

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07057

研究課題名（和文）NASH発症過程における生体内一重項酸素の機能解明

研究課題名（英文）Analysis of the function of singlet oxygen in vivo during the development of NASH

研究代表者

室富 和俊（Murotomi, Kazutoshi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40635281

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では活性酸素種（ROS）の一種である一重項酸素の機能や発生機序を探索し、NASH発症に一重項酸素が関与するののかという仮説検証を目的とした。一重項酸素の発生機序を解析するために、細胞内一重項酸素測定法の開発に着手した。その結果、市販の一重項酸素検出プローブSi-DMA等を用いた蛍光タイムラプスによって、細胞内の一重項酸素の定量に成功し、論文発表に至った。一方、NASH発症初期の脾臓におけるROS産生量は、正常マウスと同程度であったものの、サイトカイン産生量は正常マウスよりも顕著に増加した。以上の結果、脾臓由来の炎症性サイトカインがNASH発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞内の一重項酸素を定量的に測定方法を開発することに成功し、成果を論文として社会還元することができた。当該測定方法を用いることで、体に悪影響を与えると考えられている一重項酸素を細胞の中で増加または消去可能か検証することができ、化粧品素材や食品機能性成分の開発に貢献できる。さらに、NASH発症過程における脾臓の特性、具体的にはNASH初期段階の脾臓におけるROS産生量は正常な脾臓よりもわずかに増加する一方、刺激応答性のサイトカイン産生量は顕著に増加することを明らかにし、論文発表に至った。本成果は、NASH発症時の生体応答の一旦を示すものであり、NASH診断などへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to explore the function and generation mechanism of singlet oxygen, a type of reactive oxygen species (ROS), and to test the hypothesis that singlet oxygen is involved in the pathogenesis of NASH. To analyze the mechanism of singlet oxygen generation, we initiated the development of an intracellular singlet oxygen assay. As a result, we succeeded in quantifying intracellular singlet oxygen by fluorescence time lapse using commercially available singlet oxygen detection probes such as Si-DMA, which led to the publication of this paper. On the other hand, ROS production in the spleen in the early stage of NASH onset was comparable to that in normal mice, but cytokine production was markedly increased compared to that in normal mice. These results suggest that spleen-derived inflammatory cytokines may be involved in the development of NASH.

研究分野：生物系薬学

キーワード：一重項酸素 活性酸素種 炎症 NASH

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一重項酸素 ( $^1O_2$ ) は活性酸素種 (ROS) の一種で、基底状態の三重項酸素分子がエネルギーを受けとることで生成し、植物に豊富なクロロフィル等の光増感剤を介した生成経路がよく知られている。一方、光に依存しない化学的な一重項酸素の生成機構として、好中球等の殺菌過程で生じる次亜塩素酸イオンと過酸化水素の反応がある。従って、生体では紫外線が当たる皮膚表面、あるいは好中球やマクロファージが集積した炎症部位で一重項酸素が産生されると予想されている。溶液中の一重項酸素は、ラマン分光や電子スピン共鳴法 (ESR) で検出可能であるが、細胞培養液や体液中での一重項酸素の半減期は約 60  $\mu$ sec 以下と非常に不安定であること、細胞膜透過性プローブ等が未開発であったことから、生体内での検出は困難であり、その発生機序や機能については未知のままである。

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、脂肪変性、炎症、肝細胞障害を特徴とする肝臓病変で、大部分は肥満や糖尿病を伴うメタボリックシンドロームの一種と考えられている。NASH は病態が進行すると線維化を誘導し、不可逆的な肝硬変や肝がんを発症するため、その早期診断法の開発が望まれているが、現状、確定診断法は侵襲的な肝生検しかない。そのため、NASH 発症メカニズムを解明し、非侵襲的かつ早期診断に寄与するバイオマーカー探索が盛んに行われている。

