

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09402

研究課題名(和文) 肝細胞脂肪毒性における内臓・皮下脂肪組織由来アディポソームの役割とその制御機構

研究課題名(英文) Mechanism of visceral/subcutaneous adipose tissue derived adiposome-induced hepatocyte lipotoxicity

研究代表者

西島 亜紀(Nishijima, Aki)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40566105

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)：我々は、内臓脂肪組織(VAT)が特異的に肝細胞にアポトーシスと脂肪滴蓄積、すなわち脂肪毒性を誘導することを報告しており、仲介因子として、脂肪細胞が分泌する細胞外分泌小胞(EVs)に注目した。ラットのVAT、皮下脂肪組織(SAT)を採取し、コラーゲンゲルに脂肪組織片を包埋して3次元培養を行い、その培養上清からEVsを精製した。VAT由来EVsはSAT由来EVsの約6倍のタンパク量を示した。精製したEVsをHepG2肝細胞の培養液に添加すると、VAT由来がSAT由来よりも多く肝細胞内に取り込まれた。脂肪毒性に関しては、明らかな肝細胞の形態変化は認められず、アポトーシスも誘導されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織から分泌されるEVsについて、VATとSATに相違があることを初めて明らかにした。VATとSATは起源が異なると考えられており、これを裏付ける研究成果であり、さらに、脂肪組織の部位による役割が異なることを示唆するものとする。また、EVsにはmicroRNAが含まれており、脂肪組織は全身を循環するmicroRNAの最大の供給源との報告がある。癌でのmicroRNA研究は盛んであるが、代謝性疾患ではまだ不明な点が多い。本研究を進展させることで、種々の代謝性疾患等における病態制御に脂肪組織が果たす役割が解明される一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue (AT) is a major site of energy storage as well as an endocrine organ to regulate the metabolism. AT-based obesity is suggested to be closely associated with liver diseases, including nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). We have established a method for analyzing the direct interaction between AT and hepatocytes, and reported that visceral adipose tissue (VAT) promotes lipid accumulation and apoptosis (lipotoxicity) in hepatocyte while subcutaneous adipose tissue (SAT) does not effect. VAT inducing phenomena are mediated by soluble factors. Recently, extracellular vesicles (EVs) including exosome receive attention as new players in metabolic organ cross-talk. Thus we hypothesized that EVs mediate the VAT-induced lipotoxicity in hepatocytes. Here we investigated the difference between EVs secreted by VAT and SAT. We revealed that VAT produces approximately 6 times more EVs than SAT. EVs purified from neither SAT nor VAT affected hepatocyte morphology.

研究分野：消化器内科学

キーワード：脂肪毒性 細胞外小胞 エクソソーム 内臓脂肪組織 皮下脂肪組織 アディポソーム

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は、エネルギー貯蔵・代謝の中心臓器であり、アディポカインを産生する内分泌臓器である。一般に脂肪組織は、皮下、内臓、骨髄脂肪組織に分類される。メタボリックシンドロームの標的組織は内臓脂肪組織(腸間膜,大網)であり、皮下脂肪組織との生理活性に相違があることが複数報告されているが、その詳細はまだ十分に解明されていない。

我々は、脂肪組織のコラーゲンゲル器官培養系を確立し、初めて脂肪組織を長期培養することを可能とし、脂肪組織が、脂肪酸、レプチンやアディポネクチンなどのアディポカインを活発に産生することを見出した(Toda et al. *Endocrinology* 149:4794-98, 2008)。この培養系を応用し、尿管上皮や心筋細胞、肝細胞-脂肪組織解析モデルを考案し、脂肪組織が尿管上皮の機能分化、グリコーゲン産生を促進し、細胞死を抑制すること(Toda et al. *Kidney Int* 78:60-8, 2010)や、心筋細胞に脂肪滴蓄積・細胞死促進、分化抑制(脂肪毒性)を誘導することを見出した(Toda et al. *Endocrinology* 152:1599-605, 2011)。さらに、内臓脂肪組織と皮下脂肪組織に区別し、肝細胞に与える直接的な影響を解析したところ、内臓脂肪組織が特異的に肝細胞に脂肪毒性を誘導すること、この現象は液性因子を介していることを明らかにした(Nishijima-Matsunobu, Toda et al. *Cell Tissue Res* 352:611-21, 2013)(Figure 1)。この内臓脂肪特異的脂肪毒性は、非アルコール性脂肪性肝炎・肝疾患の病態解明の重要な因子であると考えられる。現在その仲介因子の同定を継続解析中であり、候補としてエクソソーム(アディポソーム)の可能性を考えた。

