

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17955

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎におけるエクソソームを介した脂肪組織-肝臓関連機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of exosome-mediated crosstalk between adipose tissue and liver in nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

小宮 力 (Komiya, Chikara)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60825256

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)：肥満マウスの血中エクソソームが内包するmiRNA(エクソソームmiRNA)を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、肥満で増加するエクソソームmiRNAを同定した。低酸素応答に必須の遺伝子を脂肪組織で欠損するマウスの検討から、増加したエクソソームmiRNAの一部は脂肪組織の低酸素応答により放出が制御される可能性が示唆された。これらのエクソソームmiRNAは、脂肪組織と肝臓の臓器連関に与える可能性が推測されたが、動物実験の結果からは、NASHの病態に与える影響は限定的だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満において、血中のエクソソームが内包するmiRNAの変化を経時的に解析し、脂肪組織の低酸素応答により変化すると変化しないものがあることを見出した。今後、個々のmiRNAについて、脂肪組織と肝臓の臓器連関への関与を検討することで、NASHに対する新たな治療標的の創出に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive analysis of serum exosomal miRNAs from obese mice using next-generation sequencing revealed that specific exosomal miRNAs are increased in obesity. Experiments with mice lacking a gene essential for hypoxic response in adipose tissue suggested that some of the increased exosomal miRNAs in obesity are possibly secreted from hypoxic adipose tissue. Although it was speculated that these exosomal miRNAs might be involved in crosstalk between adipose tissue and liver, animal studies indicated that they have a limited effect on the pathophysiology of NASH.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：エクソソーム miRNA 肥満 NASH

## 1. 研究開始当初の背景

肥満人口の増加から、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) による肝硬変、肝細胞癌の増加が必至であり、その対策は最も重要な臨床課題の一つである。肥満による脂肪組織炎症を起点とした脂肪組織-肝臓連関が NASH の病態形成に重要と考えられているものの、その分子機構は、これまでに行われてきた精力的な研究によっても未だ不明な点が多い。

エクソソームは、低酸素などの細胞環境に応じて放出される細胞外小胞で、放出細胞に由来する miRNA (エクソソーム miRNA) などが受容細胞に送達され、細胞間の情報伝達を担うことが明らかになってきた。一方、肥満の脂肪組織では低酸素ストレスを生じており、脂肪組織の慢性炎症に中心的な役割を果たすと考えられている。最近、脂肪組織に由来するエクソソーム miRNA が肝臓に送達され、肝臓の遺伝子発現を調節することが報告され (*Nature* 2017)、脂肪組織の低酸素ストレスに起因するエクソソーム miRNA を介した脂肪組織-肝臓連関が NASH の発症に関与する可能性を着想した。

## 2. 研究の目的

エクソソームの放出と、肥満による脂肪組織炎症の双方に関与する低酸素応答に着目し、HIF-1 の活性化により脂肪組織から放出されるエクソソーム miRNA が NASH の病態に与える影響を検討することで、液性因子や神経による既存の機序では捉えきれなかった未知の脂肪組織-肝臓連関を見出し、NASH の病態形成における新規分子機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て、指針を遵守して行った。

野生型マウスは日本クレアより購入した C57BL/6J マウスを用い、後天的脂肪組織特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損マウスは、ジャクソン研究所より購入した C57BL/6J バックグラウンドの Adipoq-Cre/ERT2 Tg/+ マウスと Hif-1 $\alpha$  flox マウスを交配して作製した。高脂肪食は、60kcal%脂肪含有飼料 (Research Diets) を使用した。

### (2) 血中エクソソーム miRNA の解析

マウスの血清から、miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen) を用いてエクソソームを分離し、miRNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて RNA を回収した。QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen) を用いてライブラリを調整し、次世代シーケンサーを用いて miRNA を網羅的に解析した。変動した miRNA について、TaqMan advanced miRNA assays (Thermo Fisher Scientific) を用いて、RT-qPCR で検証した。

