

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08417

研究課題名(和文) エクソソームに着目したNAFLD/NASHにおける肝外合併症の発症機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of extrahepatic complications in NAFLD/NASH with focus on exosomes

研究代表者

高村 昌昭 (Takamura, Masaaki)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20422602

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)：本研究は、エクソソーム可視化human CD63-GFP Tgラットを用いたエクソソームの体内動態の観察、高脂肪食給餌NAFLDラットと普通食給餌controlラットの血中エクソソーム内包タンパク質の網羅的発現アレイ解析をし、肝外合併症発症に関与する候補タンパク質の探索を行った。胃と腎でエクソソームを確認したが、肝臓の発現は不十分で今後の検証が必要であった。両群で発現し、2倍以上発現差のあるタンパク質は同定されなかった。高脂肪食給餌NAFLDラット単独で確認されたタンパク質の多くは、NAFLDでの報告がなく、臨床データとの関連をふまえながら、今後さらなる検討をする必要があると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で、エクソソーム内タンパク質のプロテオーム解析から多くの候補タンパク質が得られた。これらの今後の解析により、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)/非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝外合併症発症メカニズムの分子・細胞レベルでの解明がされ創薬につながれば、わが国でも1000万人以上いると推定されている本疾患の生命予後の改善に大いに役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we observed the dynamics of exosomes in human CD63-GFP Tg rats, which can visualize exosomes, and conducted a proteome analysis of exosome-incorporated proteins in the blood of rats fed a high-fat diet and control rats to search for candidate proteins involved in the pathogenesis of extrahepatic complications. We searched for candidate proteins involved in the pathogenesis of extrahepatic complications. Exosomes were identified in the stomach and kidney, but their expression in the liver was insufficient for further validation. No protein was identified that was expressed in both groups with a 2-fold or greater difference in expression. Many of the proteins identified in high-fat diet-fed NAFLD rats alone have not been reported in NAFLD and require further investigation in the context of clinical data.

研究分野：消化器内科学

キーワード：エクソソーム 非アルコール性脂肪肝疾患 非アルコール性脂肪肝炎 肝外合併症 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) は、わが国を含め世界的に増加傾向にあり、わが国の有病率は 30%弱と報告されている。非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、わが国における NAFLD の約 10~20%存在すると推定されている。これまでの NAFLD/NASH 観察研究によると、その生存率は一般集団より有意に低く、死因に関しては、肝外臓器悪性腫瘍や虚血性心疾患によるものが、肝関連死を上回ることが報告されている (図 1)。研究代表者らの新潟県多施設共同研究による NAFLD のイベント発生に関する検討においても、肺癌や脳出血といった肝関連以外の転帰やイベントが多く観察される。NAFLD/NASH は肝臓を中心とした全身疾患と考えることが、本症の生命予後改善に重要であると思われるが、そのメカニズムは十分理解されていないのが現状である。

図 1. NAFLD/NASH における主な肝外合併症



2. 研究の目的

本研究は、近年、細胞間のコミュニケーションツールとして働き、タンパク質・mRNA・miRNA などの多くの物質が内包された膜小胞体であるエクソソームに着目し、肝外合併症発症メカニズムの分子・細胞レベルでの解明をすることが目的である。本研究では、エクソソーム可視化 human CD63-GFP Tg ラットを用いたエクソソームの体内動態の観察、エクソソーム内包 miRNA・タンパク質の網羅的発現アレイ解析をし、肝外合併症発症に關与する候補 miRNA・タンパク質の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食給餌 human CD63-GFP Tg ラット (NAFLD ラット) と普通食給餌 human CD63-GFP Tg ラット (control ラット) における血中エクソソームの体内動態の観察と肝外臓器の病理組織学的検討

本検討では、human CD63-GFP Tg 雌ラットに、45kcal%脂肪含有高脂肪食を 20 週から 15 週間給餌することで、NAFLD ラットを作成した。NAFLD を発症することにより、可視化された血中エクソソームの体内臓器分布に変化がみられるかを in vivo イメージングシステムを用いて検討する (control ラットとの比較)。NAFLD ラットの肝外臓器の病理組織学的変化を control ラットと比較検討する。

(2) 血中エクソソーム内 miRNA・タンパク質の網羅的発現アレイ解析と候補 miRNA・タンパク質の検証

血中エクソソーム内の miRNA・タンパク質を抽出し、NAFLD ラットと control ラットのアレイ解析を行う。発現差のみられた miRNA・タンパク質については、先行研究、標的遺伝子検索等を参考に、候補 miRNA・タンパク質を絞る。候補 miRNA の標的遺伝子や候補タンパク質について、肝外臓器における発現変化もリアルタイム PCR や免疫染色法などで検討する。肝外合併症の有無で、NAFLD/NASH 症例血中エクソソーム内の候補 miRNA および標的遺伝子、タンパク質の発現に差がみられるかをリアルタイム PCR や免疫染色法で検討する。