近年、エクソソームを含む細胞外小胞が、細胞間の情報伝達ツールとして注目を浴びており、癌だけでなく、変性疾患や感染症、代謝疾患など幅広い疾患でも病態に深く関連していることがわかってきた。脂肪細胞もエクソソームを産生していることが解明され、アディポソームと名付けられた(Aoki et al. *Endocrinology* 148:3850-3862, 2007)。アディポソームにはアディポネクチンやMFG-E8が多く含まれていること等が解明されているが、その詳細は不明な点が多い。

以上の背景に基づき、内臓脂肪組織と皮下脂肪組織が産生するアディポソームの相違をもとに、肝細胞の脂肪毒性におけるアディポソームが果たす役割およびその制御機構を解明する本研究に着想した。

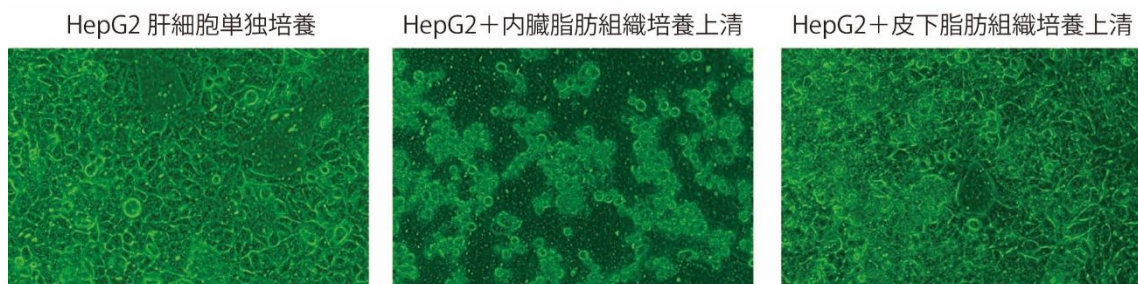


Figure 1

2. 研究の目的

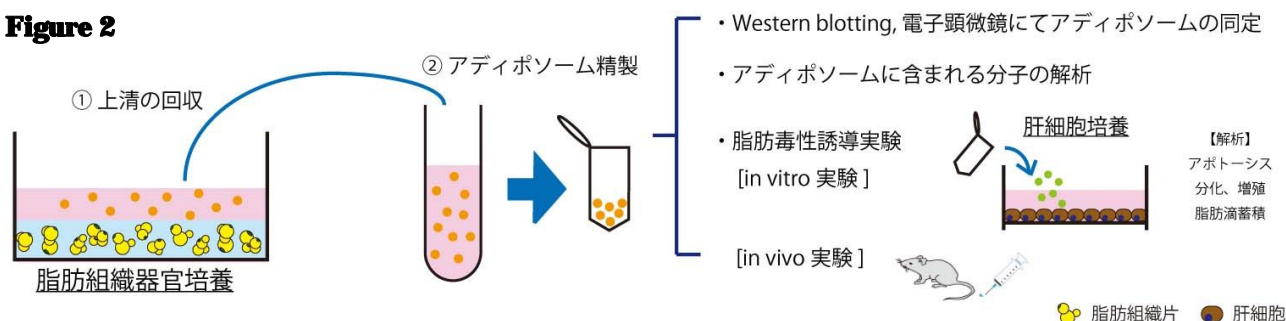
本研究では、脂肪組織の初代培養を用いて、アディポソームを採取し、以下の点を明らかにする。

