

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17653

研究課題名（和文）細胞外ATPによる肝臓VLDL分泌促進の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying hepatic VLDL secretion induced by extracellular ATP.

研究代表者

蓮澤 奈央（Hasuzawa, Nao）

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：00837908

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）：Vesicular nucleotide transporter (VNUT)はATP小胞分泌を担うトランスポーターである。申請者は、VNUTが肝臓の炎症と代謝制御に関わり、その阻害薬がVLDL分泌を抑制し、脂肪肝を改善することを報告してきた。本研究では、肝細胞のATP小胞分泌を分子レベルで解明し、肝脂肪蓄積とVLDL分泌過剰の悪循環にアプローチすることを目指した。研究期間を通し、肝細胞におけるCa²⁺、ブドウ糖、脂肪酸応答性ATP分泌を明らかにし、エイコサペンタエン酸の膜電位脱共役によるATP分泌阻害を報告した。さらにVNUTの阻害薬を特許出願し、脂肪肝、肝線維化の阻害作用を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝機能障害関連脂肪肝疾患（MASLD）および同脂肪肝（NASH）が引き起こすインスリン抵抗性は、様々な生活習慣病の合併を引き起こすメタボリックシンドロームの根本病態として注目されている。例えば動脈硬化の原因になる高LDLコレステロール血症は、肝臓におけるVLDLの合成及び分泌の亢進が原因となる。本研究では細胞内にエネルギー供給するATPがVNUTというトランスポーターを介して肝臓で細胞外に分泌されると、炎症とVLDL分泌を引き起こすメカニズムに着目し研究を行った。ATPの細胞外分泌を抑制する新たなVNUT阻害薬を発見し、そのMASLD・MASH抑制効果を証明し、特許を出願した。

研究成果の概要（英文）：Vesicular nucleotide transporter (VNUT) is responsible for ATP vesicular secretion. We previously reported that VNUT is involved in the regulation of both inflammation and metabolism in the liver and that its inhibitors suppress VLDL secretion and the development of steatohepatitis. The present study aimed to elucidate the molecular mechanisms of ATP vesicle secretion in hepatocytes and to explore the vicious cycle between hepatic fat accumulation and excessive VLDL secretion. We found that: 1)ATP secretion in hepatocytes is dependent on Ca²⁺ influx, and a rise in glucose or fatty acid levels. 2)Eicosapentaenoic acid deconjugates vesicular membrane potential and inhibits ATP secretion. 3)A novel VNUT inhibitor was found, which shows inhibitory effects on steatohepatitis and liver fibrosis, leading us to file a patent.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：MASLD MASH VLDL ATP VNUT メタボリックシンドローム

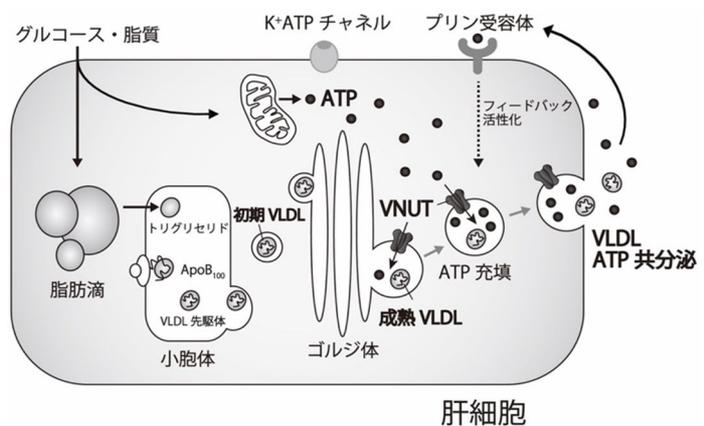
1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)・脂肪肝炎(NASH)が引き起こすインスリン抵抗性は、様々な生活習慣病の合併を引き起こすメタボリックシンドロームの根本病態として注目されている。例えば動脈硬化の原因になる高 LDL コレステロール血症は、肝臓における VLDL の合成及び分泌の亢進が原因となる。一見奇妙なことに、VLDL 分泌と肝脂肪蓄積は正相関することが知られている。すなわち、NAFLD では高頻度に高トリグリセライド (TG)血症を合併し、VLDL の分泌と脂質蓄積はともに亢進している。肝脂肪蓄積はさらなるインスリン抵抗性を惹起し VLDL 分泌を亢進させ、全身のインスリン抵抗性はさらに悪化する。しかし、メタボリックシンドロームにおけるこの悪循環の根本にある、VLDL 分泌と脂質蓄積の調節機構の詳細は、ほとんど明らかになっていない。

