

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17497

研究課題名（和文）セラミド含有exosomeを介した新規NASH進展メカニズムの解明

研究課題名（英文）Novel mechanism of NASH progression mediated by ceramide-enriched exosomes

研究代表者

福島 真典（Fukushima, Masanori）

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：80835596

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）：本研究において、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の原因となる脂肪毒性と腸内細菌による影響としてのlipopolysaccharide(LPS)とを、肝細胞に共に投与することで、NASH病態に寄与する肝細胞由来の細胞外小胞の分泌の増加を証明できた。一般的にNASHの病態進展には複数の因子が影響していると言われていたが、本研究により脂肪毒性単独の影響よりも、腸内細菌によるLPSが共に存在することで、細胞外小胞の観点からNASH病態への進展を促進させてい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

脂肪毒性と腸内細菌由来のLPSが細胞外小胞の分泌増加に関与していることが証明され、NASHの病態に細胞外小胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。したがってこの細胞外小胞のさらなる解析が、NASH進展メカニズムを解明する新たな手段となりうる。将来的にはNASH進展予防や治療のターゲット分子として細胞外小胞が重要な役割を果たす可能性があるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that hepatocyte-derived extracellular vesicle secretion, which contributes to the pathogenesis of NASH, is increased when hepatocytes are treated with both lipotoxicity, which causes NASH, and LPS, which is an effect of intestinal bacteria. Although it is generally believed that multiple factors influence the pathological progression of NASH, this study suggests that the presence of LPS together with intestinal bacteria may promote the progression of NASH pathology in terms of extracellular vesicles, rather than the effect of fat toxicity alone.

研究分野：NASH

キーワード：NASH 細胞外小胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は世界的に急速に増加している肝疾患であり、NASH 進展による肝硬変は、いまや米国では肝移植の原因疾患の第2位であり、また本邦でもその症例数は急速に増加している。しかしながら依然として確立した治療方法がなく、NASH の病態解明、治療法開発は急務である。

近年 NASH の病因として脂肪毒性や腸内細菌叢など複数の因子が並行して関与するという Multiple Parallel Hits Hypothesis が提唱され、世界中の研究室で様々なアプローチにより NASH 病態解明の研究が進められている。われわれは、脂肪毒性の主因となる飽和脂肪酸(パルミチン酸)が肝細胞中でスフィンゴ脂質の一種であるセラミドの合成を増加させること、またそのセラミドは exosome に受け渡され、セラミドを豊富に含有する exosome が肝細胞から分泌されることを明らかにしてきた(Fukushima et al. J Biol Chem 2018)。そしてさらに、この exosome は macrophage に作用し proinflammatory macrophage として肝細胞への遊走を惹起し NASH を引き起こすことを報告している。つまり脂肪毒性により促進されるセラミド含有 exosome 分泌の増加が NASH を引き起こす、という新たなメカニズムを報告している。

一方、近年 NASH の新たな病因として腸内細菌叢の関与が報告されるようになってきた。NASH 患者では腸内細菌叢の質的量的変化、腸内壁バリアの機能破綻により門脈血の lipopolysaccharide(LPS)が増加し、その LPS が肝の炎症、線維化、発癌を促進させることが多数の論文で明らかにされている。興味深いことに LPS はセラミド合成に密接に関与しており、肝細胞で Toll-like receptor 4(TLR4)を介し、パルミチン酸をセラミドに変換する Serine palmitoyl transferase(SPT)を産生し、セラミド合成を促進することが報告されている。つまり腸内細菌叢由来の LPS は、セラミド合成を促進することで、脂肪毒性による NASH 進展に対し相加、相乗的に働いている可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

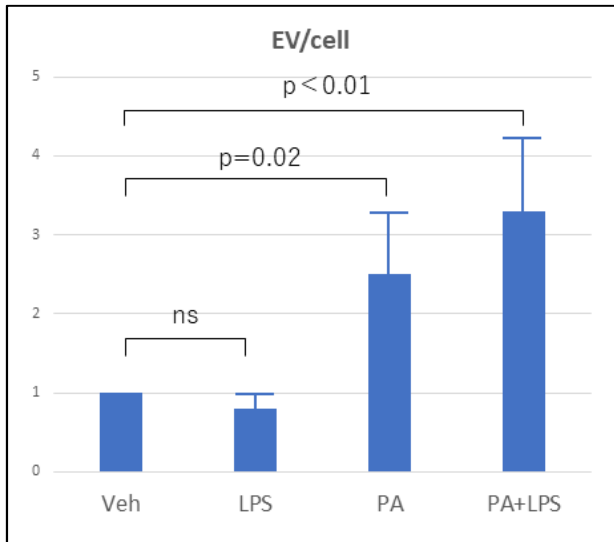
本研究では、LPS 存在下での脂肪毒性(パルミチン酸添加)によりセラミド含有 exosome が増加すること、またこれが macrophage を活性化することを明らかにしたいと考えている。細胞、マウスによる実験を通して、最終的にはこれらの結果が NASH の病態進展に関与することを証明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究ではヒト肝癌細胞株(Huh7)、ヒト正常肝細胞株(HepaRG)、マウス正常肝細胞株を用い、脂肪毒性としてパルミチン酸添加、さらに LPS 添加を用いて、肝細胞におけるセラミド合成にかかわるタンパク発現変化、またセラミド合成、セラミド含有 exosome の分泌促進について解析する。さらに NASH モデルマウスを用いて、LPS による影響下で生体内においても NASH 進展が促進されることを明らかにする。尚、exosome の抽出には超遠心法を用いて、細胞培養上清またはマウス血漿から行う。

