Molecular network analysis of the released proteins after MPT induction in diabetic liver mitochondria

List of the top 20 pathways and pathological events

Pathway	Score	Pathological Event	Score
TCA cycle	168.3	Mitochondrial dynamics	71.4
Sirtuin signaling	122.8	Zinc physiology	58.6
Amino group metabolism	92.2	Ischemia-Reperfusion Injury	49.2
Fatty acid beta oxidation	92.3	Calcium Signaling in Cardiac Myocytes	45.7
Transcriptional regulation by ERF	88.7	Ribosome biogenesis	39.3
Glycylserine/threonine metabolism	79.0	Nutrient Sensing	25.2
Oxidative phosphorylation	75.1	Wound Repair	24.6
Glutamate metabolism	69.5	Cardiac Hypertrophy	24.8
Isoleucine metabolism	69.3	Thermogenesis	23.9
Succinate signaling	67.5	Glucose Neurotoxicity	22.4
Oligoic pathway	59.3	Ecdysis	21.7
Alanine/aspartate metabolism	54.3	Mitochondrial Transcription	20.6
Urea cycle	51.4	Histonia	20.5
Leucine metabolism	49.1	Lipid Droplet	18.5
Lysine metabolism	48.4	UV Response	18.5
SUC2L5 carrier family	42.2	Cancer Chemotherapy	18.3
Cytokine signaling	47.7	Axonal Transport	18.2
H2O metabolism	48.9	Hepatic fibrosis	18.1
HSP90 signaling	46.0	Neurodegeneration	17.9
N-Acetylserine/aspartate metabolism	42.6	Neurologic Disorders	17.6



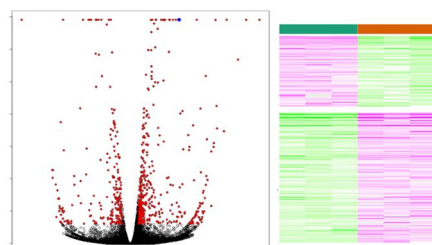
(3) 糖尿病マウスにおけるミトコンドリアを介した免疫応答の適用性の検証

db/db マウスの解析結果とは異なり、他の糖尿病マウス肝ミトコンドリアにおいて明らかな化合物感受性の変化は見られなかった。また、本研究で使用している肝毒性モデル化合物以外の化合物を用いた解析においても同様の結果であった。そこで、次に db/db マウスの病態初期肝ミトコンドリアを用いてミトコンドリア膜透過性遷移を解析した。その結果、程度は弱いものの非糖尿病マウス肝ミトコンドリアに比べて感受性が高いことが明らかとなった。これより、糖尿病脂肪肝の免疫応答性、肝障害感受性の制御機構として着目しているミトコンドリア応答性は病態期に伴って変動し、一方で糖尿病脂肪肝の解析に広く使用されているモデルマウス間でも異なるという重要な知見を得た。

(4) 肝組織における免疫環境の定量的解析

糖尿病脂肪肝における薬物性肝障害の宿主感受性を肝免疫環境の視点から明らかにするためのデータを取得する目的で肝組織を用いた RNA-Seq 解析を実施した。これまでの生化学的解析から db/db マウス脂肪肝ミトコンドリアに肝毒性化合物を直接作用させると mtDNA など自己由来の自然免疫応答を誘導するダメージ関連分子パターンが顕著に放出されることを見出している。さらに、シグナル伝達のプラットフォームとしての役割を担うミトコンドリアから肝毒性化合物依存的に放出される分子群を同定し、ネットワーク解析を活用することで

遺伝子発現変化の網羅的解析



肝細胞において惹起される種々生物学的事象を抽出した。これら知見を基盤として肝応答・免疫環境を包括的に理解する目的で肝組織を用いて網羅的遺伝子発現データを取得した。得られたRNA-Seqデータの構造を解析して有意に発現変動している遺伝子群を同定した(図)。さらにネットワーク解析、主成分分析、GO エンリッチメント解析等の生命情報科学的なアプローチによって肝免疫環境を説明する遺伝子発現変化および pathway に関する知見を得た。

以上、糖尿病脂肪肝における薬物性肝障害の宿主感受性を説明する機構として、オミックスデータを用いた生命情報科学的解析の導入によりミトコンドリア毒性を介した自然免疫応答を含む肝免疫環境の相違が明らかとなった。本研究により、糖尿病罹患時の肝障害宿主感受性を免疫背景の変容として捉え分子メカニズムを明らかにする基礎、応用研究をさらに展開、発展させるための重要な基盤が構築された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 濱田 和真
2. 発表標題 オミクスデータを用いたデータ駆動型の非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 濱田 和真
2. 発表標題 肥満型NAFLDにおける肝ミトコンドリア輸送担体の発現変化
3. 学会等名 第44回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱田 和真
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患における肝ミトコンドリア呼吸機能の適応変化
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuma Hamada, Takashi Mizuma
2. 発表標題 Identification of upstream factors that regulate susceptibility to drug-induced mitochondrial toxicity in NAFLD
3. 学会等名 情報計算化学生物学会(CBI学会)2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuma Hamada, Takashi Mizuma
2. 発表標題 Proteomic analysis of mitochondria to elucidate the immune-mediated drug-induced liver injury in NAFLD
3. 学会等名 2023 ICCP450/JSSX International Joint Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱田 和真
2. 発表標題 Proteomic approach to identify the mechanisms of increased susceptibility to a hepatotoxic drug-induced mitochondrial permeability transition
3. 学会等名 2023年日本バイオインフォマティクス学会年会・第12回生命医薬情報学連合大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱田 和真、水間 俊
2. 発表標題 MPT依存的免疫反応の解明に向けたNAFLDミトコンドリアのプロテオーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱田 和真、望月 祐佳里、森谷 元貴
2. 発表標題 胆汁酸-薬物相互作用に関するin vitroミトコンドリア毒性評価
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱田 和真、水間 俊
2. 発表標題 NAFLDモデルマウス間でのミトコンドリア薬物感受性の差異
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱田 和真、水間 俊
2. 発表標題 ミトコンドリアプロテオーム解析によるNAFLDの薬物性肝障害の解明
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱田 和真、水間 俊
2. 発表標題 薬物性肝障害リスク評価系開発を目標としたNAFLDミトコンドリア応答性の網羅的解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会/第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱田 和真、水間 俊
2. 発表標題 ミトコンドリア膜透過性遷移から迫るNAFLDの薬物性肝障害機序
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuma Hamada, Takashi Mizuma
2. 発表標題 Mitochondrial permeability transition as a trigger of immune-mediated drug-induced liver injury in obese type 2 diabetes
3. 学会等名 第28回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuma Hamada, Takashi Mizuma
2. 発表標題 Mitochondrial dysfunction is a possible determinant of susceptibility to drug-induced hepatotoxicity in NAFLD
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田 和真、岡田 みのり、林 美沙希、水間 俊
2. 発表標題 2型糖尿病の薬物性肝障害機序としてのミトコンドリア膜透過性遷移
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田 和真、笹本 友香、三田 志保、豊田 秀花、中田 千尋、水間 俊
2. 発表標題 アモジアキン肝障害モデルの構築と感受性変動因子の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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
---------	---------