申請者らはこれまで、ATP の細胞外への小胞分泌を担う Vesicular nucleotide transporter (VNUT)の機能に関する研究を進める中で、肝細胞からの VNUT 依存性 ATP 分泌が VLDL 分泌を促進することを見出した(Tatshusima, and Hasuzawa et al., *BBAMBD* 2021) (図 1)。この VNUT 依存性の ATP 小胞分泌は、高脂肪食誘発性 NASH のインスリン抵抗性、肝脂肪蓄積、炎症細胞浸潤、肝線維化に関わっており、VNUT 阻害薬であるクロドロン酸の投与はこれらの病態を全て抑制した (*Sci Rep*,2021)。これは、現在本邦でも罹患率が約 30% に達する NAFLD と、その進行形で

現在有効な治療薬の存在しない NASH に対する新しい創薬アプローチを可能にする発見であると同時に、VLDL 分泌と肝脂肪蓄積の動的制御を初めて明らかにしたという点で生理学的意義を持つ発見であった。

本研究ではこの制御機構の分子生物学的解明を行い、肝臓の ATP 小胞分泌をターゲットとした新たな NAFLD,NASH 治療法の開発に繋げることを目指した。



(図 1)肝細胞の ATP/VLDL 分泌

2. 研究の目的

肝臓における ATP 分泌の分子機構を解明する。これにより、メタボリックシンドロームの根本病態である肝脂肪蓄積と VLDL 分泌過剰の悪循環にアプローチする、新しい治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞培養細胞 HepG2 株を用い、Krebs-Ringer 液に、イオノマイシン、グルコース、EGTA 等を添加し、10 分後上清を回収し、ATP 測定キットにて測定した。ATP 分泌量は細胞のタンパク量で補正した。

(2) 野生型および VNUT 遺伝子ノックアウトマウスの初代培養肝細胞を用い、クロドロン

酸 10 μ M, 0.1 μ M BafilomycinA1 がキナクリンの小胞蓄積に与える効果を、共焦点顕微鏡 (Olympus)にて観察した。

(3) ウシの副腎からクロマフィン顆粒を抽出し、膜小胞の ATP 依存性 pH (酸性内部) 形成を、20mM MOPS-トリス、pH7.0、0.1K KCl、0.2M スクロース、5mM 酢酸 Mg、0.2 μ g パリノマイシン、2 μ M アクリジンオレンジからなるバッファー2ml 中で、励起波長 420nm、発光波長 500nm のアクリジンオレンジの蛍光消光を用いて測定した。

(4) ヒトケラチノサイト培養細胞において、薬剤 A,B,およびクロドロン酸による ATP 分泌阻害効果を検討した。さらにチオアセタミド 50mg/kg を週 3 回マウスに腹腔内注射し肝臓の線維化を誘発した。チオアセタミド投与 1 週間後より、薬剤 A を 40mg/kg 経口投与し、8 週間後に肝臓の線維化を SMA 染色により観察した。

4 . 研究成果

(1) 肝細胞における Ca²⁺、ブドウ糖、脂肪酸応答性 ATP 分泌の解明

ヒト肝細胞培養細胞 HepG2 株に対し、Ca²⁺イオノフォアであるイオノマイシン(io)を添加すると 10 分間で、上清中の ATP 濃度の上昇を認めた (図 2)。この反応は、VNUT 阻害薬のクロドロン酸(Clo)により抑制された、また HepG2 細胞からの ATP 分泌は、低温、EGTA による Ca²⁺キレートにより抑制されたことから、Ca²⁺ influx 依存性の開口分泌であることが明らかになった。また、グルコース濃度を 10mM から 25mM に増加させると ATP 分泌が見られ、この反応は、25mM グルコースと同等の浸透圧である 10mM グルコース + 15mM マンニトールでは見られなかった。(Hasuzawa N et al, *in preparation*)