### 2. 研究の目的

上記のような背景の下、申請者らは所属機関で独自に開発された脂質過酸化物分析法を利用し、NASH モデルマウスの血中で、一重項酸素特異的に産生される脂質過酸化物 (10, 12-(Z,E)-HODE) が上昇することを発見した (Murotomi et al., Free Radic Res., 2015)。この結果は、NASH 発症に至る過程で一重項酸素が発生する可能性を示唆しているが、一重項酸素が肝臓にどのような影響を及ぼすかは不明である。本研究では生体内、特に肝臓における一重項酸素の機能や発生メカニズムを探求し、NASH の発症に一重項酸素が関与するのか、という新たな仮説の検証を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞内一重項酸素測定

ヒト肝がん由来細胞 HepG2 およびマウス繊維芽細胞 NIH3T3 を glass-based 35 mm dish で培養し、HBSS で洗浄後、ミトコンドリア集積型一重項酸素プローブ Si-DMA (同仁化学) を含んだ HBSS に交換し、30 分間インキュベーションした。HBSS で 3 回洗浄した後、CO<sub>2</sub> ガス・温度制御可能な顕微鏡 (BZ-X710) 下で培養しつつ、一重項酸素発生試薬 (endoperoxide: EP、ワケンビーク) を添加し、37 条件下で 30 分間蛍光強度を連続的に測定した。

Si-DMA 蛍光強度を FACS で測定する場合は、Si-DMA 含有 HBSS で 30 分間インキュベーションした細胞を回収し、FACS analyzer (BD FACS Calibur) で蛍光強度を測定した。細胞内の ROS 発生量の測定には、10  $\mu$ M DCFH-DA (Thermo) を細胞に添加し、30 分間インキュベーション後、EP を添加し、10 分から 6 時間後の蛍光強度を FACS analyzer で測定した。

#### (2) 単離ミトコンドリアの一重項酸素測定方法

8 週齢の C57BL6 マウス肝臓を採取し、HEPES buffer 中でホモジナイズした。770  $\times$ g, 5 分間遠心した後、上清を 9800  $\times$ g, 10 分間遠心分離した。ペレットを懸濁し、4500  $\times$ g, 10 分間遠心した。ペレットを洗浄後 250mM スクロースを含む HEPES buffer で懸濁した。

#### (3) 培養細胞の生存率測定

HepG2 を 96 well plate (Nunc) に播種し、一晚培養後、0.1~1.0 mM の EP を添加した。24 および 48 時間後に、CCK-8 (同仁化学) を添加し、450nm の吸光度を測定した。何も処置していない細胞の生存率を 100% とし、各種細胞の生存率を計測した。

#### (4) マイクロアレイ解析

6well plate に播種した HepG2 に 0.5 mM または 1.0 mM EP を添加し、20 分後の細胞から Trizol (Thermo) を用いて RNA を精製した。逆転写した cDNA を 3D-Gene (TORAY) に供した。解析データから、EP 添加によって 1.5 倍以上発現量が増加した遺伝子を抽出し、PANTHER Classification System で pathway 解析を行った。

#### (5) NASH モデルマウス

メタボリックシンドロームモデル TSOD マウスとその対照である TSNO マウスを飼育し、体重および血糖値を経時的に測定した。NASH 初期症状を呈する 12 週齢マウスから肝臓を採取し、病理解析を行なった。

#### (6) マウス脾臓細胞の分離

TSOD および TSNO マウスの脾臓を採取し、スライドガラスですり潰した後、37%percoll を用いた遠心分離によって、細胞を採取した。分離した脾臓細胞に anti-CD16/CD32 (BD Biosciences), を添加してプロッキングを行った、CD11b (BioLegend), F4/80 (BD Biosciences), CD68 (BioLegend) 抗体を用いて標識した。PBS で洗浄後、FACS analyzer を用いて、抗体発現量を解析した。

#### (7) 脾臓細胞の ROS 産生量およびサイトカイン放出量の測定

上記の方法でマウス脾臓細胞を分離し、96well plate に播種した。一晚細胞を培養後、過酸化水素を添加し、DCFH-DA を用いて細胞内の ROS 産生量を測定した。また、培養した脾臓細胞に 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS を添加して 48 時間後に培養上清を回収し、ELISA で TNF を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞内一重項酸素測定法の比較

