

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09419

研究課題名(和文) アルコール性肝障害における動脈硬化発症機序の解明：肝由来小胞体封入病態情報の関与

研究課題名(英文) Investigation of arteriosclerosis associating with liver derived extracellular vesicles in alcoholic liver disease

研究代表者

竹井 謙之 (Takei, Yoshiyuki)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10306954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：障害肝細胞からは病態情報を包埋した細胞外小胞が放出される。本研究では、アルコール性肝障害における肝由来の細胞外小胞が動脈硬化症を誘発する機構の検討および細胞外小胞成分の解析を行った。アルコール性肝炎マウスモデルでは動脈硬化症の症状は比較的軽微にとどまったものの、骨格筋においてミトコンドリア巨大化など様々な変化が生起することを見出し、これらの臓器間病態クロストークに關与する細胞外小胞成分を同定した。アルコール性肝障害では動脈硬化症のみならずサルコペニアにおいても肝細胞由来の細胞外小胞が臓器間病態情報伝播体として重要な役割を果たす可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルコール性肝障害に合併する動脈硬化症とサルコペニアには障害肝細胞由来の細胞外小胞が病態情報伝播体として重要な役割を果たすことが示された。細胞外小胞を基軸とした「アルコール性肝障害・動脈硬化症・サルコペニア」のメカニズム解明、そして病態に關与する細胞外小胞をターゲットとしたバイオマーカーや治療法開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Alcoholic liver disease (ALD) is strongly associated with arteriosclerosis. We have reported that damaged hepatocytes release extracellular vesicles (EVs) in ALD mice, thus we hypothesized that hepatocyte-derived EVs carry pathological information, such as cellular proteins and microRNAs, causing development of arteriosclerosis. In this study, we investigate the molecular mechanism of arteriosclerosis by hepatocyte-derived EVs. Using the alcoholic hepatitis mouse model, we observed the mild arteriosclerosis and abnormalities in muscle, suggesting that ALD is not only associated with arteriosclerosis but muscle damage. We detected proteins and microRNAs in hepatocyte-derived EVs that are associated with arteriosclerosis and muscle damage. We conclude that hepatocyte-derived EVs may contribute the progression of arteriosclerosis and muscle damage.

研究分野：消化器病学

キーワード：アルコール性肝障害 細胞外小胞 動脈硬化 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

1. アルコール性脂肪性肝炎(ALD)及び非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は肝硬変・肝癌に進展しうる病態であり、我が国では患者数の急増と共に肝硬変の成因として重要度を増している。また ALD や NAFLD は全身諸臓器とのクロストークを介して病態が進行し、そのメカニズムの解明が重要である。NAFLD 患者の死因第一位は虚血性心疾患であり、メタボリックシンドロームを基盤とした NAFLD/非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)と動脈硬化症の間には密接な関連があることが報告されている(*Diabetes* 2005; 54: 3541, *Hepatology* 2005; 42: 473)。我々は過剰アルコール負荷に伴う肝障害が動脈硬化を促進することを示した(*Circ J.* 2011; 75: 2269)。しかし ALD 及び NAFLD/NASH の脂肪性肝障害と動脈硬化症を繋ぐメカニズムには不明な点が多く、またこれら肝疾患における動脈硬化発症を予測できるバイオマーカーもない。動脈硬化症の進行過程では、慢性炎症に伴う組織傷害とともに組織の修復・再生が繰り返され、細胞外マトリックスの増生、血管平滑筋細胞の肥大・過形成が生じる。この慢性炎症に脂肪細胞やマクロファージから放出される炎症性アディポカインやサイトカインが関与していると言われていたが、ALD や NAFLD には肥満を伴わない症例も多く存在し(Kojima et al.2003 *J Gastroenterol*, Okanou et al. 2011 *J Gastroenterol Hepatol*)、炎症性アディポカインやサイトカインとは異なった因子群がもたらす新たな動脈硬化症発症の機序が示唆される。