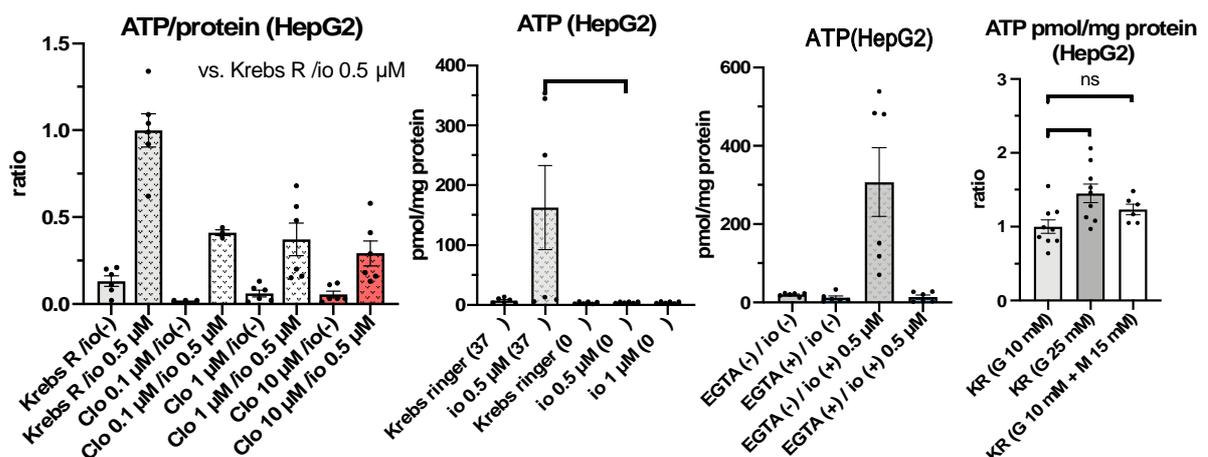


図 2 HepG2 細胞の ATP 分泌

(2)キナクリンプローブを用いた、ATP 含有小胞の可視化の検討

また、VNUT 遺伝子ノックアウトマウス初代培養肝細胞を用い、これまで、ATP の小胞貯蔵を可視化する蛍光プローブとして用いられてきたキナクリンは、小胞への ATP 蓄積ではなく、膜貫通酸性 pH 勾配 (pH) に反応することを見出し、

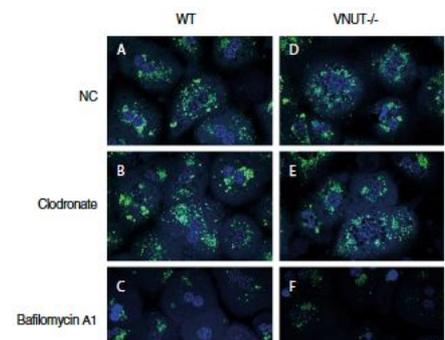


図 3 キナクリンと ATP 含有小胞

報告した。(Hasuzawa N et al. *Purinergic Signal*. 17(4):725-735,2021).

(3) エイコサペンタエン酸の膜電位脱共役による ATP 分泌阻害

エイコサペンタエン酸 (EPA) が VNUT の阻害薬であるとする報告 (Kato Y et al. PNAS.2022) を受け、クロマフィン顆粒を用いて EPA の VNUT に対する作用を検討した。クロマフィン顆粒膜小胞を含む緩衝液に ATP を添加すると、アクリジンオレンジの蛍光が消光し、ATP 依存的に膜全体で pH (酸性内部) が形成されるが、EPA は 5 μ M で ATP 依存性の pH 形成を阻害した。EPA は VNUT を特異的に阻害するのではなく、膜電位を脱共役することによって、ATP 等の小胞分泌を低下させることが分かった (Moriyama Y, Hasuzawa N et al. *Front Pharmacol*, 7;13:1080189, 2022)。

