

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17988

研究課題名(和文)プリン作動性化学伝達による非アルコール性脂肪肝炎(NASH)発症制御機構の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of purinergic chemical transmission in the development of Non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

坂本 昌平(Sakamoto, Shohei)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：90761502

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)を介して小胞内に貯蔵されたATPは、細胞外に放出され、プリン作動性化学伝達を惹起する。本研究ではプリン作動性化学伝達が非アルコール性脂肪肝炎(NASH)発症過程で果たす役割を明らかにすることを目的とした。申請者らは肝細胞およびマクロファージにおいてグルコースおよびアポトーシスが刺激となり分泌されたATPが炎症を惹起・持続させることを見出し、その働きはVNUT依存的事であることを明らかにした。以上の結果から肝臓におけるプリン作動性化学伝達はNASH発症を促進していると考えられ、VNUTはNASHに対する新たな治療標的になり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、肝細胞およびマクロファージのVNUTを介したプリン作動性化学伝達がマクロファージを介した炎症を活性化することを見出し、VNUTがNASH発症に促進的に働いていることが推察された。VNUTを介したプリン作動性化学伝達によるNASH発症メカニズムの解明は有効な治療法の乏しいNASHの新たな治療薬開発へ繋がること期待される。また、申請者はクロドロン酸が細胞レベルだけでなく、マウス個体レベルでVNUT阻害作用を持ち、糖代謝を改善することを既の実証しており、引き続きVNUT阻害薬のNASH治療薬としての蓋然性を生体レベルで検証することは今後の医療の発展に貢献できると考えられた。

研究成果の概要(英文):ATP is accumulated and stored within the secretory vesicles by Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) and is released by several stimulation. Exocytotic release of ATP leads to purinergic chemical transmission. The purpose of this research was to clarify the role and the molecular mechanism of purinergic chemical transmission in the development of Non-alcoholic steatohepatitis (NASH). We revealed that glucose and apoptosis stimulate ATP secretion from the hepatocytes and macrophages. Released ATP induces and sustains the inflammation through purinergic chemical transmission and these reactions are depending on the function of VNUT. These results suggest that purinergic chemical transmission might promote the development of NASH and VNUT could be a new therapeutic target for NASH.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：Purinergic signaling VNUT NASH

1. 研究開始当初の背景

プリン化合物である ATP は細胞内で合成され、細胞共通のエネルギー通貨として働くと同時に、細胞外に放出され細胞間情報伝達物質として働く。放出された ATP は速やかに ADP, AMP, アデノシンへと代謝を受け、それぞれが対応するプリン受容体に結合し**プリン作動性化学伝達**を惹起する。神経内分泌細胞において、ATP はその分泌小胞内に貯蔵され、栄養環境の変化が刺激となりホルモンと共に開口放出される (引用文献①)。申請者はホルモンとともに細胞外へ分泌される ATP の働きを明らかにするため、分泌小胞内に ATP などのヌクレオチドを運ぶ輸送体である **Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT)** に着目した (引用文献②)。VNUT は ATP

などのヌクレオチドを分泌小胞内へ充填し、引き続く分泌を担っていると考えられ、その破壊はプリン作動性化学伝達を遮断すると予想された (図 1)。申請者らは VNUT 欠損マウスを作製し、プリン作動性化学伝達がインスリン分泌および糖代謝に与える影響を解析した (引用文献③)。その結果、VNUT はインスリン分泌および肝臓のインスリンシグナル調節を介して血糖値を上昇させる働きがあり、**VNUT は糖尿病の新たな治療ターゲットになると**考えられた。そこで申請者らは VNUT が肝臓のインスリンシグナル調節を担っていることに着目し、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 発症に肝臓での小胞分泌を介したプリン作動性化学伝達が関与している可能性を検証するため、VNUT 欠損マウスへの HFD 負荷実験を行った。野生型マウスの肝臓では炎症・線維化などの NASH 様変化がみられたが、VNUT 欠損マウスの肝臓では炎症細胞浸潤や線維化は有意に抑制され、IL-1 β などの炎症性サイトカイン発現が低下 (引用文献④) しており、VNUT を介したプリン作動性化学伝達は NASH 発症を促進することが示唆された。しかしながら炎症の起点となる ATP を小胞分泌する肝臓内の細胞やその分泌刺激、小胞分泌された ATP が制御するマクロファージの機能、NASH 発症過程でどの時期に分泌された ATP が NASH 発症に影響しているのかは不明であった。

