

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K12742

研究課題名(和文)糖分の過剰摂取が小胞体異常を惹起し非アルコール性脂肪肝炎を引き起こす

研究課題名(英文) Excessive ingestion of sugar causes the abnormality of endoplasmic reticulum, resulting in providing for NASH

研究代表者

上田 忠司 (UEDA, Tadashi)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：80151794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：グリセルアルデヒド(GA)由来の終末糖化産物(AGEs)は毒性も強く(TAGE)、その中間体であるGA(0-4 mM)を24時間初代培養心筋細胞や肝細胞に添加すると、それらの小胞体がまず障害され、次いでミトコンドリアが障害を受け、両細胞は変性壊死を起こすことが明らかになった。肝細胞は脂肪滴を多く含んだNASH様の細胞が出現した。小胞体ストレスを受けた両細胞はオートファジーが抑制された。NASHモデルマウスの肝臓で抗TAGE抗体陽性細胞が多く見られた。

このようにTAGE蓄積によりNASH様の細胞が出現することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： It is suggested that glyceraldehyde-derived advanced glycation products (GA-AGEs) play a key role in various diseases. We examined the effect of GA, which is a precursor of GA-AGEs, at concentrations between 0-4 mM during a period of 24 h in the primary cultured cardiomyocytes and hepatocytes. Both cultured cells were affected severely by GA, and endoplasmic reticulum (ER) was the target organelle, and thereafter mitochondria(Mt) were disrupted. Cultured hepatocytes appeared with the characteristics similar to NASH, which contained numerous lipid droplets and vacuoles. The cells which were affected by ER stress suppressed autophagy. Numerous hepatocytes in NASH model mice appeared positive against anti-TAGE antibody. Moreover, they showed ballooning cells, and ER and Mt were collapsed.

These results suggested that accumulated TAGE may cause NASH and ER plays a key role of induction into NASH.

研究分野：解剖学

 キーワード：終末糖化タンパク グリセルアルデヒド 初代培養心筋細胞 初代培養肝細胞 小胞体ストレス NASH  
 オートファジー 電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

近年、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性脂肪肝炎と同様な症状を示す非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が肝硬変、肝がん、また心不全などの合併症を惹起するため問題になっている。NASH の原因は依然不明であり、NASH の成因に由来から言われているミトコンドリアによる酸化ストレス説では説明がつかないことも多い。飲酒歴がないことより、日常的な食習慣により NASH の原因が考えられるという観点から終末糖化産物 (Advanced glycation products, AGEs) に着目して、多くの研究者がその関与を解明しようと取り組んでいる。しかし、明確な結果は得られていない。その原因の一つに終末糖化産物には多くの種類があり、最終的な代謝産物が体内にとり有害かどうか問われるところである。申請者は糖分などの過剰摂取により形成される毒性の強い終末糖化産物 (toxic AGEs, TAGE) に着目して、培養細胞を用いて予備実験を行っている。その結果、TAGE 形成に伴い、NASH と類似の病理学的所見を示す結果を得た。得られた結果より、小胞体ストレスに焦点をあて、現代の食習慣のゆがみからくる TAGE の過剰形成による小胞体の解毒機能の破綻を形態学的に解明し、NASH 発症の一因が小胞体であることを証明したいと考えた。

## 2. 研究の目的

NASH 患者の多くは肥満、糖尿病をかかえたいわゆるメタボリックシンドローム患者が多いことから食生活に関係した終末糖化産物に多くの研究者が着目してきた。しかしながらその成因が未だ特定されていないのが実情である。その理由として小児でも NASH 患者がいるなど複雑な成因が絡み合って特定されにくいとされている。そこで私達は何種類もある終末糖化産物の中で毒性の強いとされている glyceraldehyde (GA) を介した AGEs (GA-AGEs) に着目して NASH 発症の関与を証明することを目的とした。その目的達成のために次の項目について目標を設定し、解析を進めた。

