

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17687

研究課題名（和文）フルクトースによる代謝障害の分子機構の解明：肝臓オルガノイドを用いた新たな試み

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms of fructose-induced metabolic disorders using liver organoids

研究代表者

山崎 未来（Yamazaki, Mirai）

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：10778096

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）：本研究は生体内の肝臓に極めて類似しているとされる肝臓オルガノイドを用いて、フルクトース摂取によって生じる代謝障害の分子機構を明らかにすることを目的とする。肝組織をコラゲナーゼ、ディスペーゼ等を用いて消化処理し、得られた細胞をマトリゲルに包埋して培養した。作出した肝臓オルガノイドにおいて、肝臓を構成する肝細胞やクッパー細胞等の遺伝子マーカーの発現が確認された。フルクトースによる肝臓オルガノイドへの影響を詳細に解析するために、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、代謝制御や酸化ストレスに関わる遺伝子など、34遺伝子の変動が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フルクトースは天然甘味料のひとつであり、清涼飲料水や加工食品などに広く使用されている。過剰なフルクトース摂取は代謝疾患の発症要因になることが指摘されている。しかし、その分子機構については不明な点が多く、予防や治療の観点から解明が強く求められている。本研究ではオルガノイドと呼ばれる新たな培養技術を用いた。従来の細胞培養系と比較して、ミニ臓器と称されるオルガノイドは生体内での現象を詳細に反映するとされている。オルガノイドを用いた新たなアプローチにより、フルクトースによる代謝障害の分子機構について、大きく理解が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanisms of fructose-induced metabolic disturbances using liver organoids. Liver tissue was digested using collagenase and dispase, then embedded in Matrigel and cultured. The established liver organoids express cell-specific genetic markers, representing hepatocytes, Kupffer cells, and other cells constituting liver tissue. To analyze the effects of fructose exposure on liver organoids, gene expression analysis was performed using microarrays. The results showed changes in the expression of 34 genes, including those involved in metabolic regulation and oxidative stress.

研究分野：健康科学、分子栄養学

キーワード：フルクトース オルガノイド 代謝疾患 肝臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フルクトースは天然甘味料のひとつであり、清涼飲料水や加工食品などに広く使用されている。近年、過剰なフルクトース摂取は非アルコール性脂肪性肝疾患や糖尿病といった代謝疾患の発症要因になることが指摘されている。しかし、その詳細な分子機構については不明な点が多く、その解明が強く求められている。

フルクトースの悪影響の分子機構を明らかにするために、動物モデルを用いた基礎研究が行われてきた。しかし、動物実験では解決できない多くの課題が残されている。摂取したフルクトースは消化・吸収を経て臓器に行き届くため、どの程度のフルクトース量が臓器に悪影響を及ぼすかを明らかにすることは難しい。また、フルクトース摂取は高カロリー摂取を伴うと同時に、ホルモン恒常性や腸内細菌叢などにも影響を及ぼすなど、二次的要因による影響の排除が困難である。

これらの課題を考慮するため、培養細胞株等が研究に用いられてきた。しかし、このような単一細胞型かつ単層培養の細胞培養系は、多種多様な細胞で構成される「組織」とは性質が大きくことなる。したがって、フルクトースの作用機序に関する理解を深めるためには、より生体内の現象を反映した新たな *in vitro* モデルを用いた解析が不可欠である。

近年、オルガノイドと呼ばれる新たな培養技術が開発された。ミニ臓器と称されるオルガノイドは従来の 2 次元細胞培養やスフェロイドと異なり、臓器特異的な複数の細胞から構成される三次元構造体であり、生体内同様に特定の生理機能を有している。オルガノイド培養法の登場により、これまで不可能であった臓器そのものを *in vitro* で扱うことが可能となった。オルガノイドを用いることで、動物実験や従来の *in vitro* 実験系の限界を補いつつ、フルクトースが臓器に与える影響についてより詳細に解析を進めることができる。

2. 研究の目的

本研究では生体内の肝臓に極めて類似している肝臓オルガノイドを用いて、フルクトースによって生じる代謝障害の分子機構を明らかにすることを目的とする。肝臓オルガノイドの培養液中にフルクトースを加えることで、生体内での過剰なフルクトース環境を模擬し、臓器に及ぼす影響について解析を進める。

3. 研究の方法

(1) 肝臓オルガノイドの作成

本研究ではラット肝臓を用いて、オルガノイド培養系を確立した。採取した肝臓をコラゲナーゼ、ディスパーゼ等を用いて消化処理した。セルストレイナーにて目的サイズの細胞を採取し、マトリゲルにて培養した。Wnt3a(Wnt family member 3A)、Rspo1(R-spondin-1)、HGF(Hepatic cyte growth factor)、FGF(Fibroblast growth factor)等を含む培養液にて培養した。得られた嚢胞状の形態の細胞は、肝細胞やクッパー細胞等の遺伝子マーカーの発現量を測定することで、肝臓オルガノイドの樹立を確認した。

(2) フルクトース存在下での肝臓オルガノイド培養および解析

樹立した肝臓オルガノイドを 20 mM フルクトース含有培地にて 5 日間培養した。対照には 20 mM グルコース含有培地を用いた。5 日間培養後、肝臓オルガノイドの直径を計測した。また、マイクロアレイによる遺伝子発現解析をおこなった。