我々は、C型肝炎ウイルス(HCV)の研究において、肝で形成されたHCVコア蛋白が脂肪細胞に作用し、アディポカインの産生プロファイルを変化させることにより、肝炎のみならず、全身のインスリン抵抗性を導くことを報告した。また、腸内細菌の変化が肥満発症の因子になることも報告し、諸臓器が複雑なクロストークを形成し、様々な病態をもたらすことを明らかにした。(*Plos ONE* 2015, *BMC Gastroenterology* 2015)。これらの研究において既存の液性因子のみによる情報伝達では説明が困難な病態連繋機構に遭遇し、その解析過程を通じて、肝由来の炎症性病態情報を高密度に保持したまま遠隔臓器・組織に特異的に伝達できる物質(後述の細胞外小胞)が介在することにより、動脈硬化症をはじめとする諸臓器の病態形成に関与するという仮説に至った。

2. 細胞外小胞とは、細胞から放出されるナノ粒子のことであり、1)肝臓疾患等の炎症疾患において血中の細胞外小胞数が増加し、かつ細胞外小胞の構成成分(タンパク質・microRNA・脂質・mRNA・DNA 等)が変化すること、2)細胞外小胞は標的細胞に効率良く成分を導入することで標的細胞を活性化することが知られている(Yanez-Mo, et al. 2015, *J Extracell Vesicles*)。近年、研究分担者(江口暁子)は、アルコール性肝炎マウスの肝細胞から放出される細胞外小胞数が顕著に上昇することや、細胞外小胞成分の microRNA を用いたアルコール性肝炎の評価が可能であること(Eguchi, et al. 2016, *Hepatology*)を明らかにした。また、NASH マウスモデルにおいて肝細胞由来の細胞外小胞が内皮細胞や星細胞の活性化を誘発し肝臓内の病態進行に寄与していることや(Povero, et al. 2015 *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, Povero, et al. 2013 *Science Signaling*)、細胞外小胞のタンパク質や microRNA 成分が NASH のバイオマーカーになること(Povero, et al. 2014, *Plos ONE*)を明らかにした。これらの成果から、アルコール性肝炎(AH)で障害を受けた肝細胞由来の細胞外小胞が臓器間伝達物質として血管内を循環し、血管内皮細胞を活性化することで動脈硬化症を誘発することが予想される。さらに AH 肝由来の細胞外小胞は、動脈硬化症を予測するバイオマーカーになる可能性がある。

2. 研究の目的

我々はアルコール性肝炎マウスにおいて障害肝細胞が細胞外小胞を放出することを報告しており、肝由来の細胞外小胞が病態情報を小胞に閉じ込めて(病原性情報エントロピーを低く保つ)血管内皮細胞に伝播することで動脈硬化症に寄与する可能性を見出した。本研究では以下の検討を行った。

- 1) 動脈硬化症や臓器間病態連繫を誘発するアルコール性肝障害肝由来の細胞外小胞の解析と病態惹起機序における役割の解明
- 2) 細胞外小胞成分を解析し、動脈硬化症誘発を阻害する治療標的の探求と動脈硬化症を予測するバイオマーカーの探索を通し、「細胞外小胞を介した病態情報伝播による動脈硬化症の病態連繫の解明」を行う。

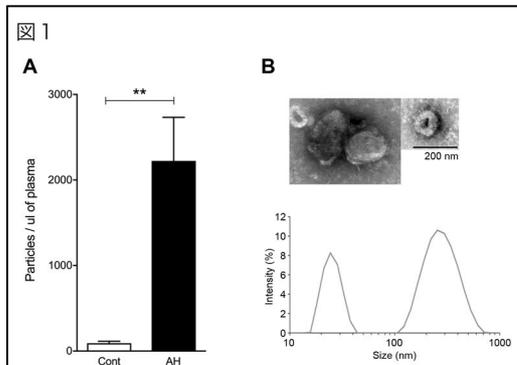
3. 研究の方法

- AH 肝由来の細胞外小胞による血管内皮細胞の活性化・マクロファージの活性化・平滑筋細胞の遊走化を検討し、細胞外小胞が動脈硬化症を誘発・進展させるメカニズムを解明する。
- プロテオミクスや miRNA sequence の手法を用いて細胞外小胞の成分を同定し、標的細胞の活性化を抑制できる治療標的の探求や、この成分を用いた動脈硬化症を予測できる新規バイオマーカーの開発を行う。
- 同定した細胞外小胞成分が治療の標的分子となりえるかを検討する。