### (3) 肝臓、脂肪組織における遺伝子発現の解析

マウスの肝臓、脂肪組織から、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を回収し、Fast SYBR Green Master Mix Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて、RT-qPCR により遺伝子発現を検討した。また、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) を用いてライブラリを調整し、次世代シーケンサーを用いて mRNA を網羅的に解析した。変動した遺伝子について、DAVID Bioinformatics Resources 6.8 を用いて GO 解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 高脂肪食誘導肥満で増加する血中エクソソーム miRNA

野生型マウスに通常食または高脂肪食を給餌すると、経時的に脂肪組織の炎症、肝臓の脂肪蓄積、炎症が増悪した。血中エクソソーム miRNA を網羅的に解析すると、高脂肪食給餌 8 週で 19 種類、高脂肪食給餌 16 週で 117 種類のエクソソーム miRNA が通常食給餌に比して 1.5 倍以上に増加していた (図 1)。

### (2) 高脂肪食誘導肥満で HIF-1 $\alpha$ 依存的に脂肪組織から放出される血中エクソソーム miRNA の探索

Adipoq-Cre/ERT2 Tg/+; Hif-1 $\alpha$  flox マウスと Adipoq-Cre/ERT2 +/+; Hif-1 $\alpha$  flox マウスに高脂肪食を 16 週給餌後、タモキシフェンを 5 日投与し、血中エクソソーム miRNA を網羅的に解

析すると、後天的脂肪組織特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損マウスでは、40 種類のエクソソーム miRNA が対照マウスに比して 0.8 倍以下に減少していた (図 1)。このうち、高脂肪食給餌 16 週で増加したエクソソーム miRNA と共通するものは 17 種類で、高脂肪食誘導肥満で HIF-1 $\alpha$  依存的に脂肪組織から放出されるエクソソーム miRNA の候補と考えられた (図 1)。

(3) 高脂肪食誘導肥満で脂肪組織特異的に HIF-1 $\alpha$  を欠損させたときの肝臓における急性の遺伝子発現変化

Adipoq-Cre/ERT2 Tg/+; Hif-1 $\alpha$  flox マウスと Adipoq-Cre/ERT2 +/+; Hif-1 $\alpha$  flox マウスに高脂肪食を 16 週給餌後、タモキシフェンを 5 日投与し、肝臓の mRNA を網羅的に解析すると、後天的脂肪組織特異的 HIF-1 $\alpha$  欠損マウスでは、対照マウスに比して、131 種類の mRNA が 0.5 倍以下に減少し、73 種類の mRNA が 2 倍以上に増加していた。GO 解析では、発現が増加した遺伝子にはインターフェロン応答に関与するものが多く含まれていた (図 2)。

図1 高脂肪食誘導肥満でHIF-1 $\alpha$ 依存的に脂肪組織から放出されるエクソソームmiRNAの候補

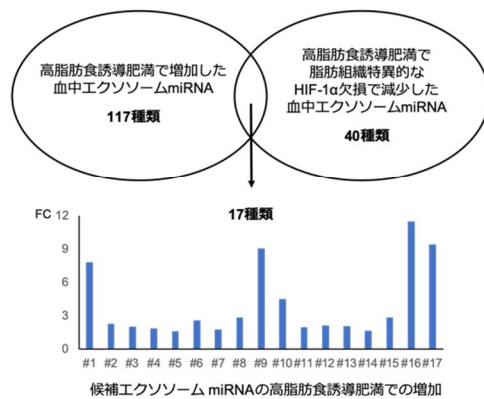
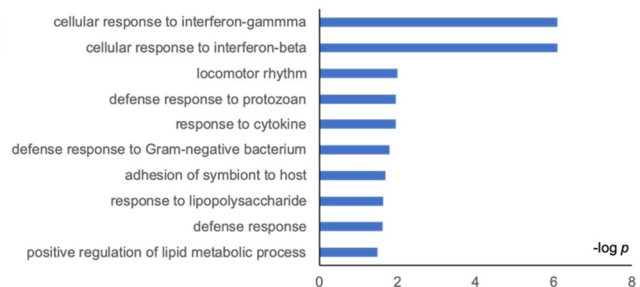