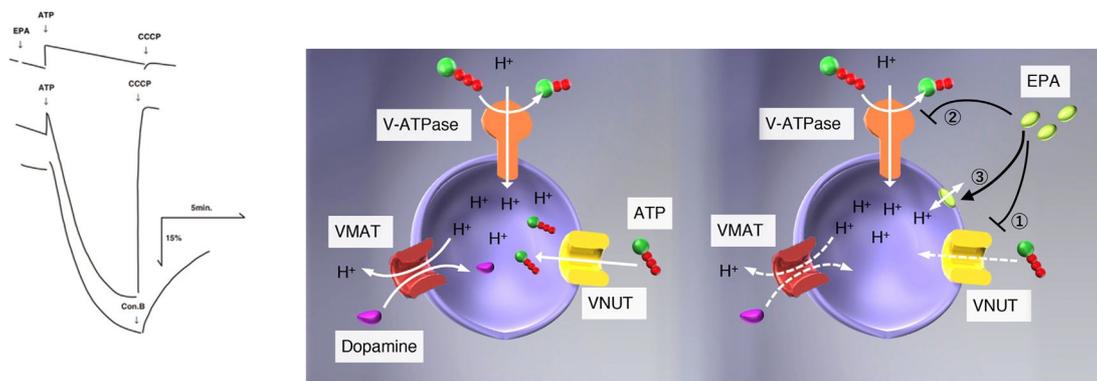


図 4 EPA による脱共役作用と ATP 分泌

(4). 新規 VNUT 阻害薬を特許出願し、脂肪肝炎、肝線維化の阻害作用を実証

VNUT の新しい阻害薬である薬剤 A を発見した。この薬剤 A はヒトケラチノサイト培養細胞からの ATP 分泌をクロドロン酸と同等程度まで抑制した。チオアセタミドにより肝臓の線維化を誘発したマウスにおいて、誘発開始後 1 週間後より、薬剤 A を経口投与したところ、SMA 染色陽性の、肝星細胞の増殖が抑制され、肝線維化を改善することがわかった。これらの内容をまとめ、2023 年度特許を出願した。(特願 2023-074235)

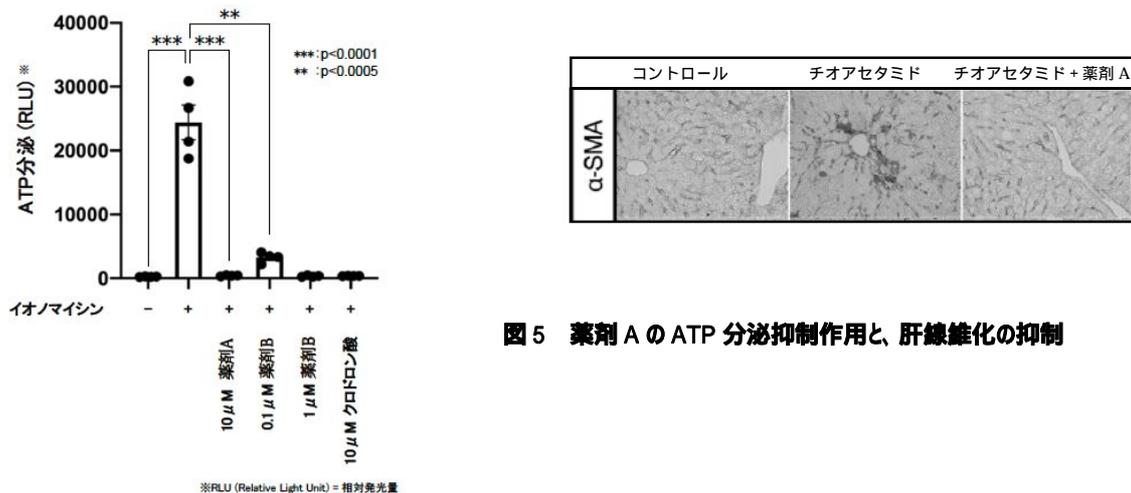


図 5 薬剤 A の ATP 分泌抑制作用と、肝線維化の抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kurinami Noboru, Ashida Kenji, Sugiyama Seigo, Morito Yoko, Hasuzawa Nao, Yoshida Akira, Morita Ayami, Hieshima Kunio, Miyamoto Fumio, Kajiwara Keizo, Jinnouchi Katsunori, Jinnouchi Tomio, Jinnouchi Hideaki, Nomura Masatoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Reduced Number of Remaining or Healthy Teeth in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Cross-sectional Study Assessed by Dentists or Dental Hygienists in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 987 ~ 993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9773-22	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 -

1. 著者名 Moriyama Yoshinori, Hasuzawa Nao, Nomura Masatoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Is the vesicular nucleotide transporter a molecular target of eicosapentaenoic acid?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 01-09
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.1080189	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 -