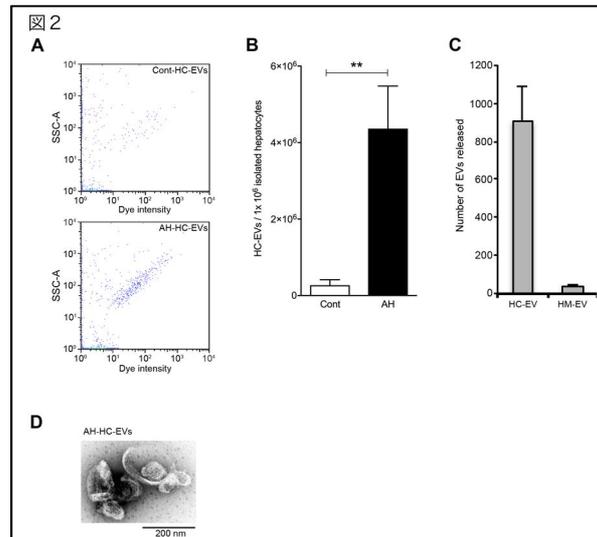
4. 研究成果

1. 短期間のアルコール負荷では AH 群の動脈硬化症の症状は軽微にとどまったものの、骨格筋において、ミトコンドリア巨大化や糖代謝・脂質代謝の異常など、様々な変化が生起することが観察された。アルコール性肝障害においては、動脈硬化症とサルコペニアの合併が知られており、これら 3 つは極めて密接な連繫を持ちつつアルコール性肝障害における全身の病態形成にかかわることが強く示唆された。動脈硬化症のみならずサルコペニアにおいても我々の研究テーマである肝細胞由来の細胞外小胞が臓器間病態情報伝播体として重要な役割を果たす可能性が示された。細胞外小胞を基軸とした「アルコール性肝障害・動脈硬化症・サルコペニア」病態解明への展開を示す結果であり、病態連繫に関与する細胞外小胞に関し以下詳細な検討を行った。

2. AH マウスとコントロールマウスの血漿を回収し血中の細胞外小胞を測定したところ、AH 群で有意に上昇することがわかった(図1A)。また、この血中の細胞外小胞のサイズは大小2つのピークがあった(図1B)。AH マウスとコントロールマウスから肝細胞やマクロファージを分離・培養し、培養上清から細胞外小胞を回収した。細胞外小胞を染色し flow cytometry を用いて細胞外小胞数を測定した(図2A)。AH マウスの肝細胞由来細胞外小胞が有意に上昇し(図2B)、また、肝細胞由来の細胞外小胞数がマクロファージ由来の細胞外小胞数に比べて高いことを見出