(1) 糖代謝中間体である GA が細胞内で TAGE を形成して細胞障害を引き起こし、その標的であるタンパク質の品質管理に関与している小胞体に関して解析する。加えてこの胞体の機能異常が NASH の成因になっていることを明らかにすることを目的とする。

(2) in vitro の実験 GA 添加により障

害の発現が外観的に観察されやすい (拍動の減少) 培養心筋細胞を指標にしながら培養心筋、肝細胞で実験を遂行する。特に TAGE 形成と小胞体の空胞化に関連が見られることから小胞体構造に焦点をあて、細胞内の TAGE 形成と小胞体の変化を電子顕微鏡で明らかにする。小胞体が関与するとされるオートファジーの出現の解明を行う。

(3) in vivo の実験 NASH 様の病変を示すモデル動物を用い、NASH の発症・進展には TAGE と小胞体が必要不可欠であることを TAGE 抗体や電子顕微鏡で解明する。

## 3. 研究の方法

### **(1) 初代培養心筋細胞 / 肝細胞における TAGE 形成の検討 (上田、竹内、高田)**

TAGE 形成による培養心筋細胞/肝細胞の生存率を細胞毒性測定用試薬であるテトラゾリウム塩の一種である WST-8 試薬を用いて側定し、GA (0, 1, 2, 4 mM) 添加による TAGE 形成の毒性を評価した。

培養心筋細胞 / 肝に通常濃度 / 高濃度 (5 ~ 50 mM 程度) のブドウ糖や果糖 (対照として GA) を添加し、0 ~ 10 % 牛準胎児血清を含む DMEM 培地にて 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

TAGE 特異抗体を用いた免疫組織染色法や研究協力者の高田の協力のもと Western blott (WB) 法、Slot blot 法により、細胞内での TAGE 形成、およびその量を検出した。対照として AGEs 形成阻害剤であるアミノグアニジンを用い、また、TAGE の中和抗体を用いた対照実験を行った。

### **(2) TAGE 形成に伴うオートファジー出現の検討 (上田)**

心筋および肝細胞を経時的に培養し、現在もっとも特異性のあるオートファジー検出試薬である GFP-LC3 を用いて、生きたままの培養細胞をタイムラプス顕微鏡でリアルタイムに TAGE 形成によるオートファジーの出現を観察した。オートファゴソーム形成過程全般の分子マーカーである LC3 抗体を用いてオートファジーの検出を行った。

パフィロマイシンを用いてオートファジーが促進されているか抑制されているか検証した。また、オートファジーの阻害には 3-methyladenine (3-MA) を培養液中に添加し、その阻害効果からオートファジーの関与を明らかにしようとした。

### **(3) TAGE 形成に伴うアポトーシスおよびネクローシスの解析 (上田)**

小胞体ストレスの破綻はアポトーシスを誘導するとされている。そこで糖類添加による TAGE 形成がもたらすアポトーシスへの影響を TUNEL 染色で実施し、アポトーシ

ス像を同定した。

#### **(4) TAGE 形成に伴う細胞内の Ca 濃度の上昇の解析 (上田)**

GA を添加した培養心筋細胞は濃度依存的に心拍数が減少する。GA 4 mM 添加では心拍が停止した。心拍と関係の深い細胞内  $Ca^{2+}$  イオンのオーバーロードが考えられた。そこで心筋細胞に GA を添加して Fura 2/AM, Fluo 4/AM を用いて細胞内の  $Ca^{2+}$  イオン濃度を解析した。また、AGEs 形成阻害剤であるアミノグアニジンを追加した場合、心拍数は低いものの拍動をしている心筋細胞が存在した。そこで AGEs の形成阻害剤であるアミノグアニジンの  $Ca^{2+}$  に関する生理学的役割も検討した。

#### **(5) NASH モデル動物による TAGE 形成/蓄積の NASH への関与 (上田、竹内)**

NASH モデル動物 (C57BL/6J-NASH) を購入して、肝臓のパラフィン切片や電子顕微鏡切片を作製し、NASH 病態の変化を超微形態学的に検討し、TAGE 形成と小胞体構造の関連を詳細に検討した。