1. 著者名 Moriyama Yoshinori, Hasuzawa Nao, Nomura Masatoshi	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Maria Teresa Miras Portugal: a pioneer for vesicular nucleotide storage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Purinergic Signalling	6. 最初と最後の頁 Epub ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11302-022-09912-z	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 Yoshinobu Satoko, Hasuzawa Nao, Nagayama Ayako, Iwata Shimpei, Yasuda Junichi, Tokubuchi Rie, Kabashima Masaharu, Gobaru Mizuki, Hara Kento, Murotani Kenta, Moriyama Yoshinori, Ashida Kenji, Nomura Masatoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Effects of Elobixibat, an Inhibitor of Ileal Bile Acid Transporter, on Glucose and Lipid Metabolism: A Single-arm Pilot Study in Patients with T2DM	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1418 ~ 1426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinthera.2022.08.009	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 Ohtaki Sohichiroh, Ashida Kenji, Matsuo Yuko, Moritaka Kanoko, Iwata Shimpei, Nagayama Ayako, Kawaguchi Aya, Koga Hiroshi, Yoshinobu Satoko, Hasuzawa Nao, Motomura Seiichi, Akiba Jun, Nakama Takekuni, Nomura Masatoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Eruptive xanthomas as a marker for metabolic disorders: A specific form of xanthoma that reflects hypertriglyceridemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 5671-5676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.5671	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 -

1. 著者名 Inoguchi Toyoshi, Okui Tasuku, Nojiri Chinatsu, Eto Erina, Hasuzawa Nao, Inoguchi Yukihiro, Ochi Kentaro, Takashi Yuichi, Hiyama Fujiyo, Nishida Daisuke, Umeda Fumio, Yamauchi Teruaki, Kawanami Daiji, Kobayashi Kunihisa, Nomura Masatoshi, Nakashima Naoki	4. 巻 12
2. 論文標題 A simplified prediction model for end-stage kidney disease in patients with diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12482-12499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16451-5	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 -

1. 著者名 Hasuzawa Nao, Moriyama Sawako, Wang Lixiang, Nagayama Ayako, Ashida Kenji, Moriyama Yoshinori, Nomura Masatoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Quinacrine is not a vital fluorescent probe for vesicular ATP storage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Purinergic Signalling	6. 最初と最後の頁 725 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11302-021-09820-8	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 Hasuzawa Nao, Tatsushima Keita, Tokubuchi Rie, Kabashima Masaharu, Nomura Masatoshi	4. 巻 141
2. 論文標題 VNUT Is a Therapeutic Target for Type 2 Diabetes and NASH	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 517 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00204-4	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 -

1. 著者名 Wang Lixiang, Li Xin, Hanada Yuki, Hasuzawa Nao, Moriyama Yoshinori, Nomura Masatoshi, Yamamoto Ken	4. 巻 4
2. 論文標題 Dynamin-related protein 1 deficiency accelerates lipopolysaccharide-induced acute liver injury and inflammation in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02413-6	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 -

1. 著者名 野村 政壽, 蓮澤 奈央	4. 巻 13
2. 論文標題 【経口血糖降下薬の温故知新】イメグリミン ミトコンドリア機能を改善する経口糖尿病薬	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊糖尿	6. 最初と最後の頁 60~67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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4件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 蓮澤奈央
2. 発表標題 VNUT依存性プリンシグナルと生活習慣病
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会九州地方会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蓮澤奈央
2. 発表標題 VNUTを介した細胞外ATP分泌と動脈硬化
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蓮澤 奈央、王 麗香、大塚 由絵、坂本 萌子、喜多村 美幸、野村 政壽
2. 発表標題 ミトコンドリアと疾患・老化 糖尿病の病態形成におけるミトコンドリアダイナミクスの役割
3. 学会等名 第94回 日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 椛島 正治、蓮澤 奈央、王 麗香、森山芳則、野村 政壽
2. 発表標題 肝星細胞のVNUT依存性ATP分泌は 肝線維化を促進する
3. 学会等名 第97回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アデノシン三リン酸分泌抑制剤、肝線維症治療剤、非アルコール性脂肪性肝炎治療剤等の製造のための化合物の使用	発明者 野村政壽、森山芳則、蓮澤奈央、森山佐和子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-074235	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	野村 政壽 (Nomura Masatoshi)		
研究協力者	森山 芳則 (Moriyama Yoshinori)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	森山 佐和子 (Moriyama Sarako)		
研究協力者	王 麗香 (Wang Lixiang)		

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			
アイルランド	Royal College of Surgeons in Ireland			
米国	Thomas Jefferson University			