#### 4 . 研究成果

肝細胞へのパルミチン酸添加、LPS 添加の条件をそれぞれ 400nM, 100ng/mL と設定し、Huh 7 の分泌する exosome に関して解析した結果、コントロール群の exosome 分泌量を 1 とすると、LPS のみの添加では exosome の分泌量は増加しないが、パルミチン酸添加により 2.5 倍、加えて LPS を添加すると 3.2 倍の exosome の分泌が得られた(下図)。この結果より、パルミチン酸による脂肪毒性に LPS の作用が加わることで、exosome がより分泌されることが分かった。



さらに、得られた exosome に関して脂質解析を行うと、exosome 中の C16 セラミドに関しては、有意差はでなかったが、パルミチン酸添加群ではコントロール群に比べ、セラミド含有量は多い傾向にあり、過去の報告と同様であった。測定検体数が少ないため、解析検体数を増やせば、有意な差がつくと思われる。また、LPS 添加を追加した群でのさらなるセラミド含有量の増加は認めなかった。これは個々の exosome 中のセラミド含有量はパルミチン酸添加群と同程度だが、exosome 分泌総量の増加という面で、total で exosome によるセラミド輸送量としては増加していることを示唆している。

具体的な細胞中のセラミド合成経路の解析においてはセラミド合成酵素を活性化する TLR-4 の発現上昇の結果は得られているが、セラミド合成酵素である SPT に関する発現に関してはサブクラスが 1,2,3 とあり、これらの発現増減に関しては継続し測定中である。

またマウスに関する実験も現在 NASH モデルマウスの飼育中であり、引き続き研究の継続を要する。今回の研究期間では、残念ながら計画していたすべての実験を終了することができなかったが、マウス実験も含め、予定実験にはすべて着手できており、今後結果の解析を行い、研究成果を発表していきたいと考えている。

本研究を通して脂肪毒性と腸内細菌由来の LPS が細胞外小胞の分泌増加に関与していることが証明され、NASH の病態に細胞外小胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。したがってこの細胞外小胞のさらなる解析が、NASH 進展メカニズムを解明する新たな手段となり得る。将来的には NASH 進展予防や治療のターゲット分子として細胞外小胞が重要な役割を果たす可能性があるのではないかと考えている。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashiki Suguru, Miura Satoshi, Mishima Hiroyuki, Masumoto Hiroshi, Hidaka Masaaki, Soyama Akihiko, Kanda Yasuko, Fukushima Masanori, Haraguchi Masafumi, Sasaki Ryu, Miyaaki Hisamitsu, Ichikawa Tatsuki, Takatsuki Mitsuhiisa, Eguchi Susumu, Yoshiura Koh-ichiro, Nakao Kazuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Bile extracellular vesicles from end-stage liver disease patients show altered microRNA content	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology International	6. 最初と最後の頁 821～830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12072-021-10196-5	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 Matsumoto Kosuke, Miyaaki Hisamitsu, Fukushima Masanori, Sasaki Ryu, Haraguchi Masafumi, Miura Satoshi, Nakao Kazuhiko	4. 巻 16
2. 論文標題 The impact of single nucleotide polymorphisms on liver stiffness and controlled attenuation parameter in patients treated with direct-acting antiviral drugs for hepatitis C infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2021.1492	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 Nakao Yasuhiko, Fukushima Masanori, Mauer Amy S., Liao Chieh-Yu, Ferris Anya, Dasgupta Debanjali, Heppelmann Carrie Jo, Vanderboom Patrick M., Saraswat Mayank, Pandey Akhilesh, Nair K. Sreekumaran, Allen Alina M., Nakao Kazuhiko, Malhi Harmeet	4. 巻 9
2. 論文標題 A Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Associated With Lipotoxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.735001	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 福島真典
2. 発表標題 NASH進展に寄与するceramide-enriched exosome産生メカニズムの解明
3. 学会等名 酸化ストレスと肝研究会
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
---------	---------