### 4. 研究成果

#### **(1) 培養心筋細胞 / 肝細胞における TAGE 形成の検討**

培養心筋細胞および肝細胞における細胞生存率は GA の濃度依存的に減少し、経時的にも大きく減少することが明らかになった。AGEs 形成阻害剤であるアミノグアニジンを前処理しておくことにより心筋細胞の生存率は GA 4 mM 2 4 時間で生存率がほぼ 0% であったものが 50% 以上に回復した。しかしながら肝細胞の場合、アミノグアニジンを添加することにより細胞障害を惹起し、生存率は逆に低下し、回復は得られなかった。このことは当初予想していた結果とは大きく異なり、アミノグアニジンは細胞種により障害を与えることがわかった。アミノグアニジンは毒性が強いため臨床適用がなされていない理由がここにあるように思われる。

培養心筋細胞及び肝細胞に 30 mM のブドウ糖、果糖を添加して培養すると抗 TAGE 抗体陽性細胞が多く出現し、細胞も変性していた。ブドウ糖添加より果糖の方が陽性細胞が多く出現し、細胞障害も大きかった。濃度を 50 mM にあげた場合、浸透圧のせいで細胞が壊れた。

GA 添加による培養心筋細胞、肝細胞を WB で解析すると 50 ~ 60 kDa に特異的バンドの出現が認められ、濃度依存的にバンドは濃くなっていた。また、経時的にも同様の結果が得られた。TAGE-BSA による中和抗体を用いて中和させた場合、強く出現していた GA 4 mM のバンドは消失していた。さらにアミノグアニジンでも同様の結果が得

られた。Slot blott 法で細胞内の TAGE 量を測定すると WB 同様濃度依存的、経時的にその量は有意に増加していた。

#### **(2) TAGE 形成に伴うオートファジー出現の検討**

GFP-LC3 による培養細胞のオートファジーの解析を行った結果、GA の濃度が高くなるにつれて LC3 の dot が減少していくことが明らかになった。また、経時的にも dot の数は減少した。GFP のみの空ベクターで培養した場合、どの細胞においても dot は全く見られなかった。

タイムラプス顕微鏡を用いて GA 添加による培養細胞の変化を観察した結果、経時的に細胞内に空胞が出現し、やがて風船が破裂するように消失していく様子が観察された。この結果は電子顕微鏡で観察した場合、細胞内に多くの空胞が観察されその細胞の多くは変性した像と対応していた。

LC3 抗体を用いて WB で解析した結果、GA 添加後、1 2 時間以内に濃度依存的及び経時的にバンドは減少することが明らかになった。

オートファジーが促進されているか抑制されているかの見極めは極めて難しく、高グルコース存在下でオートファジーは抑制される説<sup>1)</sup>と AGEs でオートファジーは促進されるという説<sup>2)</sup>に二分され混沌としている。パフィロマイシンはオートファジーの識別に有効な薬剤で、パフィロマイシン及び GA 添加で培養した心筋細胞では WB のバンドが軽微な増加しか見られず、オートファジーはむしろ抑制されていることが分かった。一方オートファジーの阻害剤である 3-MA 添加の場合、3-MA の溶解性に難があり、明確な結論が得られなかった。

#### **(3) TAGE 形成に伴うアポトーシスおよびネクローシスの解析**

GA 添加による培養心筋細胞、肝細胞の経時変化を電子顕微鏡で観察すると両細胞とも 6 時間以内に最初に障害を受けるのが小胞体であることが分かった。小胞体が徐々に膨化し、空胞が形成された。やがてその空胞は大きくなり、空胞は互いが融合し、さらに大きな空胞を形成した。小胞体が膨化し始め障害を受けた後、ミトコンドリアにも変化が現れ、添加後 1 2 時間でミトコンドリアのマトリクスの電子密度の低下やクリステの崩壊が見られた。2 4 時間でジャイアントミトコンドリアも出現した。このように AGEs による細胞障害でどの細胞内小器官が障害を受けるのかを見出したのは初めてであり、AGEs の障害機構を考察する上で重要と思われる。