(3) NAFLD/NASH 症例の血清・臨床データの集積

新潟大学医歯学総合病院で診断された NAFLD/NASH 症例の血液採取を行い、肝外合併症有無等の臨床データを継続的に集積していく。特に、肝外合併症併発症例は集積が不十分な場合は、当科関連病院と連携し症例集積に努める。

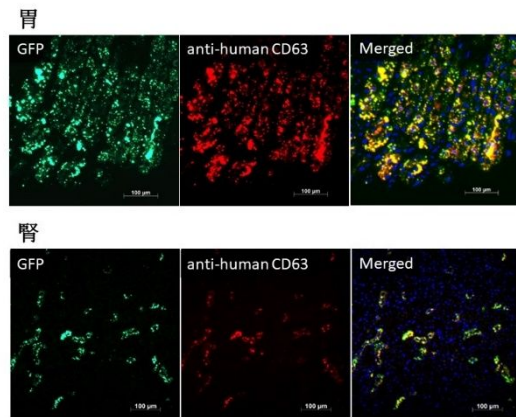
4. 研究成果

(1) 高脂肪食給餌 human CD63-GFP Tg ラット (NAFLD ラット) と普通食給餌 human CD63-GFP Tg ラット (control ラット) における血中エクソソームの体内動態の観察と肝外臓器の病理組織学的検討

human CD63-GFP Tg ラットが野生型に比べ、生存期間が短く、1回の出産における出生数が少ないことが判明した。そのため解析に必要な匹数を確保するために多大な時間を要した。まず、human CD63-GFP Tg ラットの各臓器におけるエクソソームの分布を検討したところ、既報同様に胃と腎でGFP陽性かつCD63陽性細胞を確認した(図2)が、肝臓では非常に染色が弱く、さらなる検証が必要と思われた。

次に、NAFLDラットとcontrolラットの35週時点での比較では、体重に統計学的な有意差はみられなかったが、肝重量/体重比では、NAFLDラットの方がcontrolラットに比し有意に低値であった(3.0 vs 3.3, p=0.03)。血液検査では、ASTやALTで両群に有意差はみられなかったが、ALPはNAFLDラットの方がcontrolラットに比し有意に高値であった(579 vs 423, p=0.03)。また、中性脂肪や総コレステロール等の脂質関連検査値は両群に有意差はみられなかった。

図2. Human CD63-GFP Tg ラットの蛍光イメージング



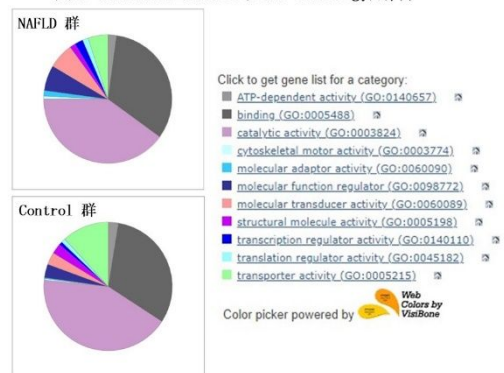
(2) 血中エクソソーム内 miRNA・タンパク質の網羅的発現アレイ解析と候補 miRNA・タンパク質の検証

腎組織からのエクソソーム抽出を試みていたが、解析に必要な検体量を得られなかったことから、検体を血液に変更し、血中エクソソーム内のタンパク質を抽出し、プロテオーム解析を行った。抽出されたタンパク質は、NAFLDラットで2336、controlラットで2694であった。NAFLDラットのみで抽出されたタンパク質は173、controlラットのみで抽出されたタンパク質は531あり、両群ともbindingやcatalytic activityとして機能するタンパク質で全体の約3/4を占めた。上位5タンパク質を表1に示す。残りの約1/4のタンパク質は、molecular transducer activityやmolecular function regulatorの割合がNAFLD群でcontrol群よりも多くを占めた(図3)。なお、群間で2倍以上の発現差がみられたタンパク質はなかった。

表1. 各群単独で発現があったタンパク質(上位5タンパク質)