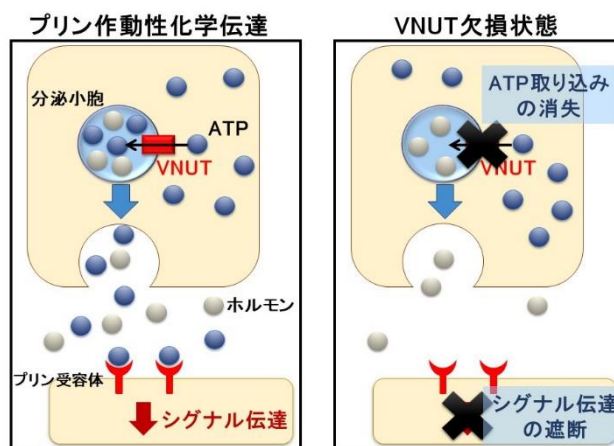


図1 小胞分泌を介したプリン作動性化学伝達

したプリン作動性化学伝達が関与している可能性を検証するため、VNUT 欠損マウスへの HFD 負荷実験を行った。野生型マウスの肝臓では炎症・線維化などの NASH 様変化がみられたが、VNUT 欠損マウスの肝臓では炎症細胞浸潤や線維化は有意に抑制され、IL-1 β などの炎症性サイトカイン発現が低下 (引用文献④) しており、VNUT を介したプリン作動性化学伝達は NASH 発症を促進することが示唆された。しかしながら炎症の起点となる ATP を小胞分泌する肝臓内の細胞やその分泌刺激、小胞分泌された ATP が制御するマクロファージの機能、NASH 発症過程でどの時期に分泌された ATP が NASH 発症に影響しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

神経内分泌細胞において、VNUT を介して分泌小胞内に取り込まれた ATP は、ホルモンと同様の制御を受け細胞外に分泌され、プリン作動性化学伝達を惹起する。本研究では VNUT 欠損マウスを用いて、肝臓での小胞分泌を介したプリン作動性化学伝達が NASH 発症過程で果たす役割を明らかにすることを目的とする。栄養環境の変化により起動されるプリン作動性化学伝達が炎症を惹起するメカニズムを明らかにし、NASH 治療薬の創薬へ向けた新たな分子基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞とマクロファージにおける VNUT 依存性 ATP 分泌刺激の探索

各細胞からの ATP 分泌を評価するため、野生型および VNUT 欠損マウスから単離した初代培養肝細胞 (MPH) および骨髄由来マクロファージ (BMDM) にグルコースおよび脂肪酸を添加し、ATP 分泌量を定量した。アポトーシス時の ATP 分泌に際して VNUT の関与を検証するため、各マウスから単離した MPH に対して薬剤 (TNF α /ACTD およびアセトアミノフェン) を負荷することでアポトーシスを誘導し、ATP 分泌量を定量した。

(2) マクロファージの遊走能と食食能に関する解析および炎症を惹起する細胞外 ATP を分泌する細胞の同定

各マウスより採取した骨髄前駆細胞に L929 細胞培養上清を添加・培養し、BMDM に分化誘導し、実験に用いた。Transwell[®]を用いて、BMDM の遊走実験を施行した。肝細胞からの分泌因子がマクロファージの遊走に与える影響を明らかにするため、グルコース刺激後に採取した MPH の上清および ATP をウェル (インサート下方) に添加し、蛍光顕微鏡を用いてインサート内からインサート底面に遊走した BMDM の数を計測した。

次に BMDM に LPS を添加し、炎症性マクロファージへの分化誘導率および炎症性サイトカインの mRNA 発現を解析した。さらに食食能の評価のために BMDM に LPS を添加後の培養液中に蛍光マイクロスフェアを添加し、マイクロスフェアを食食した細胞数を FACS により計測した。