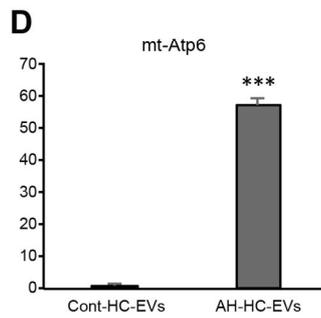
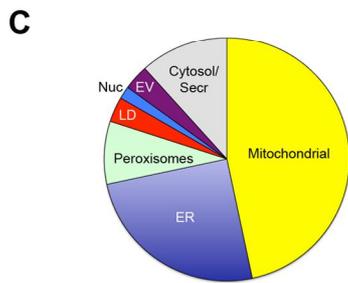
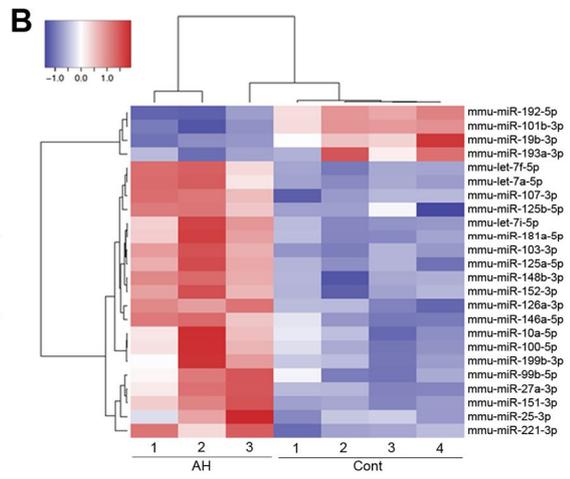
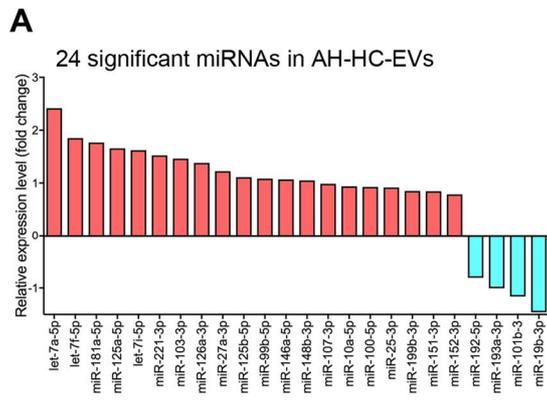


した(図2C)。電子顕微鏡により肝細胞由来の細胞外小胞の形態を確認した(図2D)。



3. AH マウスとコントロールマウスから分離した肝細胞の培養上清中から、細胞外小胞を超遠心法にて分離・精製後、細胞外小胞から RNA を回収し microRNA sequence により封入されている microRNA を網羅的に同定した(図3A、B)。その結果、有意に上昇、または減少する24個の microRNA が同定でき、またこのプロファイルはマウス間で同じであることから、病態進行に関連する microRNA 群あることが強く示唆された(図3B)。実際、これらの microRNA の中には、肝線維化に関わる microRNA が複数あった。引き続き、細胞外小胞のタンパク質成分を同定した(図3C)。タンパク質成分の主成分はミトコンドリアや ER 由来のものであった。AH マウスではミトコンドリア障害が起こることが知られており、肝細胞障害の特性を反映していると考えられる。さらに近年細胞外小胞の中に封入されたミトコンドリア DNA が、標的細胞の活性化に関わるという報告があることから、ミトコンドリア DNA の量についても検討した(図3D)。その結果、AH 肝細胞由来の細胞外小胞にはミトコンドリア DNA が多く封入されていることがわかった。標的細胞を活性化する成分の同定、その抑制について検討を行っている。