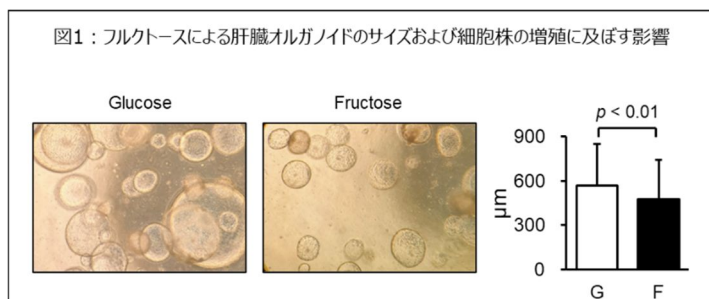
4. 研究成果

(1) 肝臓オルガノイドの作成

肝臓組織をコラゲナーゼ、ディスパーゼ等を用いて細胞を分散した。消化処理することによって得られた細胞をマトリゲルにて培養したところ、嚢胞状の形態の細胞が確認された。この嚢胞状の細胞を回収して遺伝子発現解析を行ったところ、肝幹細胞/前駆細胞のマーカーである *Sox9* や *Lgr5*、肝細胞マーカーである *Alb* や *Hnf4a*、星細胞マーカーである *Vim* や *Cygb*、胆管マーカーである *Trop2* や *Krt19* 等の肝臓を構成する各種細胞の遺伝子マーカーの発現が確認された。さらに長期的培養、継代、凍結保存の検討を進めた。本法で作成した肝臓オルガノイドでは 10 日以上長期培養を可能とした。肝臓オルガノイドを破壊し、マトリゲルに再包埋したところ、肝臓オルガノイドの再形成が認められた。このことは継代操作が可能であることを示している。さらに作成した肝臓オルガノイドを凍結保存後に再培養した場合においても肝臓オルガノイドの再形成が認められた。

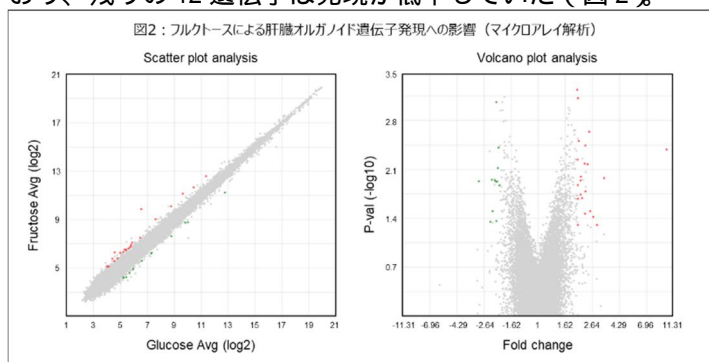
(2) フルクトースが肝臓オルガノイドのサイズに及ぼす影響

樹立した肝臓オルガノイドを 20 mM フルクトース存在下で 5 日間培養した。5 日後、肝臓オルガノイドの直径を測定したところ、20 mM グルコース存在下で培養した肝臓オルガノイド (G) と比較して、フルクトース存在下で培養した肝臓オルガノイド (F) において、オルガノイドサイズの低下が確認された (図 1)。



(3) フルクトース存在下で培養した肝臓オルガノイドのマイクロアレイ解析

フルクトースによる影響を詳細に解析するために、マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析を行った。20 mM フルクトース培地で培養した肝臓オルガノイドと 20 mM グルコース培地で培養した肝臓オルガノイドを比較すると、発現量が 2 倍以上異なっていた遺伝子が 34 個確認された。そのうち、22 遺伝子は 20 mM フルクトース培地で培養した肝臓オルガノイドにて発現が上昇しており、残りの 12 遺伝子は発現が低下していた (図 2)。



本研究では肝臓オルガノイドをフルクトース存在下で培養し、その表現型および遺伝子発現を解析することで、フルクトースによる悪影響の分子メカニズムについて解析を試みた。その結果、フルクトースによる肝臓オルガノイドサイズの低下が認められた。このことは、フルクトースによる細胞増殖能の低下やアポトーシスの誘因等を示唆する。マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析の結果、代謝制御や酸化ストレスに関わる遺伝子など、34 遺伝子の変動が認められた。現在、エピジェネティクス視点より解析を進めており、フルクトースによる悪影響の分子機構について、より詳細に明らかにすることを試みている。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 YAMAZAKI Mirai, YAMADA Hiroya, MUNETSUNA Eiji, ANDO Yoshitaka, KAGEYAMA Itsuki, SADAMOTO Nao, NOUCHI Yuki, TESHIGAWARA Atsushi, MIZUNO Genki, ISHIKAWA Hiroaki, SUZUKI Koji, HASHIMOTO Shuji, OHASHI Koji	4. 巻 69
2. 論文標題 Interaction between Prenatal and Postnatal Exposure to High-Fructose Corn Syrup Increases Gene Expression of $\text{TNF-}\alpha$ in Hippocampus of Offspring	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 237 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.69.237	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市川勇斗、山田宏哉、宗網栄二、安藤嘉崇、景山斎、野内佑起、池谷美幸、波田薫平、山崎未来、水野元貴、石川浩章、鈴木康司、大橋鉦二
2. 発表標題 フルクトース過剰摂取のモデルラットの肝オルガノイド作成と評価
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術集会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 榊原知秀、山田宏哉、宗網栄二、山崎未来、安藤嘉崇、水野元貴、景山斎、野内佑起、若杉拓哉、市川勇斗、池谷美幸、石川浩章、鈴木康司、大橋鉦二
2. 発表標題 高脂肪食負荷ラットにおける肝オルガノイドの作製
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 山崎未来、山田宏哉、宗網栄二、市川勇斗、安藤嘉崇、波田薫平、江頭和樹、野内佑起、景山斎、若杉拓哉、水野元貴、石川浩章、鈴木康司、大橋鉦二、大神信孝
2. 発表標題 フルクトース過剰摂取モデルラットの肝オルガノイド作成および遺伝子発現解析
3. 学会等名 第94回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2024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
---------	---------