NASH 模倣状態における一重項酸素発生機序を解明するために、一重項酸素を細胞内で安定的に測定可能か検証した。2014 年に大阪大学のグループによって開発された細胞膜透過型の新規  $^1\text{O}_2$  検出プローブ (Si-DMA) を用いることで、細胞内で発生する  $^1\text{O}_2$  の検出が可能になったものの、その定量性は検証されていなかった。そこで、Si-DMA および熱分解により一重項酸素を発生するエンドパーオキシド (EP) を用い、FACS および蛍光顕微鏡のタイムラプスイメージングで一重項酸素の発生量を測定した。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて検証した結果、いずれの方法でも EP 濃度依存的に蛍光強度が増強し、EP 濃度と蛍光強度には相関関係が認められた。しかし、dynamic range は蛍光タイムラプスイメージングの方が高い点、一重項酸素の半減期 (数十マイクロ秒) が非常に短い点を考慮すると、蛍光強度の経時変化を追跡できるタイムラプスイメージングの方が適した実験系であると考えられた (図 1)。

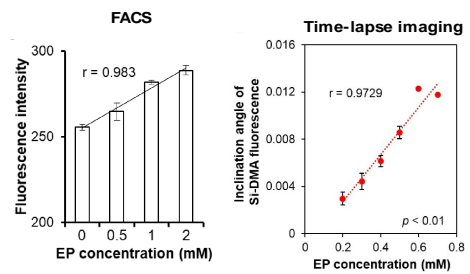


図1 細胞内一重項酸素測定方法の比較

右: FACS測定結果、左: time-lapse imaging測定結果

#### (2) 細胞内一重項酸素の消去能評価法の確立

(1)の測定法を用いることで細胞内一重項酸素の消去能が評価可能か検証した。一重項酸素消去作用をもつアジ化ナトリウムを HepG2 や NIH3T3 に添加したところ、濃度依存的に蛍光強度は低下した (図 2)。さらに、*in vitro*で一重項酸素消去活性が高いと報告されているアスタキサンチンを前処置すると、EP 添加後の一重項酸素産生が有意に抑制された。以上の結果、EP と Si-DMA を用いたタイムラプスイメージングにより、安定して細胞内一重項酸素発生量を測定できることが明らかとなり、本成果を論文発表した (Murotomi et al., Sci Rep., 2020)。

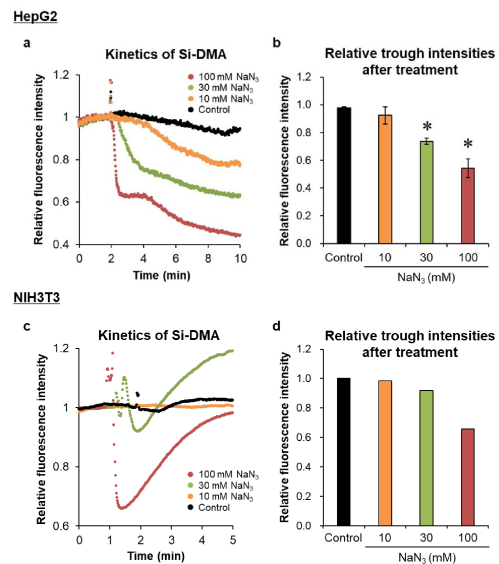


図2 アジ化ナトリウム添加後のSi-DMA蛍光強度の変化

#### (3) 一重項酸素発生とミトコンドリア機能の関係性の解明

確立した方法を用いて、細胞内の一重項酸素がどのようなメカニズムで発生するのか解析した。ローダミン骨格を有する Si-DMA はミトコンドリアに集積するため、Si-DMA による蛍光は主にミトコンドリアで産生された一重項酸素を検出している。まず、ミトコンドリア電子伝達系を介した一重項酸素産生機序を解析したところ、複合体 II 経路で産生することが明らかとなった。興味深いことに、コハク酸を基質として複合体 II を活性化させたにも関わらず、複合体 I 阻害により一重項酸素発生が抑制されたことから、一重項酸素は ROS と同様に逆電子輸送 RET によって発生する可能性が示唆された。