- 1) 内臓/皮下脂肪組織の初代器官培養により得られた培養上清から回収、精製したアディポソームに含まれる、アディポカインをはじめとする、タンパク質、脂質、microRNAの相違を解明する。
- 2) 内臓/皮下脂肪組織由来アディポソームが、肝細胞の脂肪毒性に与える影響とその役割、およびその制御機構を解析する。

3. 研究の方法

- 1) 材料: 脂肪組織: 6週齢ラットの皮下、内臓脂肪組織を細切した脂肪組織片を用いる。
肝細胞: ヒト HepG2 肝細胞株を用いる。
- 2) 培養システム: 脂肪組織 3次元器官培養モデル (Figure 2) を用いる。0.5-1 mm 径に細切した脂肪組織片 (1.5~2 ml) を 10 ml の I 型コラーゲンゲル内に包埋し、初代培養する。培地には、予めエクソソームを除去した FBS (J Biol Chem 278:10963-72, 2003) を 10% 添加したものをを用いる。培養 48 時間後に培養上清を回収し、アディポソームを精製する。
- 3) アディポソームの精製: 内臓および皮下脂肪組織の培養上清を回収後、超遠心法 (pelleting 法: 死細胞等のデブリスを除去した培養上清を 100,000 g で 2 時間超遠心後、ペレットを回収し、PBS で洗浄したのち再度超遠心する) 市販のエクソソーム回収用試薬 (ExoQuick-TC キット) を用いた precipitation 法によりアディポソームを精製する (図 2)。既知のエクソソームマーカーである CD63, CD9, TSG101 等を用いて、Western blotting を行い、エクソソーム分画が単離されたことを確認する。また、エクソソームに特徴的な形態 "cup-shaped" を、透過型電子顕微鏡にて観察する。脂肪毒性誘導実験 (後述) では、肝細胞内への取り込みを可視化できるように、アディポソームを蛍光物質 PKH67 (SIGMA) で標識して用いる (J Biol Chem 285:17442-52, 2010)。

Figure 2



- 4) アディポソームに含まれる分子の解析: アディポソーム中の脂質輸送関連分子、アディポカインを Western blotting で測定する。また、DNA microarray による網羅的遺伝子解析により、アディポソーム中に含まれる脂肪毒性関連候補遺伝子を探索する。
- 5) 脂肪毒性誘導実験 (in vitro 実験): 精製し蛍光標識した各アディポソーム (内臓、皮下脂肪組織由来) を、subconfluent の状態にした肝細胞の培養液に添加する (図 2)。培養 1, 2, 3, 5, 7 日で、ホルマリン固定切片、細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて、脂肪毒性の解析を行う。

以上により、皮下 / 内臓脂肪組織由来アディポソームの特徴と相違を解析し、各アディポソームが肝細胞脂肪毒性において果たす役割を明らかにする。

4. 研究成果

- 1) 内臓 / 皮下脂肪組織由来細胞外小胞 (アディポソーム) の比較 (Figure 3)

内臓脂肪組織由来アディポソームは皮下脂肪組織由来アディポソームの約 6 倍のタンパク量を示し、平均系はそれぞれ 129 nm, 143 nm であった。電子顕微鏡によるアディポソームの観察も行ったが、形態的な相違は認めなかった。