図2 高脂肪食誘導肥満で脂肪組織特異的にHIF-1 $\alpha$ を欠損させたときに肝臓で発現が増加した遺伝子のGO解析



(4) 高脂肪食誘導肥満で脂肪組織特異的に HIF-1 $\alpha$  を欠損させたときに NASH の病態に与える影響の検討

Adipoq-Cre/ERT2 Tg/+; Hif-1 $\alpha$  flox マウスと Adipoq-Cre/ERT2 +/+; Hif-1 $\alpha$  flox マウスに高脂肪食を 8 週給餌後、タモキシフェンを 5 日投与し、その後、高脂肪食をさらに 8 週給餌して、脂肪組織、肝臓の解析を行った。遺伝子発現では、肝臓における  $\beta$  酸化の亢進が示唆されたが、脂肪組織の炎症、肝臓の炎症、線維化については明らかな差を認めず (図 3)、体重、肝重量、肝臓の脂肪蓄積にも差を認めなかった (図 4)。

図3 脂肪組織特異的HIF-1 $\alpha$ 欠損マウスに高脂肪食給餌を続けたときの脂肪組織・肝臓における遺伝子発現

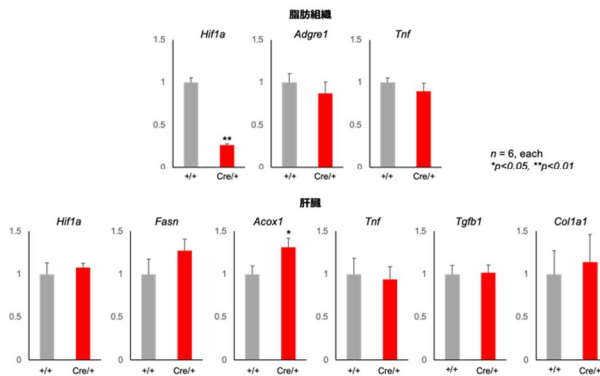
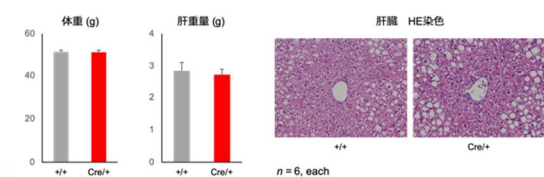


図4 脂肪組織特異的HIF-1 $\alpha$ 欠損マウスに高脂肪食給餌を続けたときの体重、肝重量、肝臓組織像



以上より、高脂肪食誘導肥満で血中のエクソソーム miRNA は大きく変化し、その一部は脂肪組織の HIF-1 $\alpha$  により制御される可能性が示唆されたが、これらの NASH の病態に与える影響は限定的と考えられた。今後、他の機序で制御されて高脂肪食誘導肥満で変化したエクソソーム miRNA の NASH の病態への関与を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Yujiro, Komiya Chikara, Shimizu Hitomi, Mishima Hiroyuki, Shiba Kumiko, Tsujimoto Kazutaka, Ikeda Kenji, Kashimada Kenichi, Dateki Sumito, Yoshiura Koh-ichiro, Ogawa Yoshihiro, Yamada Tetsuya	4. 巻 67
2. 論文標題 A case of ezetimibe-effective hypercholesterolemia with a novel heterozygous variant in ABCG5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1099 ~ 1105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ20-0044	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 Fukuda T, Bouchi R, Asakawa M, Takeuchi T, Shiba K, Tsujimoto K, Komiya C, Yoshimoto T, Ogawa Y, Yamada T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Sarcopenic obesity is associated with a faster decline in renal function in people with type 2 diabetes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabet Med	6. 最初と最後の頁 105-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dme.14153	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3件

1. 著者名 小宮力、山田哲也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 6
3. 書名 日本臨牀 増刊号 高血圧学 上	

1. 著者名 小宮力、山田哲也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ エクソソームと疾患医学	

1. 著者名 小宮力、小川佳宏、山田哲也	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 7
3. 書名 日本臨牀 NAFLD/NASH	

〔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
---------	---------