3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Eguchi Akiko, Franz Niklas, Kobayashi Yoshinao, Iwasa Motoh, Wagner Nils, Hildebrand Frank, Takei Yoshiyuki, Marzi Ingo, Relja Borna	4. 巻 6
2. 論文標題 Circulating Extracellular Vesicles and Their miR “Barcode” Differentiate Alcohol Drinkers With Liver Injury and Those Without Liver Injury in Severe Trauma Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 6-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2019.00030	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
1. 著者名 Shigefuku Ryuta, Iwasa Motoh, Eguchi Akiko, Shiraishi Koichi, Ito Toshifumi, Suzuki Kazutomo, Koreeda Chizu, Ohtake Takaaki, Tokumoto Yoshio, Endo Ryujin, Kawamura Naohiro, Shiraki Makoto, Habu Daiki, Sakai Hironori, Kato Akinobu, Nishiguchi Shuhei, Moriwaki Hisataka, Suzuki Kazuyuki, Takei Yoshiyuki	4. 巻 49
2. 論文標題 Hypo zincemia is associated with human hepatocarcinogenesis in hepatitis C virus related liver cirrhosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1127 ~ 1135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13388	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 Eguchi Akiko, Hasegawa Hiroshi, Iwasa Motoh, Tamai Yasuyuki, Ohata Keiichi, Oikawa Tsuyoshi, Sugaya Takeshi, Takei Yoshiyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Serum Liver Type Fatty Acid?Binding Protein Is a Possible Prognostic Factor in Human Chronic Liver Diseases From Chronic Hepatitis to Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 825 ~ 837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1350	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12件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 竹井謙之
2. 発表標題 アルコール性肝障害が拓く生命医科学：serendipityの研究史
3. 学会等名 第54回 日本肝臓学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江口暁子、竹井謙之、Feldstein Ariel、塚本秀和
2. 発表標題 Extracellular vesicle miRNAs in alcoholic steatohepatitis
3. 学会等名 平成30年度 アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiyuki Takei
2. 発表標題 Liver Parenchymal Cells and Sinusoidal Cells: Cell Sociology in Alcoholic Liver Disease
3. 学会等名 19th Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹井謙之
2. 発表標題 アルコール性肝障害とNAFLD：代謝に回帰する肝臓病学
3. 学会等名 日本消化器病学会東海支部第127回例会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹井謙之
2. 発表標題 アルコール性肝障害・NAFLD
3. 学会等名 第103回日本消化器病総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹井謙之
2. 発表標題 シンポジウム「アルコール性肝障害研究の最先端」総括発言
3. 学会等名 第52回日本アルコール・アディクション医学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshinao Kobayashi, Yasuyuki Tamai, Akiko Eguchi, Mina Tenpaku, Ryuta Shigefuku, Motoh Iwasa, Yoshiyuki Takei
2. 発表標題 ASSOCIATION AMONG SERUM BILE ACIDS, LIVER FIBROSIS AND SKELETAL MUSCLE VOLUME IN NAFLD AND BIOLOGICAL EFFECTS OF BILE ACIDS
3. 学会等名 AASLD 2019（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Tamai, Akiko Eguchi, Motoh Iwasa, Zhen Chen, Yue Wu, Jun Okabe, Hitoshi Chiba, Shu-Ping Hui, Yoshiyuki Takei
2. 発表標題 L-CARNITINE AND BRANCHED-CHAIN AMINO ACIDS ATTENUATE HEPATOCELLAR DAMAGE THROUGH REDUCTION OF LIVER LIPID PEROXIDES AND
3. 学会等名 AASLD 2019（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Eguchi, Motoh Iwasa, Mina Tenpaku, Yoshinao Kobayashi, Yoshiyuki Takei
2. 発表標題 C1q MEDIATES LIVER FIBROSIS THROUGH CTGF ACTIVATION AND IS A PROGNOSTIC FACTOR FOR SURVIVAL IN RAT AND HUMAN CHRONIC LIVER
3. 学会等名 AASLD 2019 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林由直, 江口暁子, 竹井謙之
2. 発表標題 NAFLD患者における1次および2次胆汁酸のメタボリック関連因子および骨格筋に与える影響について
3. 学会等名 第23回日本肝臓学会大会 (シンポジウム)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口暁子, 岩佐元雄, 竹井謙之
2. 発表標題 Alcohol hepatitis マウスにおける肝細胞由来Extracellular vesiclesはmiRNA成分により肝星細胞を制御し、DAMP成分により肝マクロ
3. 学会等名 第23回日本肝臓学会大会 (シンポジウム)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口暁子, 岩佐元雄, 竹井謙之
2. 発表標題 NASH及びASHIにおける障害肝細胞由来Extracellular vesiclesの病態進行への関与
3. 学会等名 第43回肝臓学会西部会 (シンポジウム)
4. 発表年 2019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	江口 暁子 (Eguchi Akiko) (00598980)	三重大学・医学系研究科・特任講師(研究担当) (14101)	
研究分担者	山本 憲彦 (Yamamoto Norihiko) (60501963)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	
研究分担者	長谷川 浩司 (Hasegawa Hiroshi) (90737008)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	