TUNEL 染色で培養心筋細胞、肝細胞を染めてみると経時的に陽性細胞の数は増加したが、その多くは変性壊死した細胞が多く、アポトーシス像よりネクローシスの細胞の方が多かった。また、ブドウ糖、果糖添加の培養肝細胞の形態学的変化はやはり小胞体、ミ

トコンドリアに変化が現れ、TUNEL 染色で多くの細胞が染まった。アポトーシスというよりネクロシスの細胞が多かった。

#### **(4) TAGE 形成に伴う細胞内の Ca 濃度の上昇の解析**

Ca 蛍光試薬 Fura 2/AM を利用して細胞内の Ca<sup>2+</sup>の動向を観察した。心筋細胞に GA を添加した場合、細胞内の Ca<sup>2+</sup>の上昇を示す結果が得られた。PBS やアミノグアニジンを添加した場合、Ca<sup>2+</sup>の上昇を示す曲線は得られなかった。しかしながら Fura 2/AM を添加して1時間を経ても Ca<sup>2+</sup>の上昇を示す曲線が得られたが、細胞内の自家蛍光も疑われた。そこで Fluo 4/AM を用いてプレートリダで細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度を測定したが対照と比べ増加している場合もあれば低下している場合もあり、明確な結論は得られなかった。PBS による細胞の洗浄ではがれやすいことが原因と考えられ、細胞がはがれにくい洗浄液に置き換えても結果は不安定であった。

#### **(5) NASH モデル動物による TAGE 形成/蓄積の NASH への関与**

NASH モデル動物の一種である C57BL/6J マウスを用いて、肝臓、心臓、腎臓を摘出してパラフィン切片を作成し、抗 TAGE 抗体で免疫染色した結果、肝臓の小葉間の大きな血管周囲を取り囲むように陽性細胞が観察された。しかしながら中心静脈の周囲には陽性細胞は観察されなかった。腎臓、心臓にも陽性細胞は観察されず、対照群の肝臓にも陽性細胞は見られなかった。H.E 染色標本から多くの脂肪滴とバルーン状の細胞が観察され、小葉間に結合組織が発展していた。肝細胞は小胞体やミトコンドリアが障害を受け、変性壊死を起こしている細胞が多かった。隣接した変性した細胞どうしが融合している像が多く見られた。培養肝細胞を用いて培地に GA を添加した時、肝細胞内には多くの脂肪滴が存在し、小胞体が膨化していたが、NASH モデル動物の肝臓の電顕像と類似した像が見られた。

以上の結果から培養細胞における TAGE 形成、その蓄積が細胞にとってきわめて有害であることが立証された。そして TAGE 形成に関連して小胞体が障害を受け、オートファジーの抑制が起こり細胞障害の加速が示唆された。TAGE により最初に障害を受けるのが小胞体であることは国内外通じ、初めての結果である。小胞体ストレスの破綻が細胞死へとつながると思われる。NASH 様のモデル動物の肝細胞に抗 TAGE 抗体で染色される細胞が大きな血管周囲に存在したことは細胞障害を考える上で、意義深いことと思われる。糖分の過剰摂取は TAGE が形成され小胞体を障害し、NASH 成因の誘導に關与するものと思われる。

< 引用文献 >

1) Kobayashi, S. et al. Suppression of

autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy*, 8, 2012, 577-592

2) Hou, X. et al. Advanced glycation endproducts trigger autophagy in cardiomyocyte via RAGE/P13K/AKT/mTOR pathway. *Cardiac Diabetol.*, 13, 2014, 78-86

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

上田忠司、初代培養心筋、肝細胞における終末糖化産物の影響、第122回 日本解剖学会、2017年3月28-30日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県、長崎市)

[その他]

ホームページ等

糖化制御研究分野 HP

<http://mri-ages.kanazawa-med.labos.ac/one/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上田 忠司 (UEDA, Tadashi)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：80151794

##### (4) 研究協力者

竹内 正義 (TAKEUCHI, Masayoshi)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：20154980

高田 尊信 (TAKATA, Takanobu)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：20515308