順位	NAFLD群	Intensity (log2値)	Control群	Intensity (log2値)
1	Svs3a	17.6	Tut7	19.0
2	Cdc5l	17.4	Asb6	18.1
3	Nexn	17.3	Dmtn	17.6
4	Mlk1	17.0	Gng12	17.2
5	Hmcn2	16.8	Atad1	17.2

図3. PantherによるGO(Gene Ontology)解析



(3) NAFLD/NASH 症例の血清・臨床データの集積

より多くの症例での解析を行うため、症例の集積は年度を通して継続して行った。当科では以前より計画的にNAFLD/NASH症例の血清・臨床データの集積を行ってきた(新潟大学医学部倫理委員会 承認番号 1699)。今後、候補タンパク質の解析の際に使用する準備が整った。

(4) 考察と今後の展望

本研究は、観察研究(Leon et al. Gastroenterology 2005, Sonderberg et al. Hepatology 2010)で報告されたNAFLD/NASHの生命予後に影響を与える肝外合併症に対し、エクソソームに着目し、その分子生物学的メカニズムを解明することを目的とした。メチオニン・コリン欠乏食給餌マウスモデルでは、血清エクソソームが増加することが報告されており(Povero et al. Plos One 2014)、今回のhuman CD63-GFP Tgラットにおいても同様の結果が起こり、各臓器に多くのエクソソームが確認出来ると思われた。しかし、エクソソームの確認が胃と腎では確認出来たが、肝臓では染色が非常

に弱く不十分であった。さらに CD9 や CD81 といった他のエクソソームマーカーでも染色を試みたが確認出来なかった。また、NAFLD ラットでも確認出来なかった。原因は現時点では不明であるため、今後の検証が必要と思われる。次に、血中からのエクソソーム内タンパク質について、NAFLD ラットと control ラットの比較をプロテオーム解析を行った。両群で発現しかつ 2 倍以上の発現差がみられたタンパク質は同定されなかったが、各群単独で同定されたタンパク質が NAFLD 群/control 群でそれぞれ 173/531 同定された。特に、NAFLD ラットのみで同定された上位 5 タンパク質のうち、mkl1 (mixed lineage kinase domain-like protein) はオートファジーを阻害することにより、高脂肪食マウスモデルの肝障害および炎症反応に寄与することが報告されているが (Wu et al. J Hepatol 2020)、他のタンパク質については NAFLD における報告がなく、今後、肝外臓器における報告や臨床データとの関連をふまえながら、さらなる解析を進めていきたい。同様に、血中エクソソーム内 miRNA についても網羅的解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Yoshida T, Tsuchiya A, Kumagai M, Takeuchi S, Nojiri S, Watanabe T, Ogawa M, Itoh M, Takamura M, Suganami T, Ogawa Y, Terai S.	4. 巻 530
2. 論文標題 Blocking sphingosine 1-phosphate receptor 2 accelerates hepatocellular carcinoma progression in a mouse model of NASH	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 665-672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.099.	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 Kimura N, Takamura M, Takeda N, Watanabe Y, Arai Y, Takatsuna M, Takeuchi S, Abe H, Setsu T, Kamimura H, Sakamaki A, Kamimura K, Tsuchiya A, and Terai S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Paris II and Rotterdam criteria are the best predictors of outcomes in patients with primary biliary cholangitis in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology International	6. 最初と最後の頁 437-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12072-021-10163-0	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 Takamura M, Matsuda Y, Terai S, and Niigata PBC Study Group.	4. 巻 51
2. 論文標題 Changes in disease characteristics of primary biliary cholangitis: An observational retrospective study from 1982 to 2016	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 166-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13586	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高村昌昭、川合弘一、寺井崇二
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝疾患の悪性腫瘍無病生存予測におけるFib-4 indexの有用性
3. 学会等名 第23回、日本肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横尾健、高村昌昭、寺井崇二
2. 発表標題 健診スクリーニングを意識した肝発癌リスク評価におけるFIB-4 indexの有用性
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高村昌昭、横尾健、寺井崇二
2. 発表標題 ALBI score/gradeからみたNASH薬物治療に対する肝予備能への影響
3. 学会等名 第24回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横尾健、高村昌昭、寺井崇二
2. 発表標題 CAPに基づき診断したMetabolic dysfunction-associated fatty liver diseaseの臨床的特徴
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高村昌昭、薛徹、寺井崇二
2. 発表標題 原発性胆汁性胆管炎の病態における腎機能の影響
3. 学会等名 第57回、日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021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	横尾 健 (Yokoo Takeshi) (80750629)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (13101)	
研究 分担者	寺井 崇二 (Terai Shuji) (00332809)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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
---------	---------