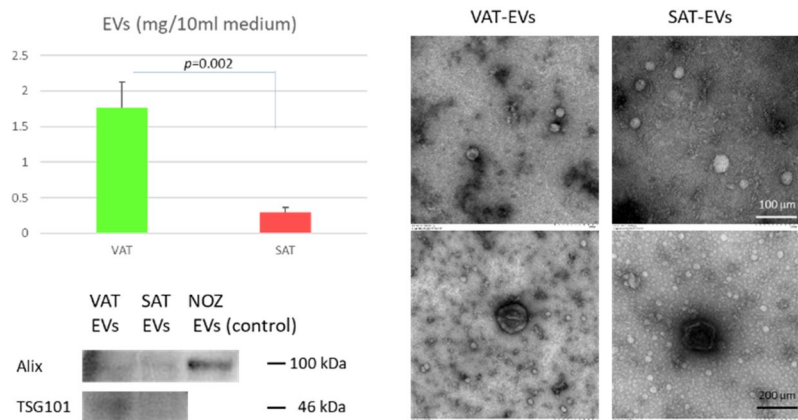
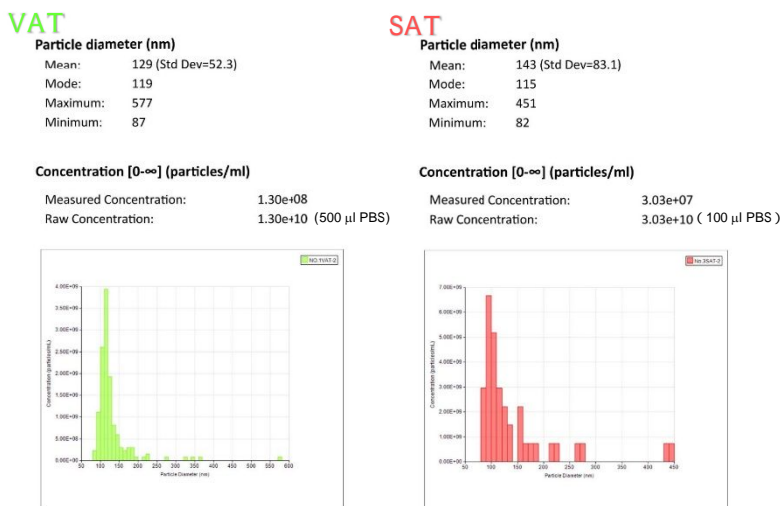


Figure 3



2) 肝細胞への取り込みと脂肪毒性への関与の検討

PKH26 でラベルした各アディポソームを、HepG2 肝細胞の培養上清に添加し、24 時間後に観察を行った。両アディポソームの肝細胞内への取り込みを確認したが、内臓脂肪組織由来アディポソームの取り込みがより多く認められた。(Figure 4)

また、アディポソーム投与によるアポトーシスや脂肪変性等の形態変化は見られなかった。そこで、細胞増殖/細胞毒性測定用試薬 (Cell Counting Kit-8) を用いて、アディポソームが肝細胞の増殖・生存に与える影響を解析したところ、高濃度の内臓脂肪組織由来アディポソームが肝細胞の増殖を抑制する傾向があった。一方、高濃度の皮下脂肪組織由来アディポソームは影響しなかった。(Figure 5)

すなわち、内臓脂肪由来アディポソームのみでは肝細胞にアポトーシスを誘導するほどの十分な脂肪毒性を誘導しないものの、脂肪毒性の仲介因子として作用している可能性が示唆された。