#### (4) 培養肝がん細胞における一重項酸素の機能解析

次に一重項酸素の細胞への影響を解析するために、一重項酸素発生後の細胞生存率と ROS 産生量を測定した。その結果、0.5 および 1.0 mM EP 添加によって、約 1 時間後に細胞内で ROS が産生され、いずれの濃度でも細胞死が誘導された。興味深いことに、0.5 mM EP では一過的に細胞死が誘導されたものの、その後細胞増殖が促進する可能性が示唆された。さらに、0.5 および 1.0 mM EP 添加後の細胞応答を明らかにするために、マイクロアレイを行なった。パスウェイ解析を行なったところ、1.0 mM EP 添加後 30 分目に GPCR シグナルに関する遺伝子発現量が増加する傾向であった。

#### (5) NASH 初期段階における脾臓細胞の特性解析

研究代表者は、以前に NASH 初期症状と脾臓の鉄蓄積量が相関することを見出し、脾臓が NASH 病態に影響を及ぼす可能性を示した (Murotomi et al., Sci Rep., 2016)。しかし、鉄を蓄積した脾臓細胞がどのような機能を有するかは不明であった。鉄は過酸化水素と反応し、ROS の一種であるヒドロキシラジカルを産生する。そのため、正常と比較して約 20 倍鉄含量が多い NASH 初期の脾臓では ROS が大量に産生され、門脈を介して肝臓へ悪影響を与える可能性がある。本仮説を検証するために、NASH モデルマウスの脾臓細胞を分離し、その特性を解析した。一重項酸素を含む ROS 産生量を DCFH-DA を用いて測定した結果、予想に反して、NASH モデルの脾臓細胞における ROS 産生量は、正常マウスよりもわずかに増加した (図 3)。さらに、FACS で脾臓細胞の特性を解析した結果、NASH モデルの脾臓では、CD68 陽性のマクロファージが豊富に存在することが明らかとなった。脾臓細胞を培養し、リポポリサッカライドを添加した結果、炎症性サイトカイン TNF の産生量が顕著に増加した (図 4)。以上の結果、NASH 初期段階で鉄が蓄積した脾臓ではマクロファージが集積し、ROS 産生能がわずかに高く、刺激応答性のサイトカイン産生能が高いことが明らかとなり、本成果を論文として発表した (Murotomi et al., Exp Biol Med., 2022)。今後は、脾臓切除手術を行い、鉄が蓄積した脾臓が NASH 病態に及ぼす影響を明らかにする。

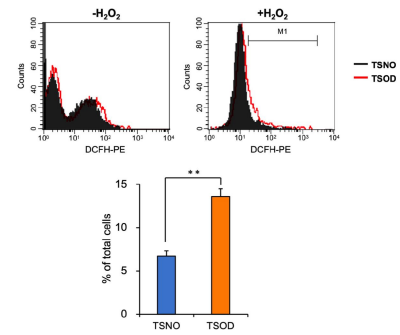


図3 マウス脾臓細胞のROS産生量解析

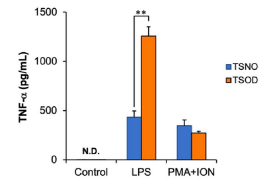


図4 培養脾臓細胞のTNF 産生量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murotomi Kazutoshi、Umeno Aya、Sugino Sakiko、Yoshida Yasukazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Quantitative kinetics of intracellular singlet oxygen generation using a fluorescence probe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-67155-7	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 Murotomi Kazutoshi、Tawara Hirosuke、Sutoh Mitsuko、Yasunaga Mayu	4. 巻 247
2. 論文標題 Iron-accumulating splenocytes may exacerbate non-alcoholic steatohepatitis through the production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 848-855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/15353702221077218	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室富 和俊、梅野 彩、杉野 紗貴子、吉田 康一
2. 発表標題 細胞内一重項酸素発生系の構築と定量的測定法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------