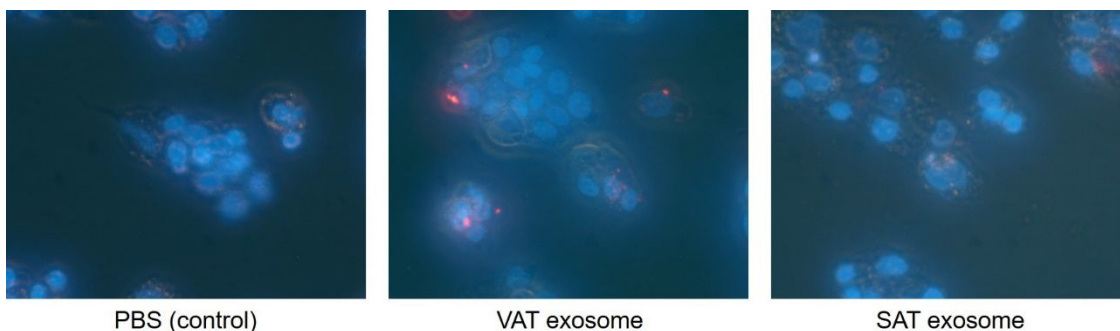


Figure 4

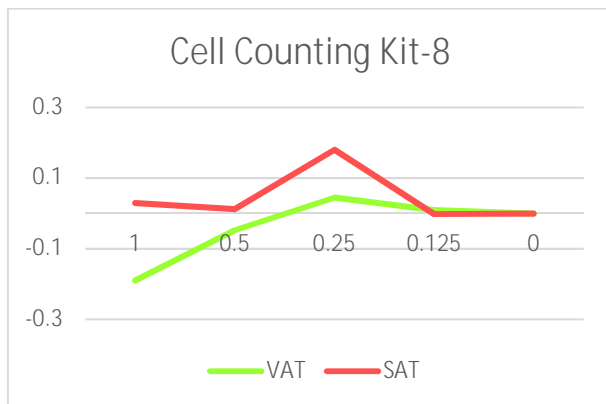


Figure 5

3) アディポソーム中に含まれる脂肪毒性関連候補遺伝子の探索

内臓/皮下脂肪組織由来アディポソームから抽出した RNA を用いて、microRNA の網羅的遺伝子解析を行った。文献で報告されている、肥満や 2 型糖尿病の病態制御に關与している microRNA は抽出されなかった。脂肪毒性に關連する新たな microRNA が含まれている可能性があるため、引き続き解析を行っていく。

4) 肝細胞脂肪毒性誘導因子の分析

これまでの実験で、アディポソームによって軽度の肝細胞の増殖抑制効果は認められたものの、内臓脂肪組織培養上清を直接 HepG2 肝細胞に投与したときに觀察された (Figure 1) 高度のアポトーシスは再現されなかったため、アディポソーム除去分画を用いた実験を行った。すなわち、内臓/皮下脂肪組織培養上清を回収し、超遠心法で沈殿したアディポソームを含む pellet 以外の上澄を回収したもの (アディポソーム除去分画) および pellet から精製したアディポソームをそれぞれ HepG2 単層培養に添加した。24 時間後に位相差顕微鏡で觀察したところ、内臓脂肪組織由来アディポソーム除去分画では、皮下脂肪組織由来アディポソーム除去分画およびコントロール群に比し明らかな接着細胞の減少、アポトーシスが觀察された。一方、内臓脂肪組織由来アディポソーム、皮下脂肪組織由来アディポソーム群では形態的な変化は認められなかった。

以上から、内臓脂肪組織誘導性の肝細胞のアポトーシスは、アディポソーム以外の液性因子を介して誘導されていると結論づけた。

脂肪組織から分泌される細胞外小胞、すなわちアディポソームは、内臓脂肪組織と皮下脂肪組織が產生するもので相違があることを初めて明らかにした。内臓脂肪組織と皮下脂肪組織は起源が異なると考えられており、これを裏付ける研究成果であり、さらに、脂肪組織の部位による機能的役割が異なることを示唆するものとする。また、細胞外小胞には microRNA が含まれることが知られており、脂肪組織は全身を循環する microRNA の最大の供給源との報告がある。癌研究においては microRNA が診断、治療において臨床応用されつつあるが、糖尿病や肝疾患などの代謝性疾患ではまだ不明な点が多い。本研究を進展させることで、種々の代謝性疾患における microRNA による病態制御に脂肪組織が果たす役割が解明される一助となると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西島亜紀、山本洋平、鈴木麻弥、田口歩美、大森康文
2. 発表標題 肝細胞脂肪毒性の解明
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2018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
研究分担者	戸田 修二 (Toda Shuji) (80188755)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	大森 泰文 (Omori Yasufumi) (90323138)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	
研究分担者	山本 洋平 (Yamamoto Yohei) (70400512)	秋田大学・医学部附属病院・助教 (11401)	