(3) 個体レベルで NASH を惹起する細胞外 ATP を分泌する細胞の同定

野生型および VNUT 欠損マウスに HFD もしくはより炎症惹起作用の強いウエスタンダイエット (WD) を負荷し、病理組織学的解析を行った。尚、申請者らが作成した VNUT 欠損マウスは全身で VNUT を欠損したマウスであるため、炎症を惹起する細胞外 ATP を分泌する細胞やその分泌刺激を個体レベルで評価するには限界がある。そこで、野生型および VNUT 欠損マウス骨髄に 7.5Gy の X 線照射後に各マウスから採取した骨髄液を移植することにより、BMDM のみで VNUT を欠損したマウスと肝臓 (BMDM 以外) で VNUT を欠損したマウスを作成することとした。これらのマウスに WD を負荷し、炎症の状態を解析することとした。

また、アセトアミノフェンによる薬剤性肝障害モデルを用いて肝臓の炎症細胞浸潤、アポトーシス等について病理組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肝細胞とマクロファージにおける VNUT 依存性 ATP 分泌刺激の探索

野生型マウスおよび VNUT 欠損マウスから単離した MPH に高濃度グルコースを負荷したところ負荷 10 分後を頂値とし、ATP 分泌は低下傾向となったが、VNUT 欠損マウスでは野生型と比較して有意に ATP 分泌は低下していた。さらに TNF α /ACTD およびアセトアミノフェンを MPH 培養上清に添加し、アポトーシスを誘導したところ、野生型 MPH では 10 分後を頂値とし ATP 分泌が誘導されたが、VNUT 欠損マウス由来の MPH では野生型と比較して ATP 分泌が低下していた。

また、肝細胞と同様に野生型 BMDM では高濃度グルコース負荷により ATP 分泌が促進されたが、VNUT 欠損 BMDM では ATP 分泌が低下していた。

尚、脂肪酸(オレイン酸、パルミチン酸)負荷実験も施行したが、測定系への影響が大きく ATP 分泌の評価が困難であった。

以上の結果から過栄養状態を模倣した高濃度グルコースによる刺激下において肝細胞および BMDM からの ATP 分泌が促進され、薬剤性アポトーシス条件下においても肝細胞からの ATP 分泌が促進されることが明らかとなり、いずれの反応も VNUT 依存的であると考えられた。

(2) マクロファージの遊走能と食食能に関する解析および炎症を惹起する細胞外 ATP を分泌する細胞の同定

当初は Transwell[®]を用いて、BMDM の遊走能を解析したが、BMDM の Transwell[®]からの非遊走細胞の除去や蛍光顕微鏡での細胞数計測におけるばらつきが大きく評価が困難であった。そのため、400-700 nm の光の透過を遮断する PET メンブレンを用いて、下方励起下方測光型蛍光 plate reader による遊走細胞の計測を今後予定している。

また、BMDM への LPS 添加により、BMDM に占める炎症性マクロファージの割合は有意に上昇し、さらに ATP 濃度依存性にマクロファージ数の増加がみられたが、野生型および VNUT 欠損 BMDM 間で有意な変化は認めなかった。また、炎症性サイトカインである TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12 p35、IL-12 p40 の発現は LPS 負荷 6 時間後に野生型 BMDM では増加したが、VNUT 欠損 BMDM では野生型と比較して低下傾向となっていた(図 2)。さらに VNUT 欠損 BMDM において低下がみられた IL-1 β 、IL-6、IL-12 p35、IL-12 p40 の発現は ATP 添加により濃度依存的に増加傾向となった。また、食食実験では野生型では LPS 刺激により蛍光マイクロスフェアを食食した細胞は減少し、さらに ATP 濃度依存性に食食細胞数は減少傾向となった。一方、VNUT 欠損 BMDM では野生型と比べ食食細胞数は増加傾向となっていた。

以上の結果から ATP は炎症性マクロファージへの分化を誘導し、炎症性サイトカイン増加および食食作用を減じることで、炎症の持続に関与している可能性が示唆された。

(3) 個体レベルで NASH を惹起する細胞外 ATP を分泌する細胞の同定

長期間の HFD 負荷により野生型マウスの肝臓では炎症・線維化などの NASH 様変化がみられたが、VNUT 欠損マウスの肝臓では炎症・線維化が有意に抑制され、炎症性サイトカインの発現も低下していた(引用文献④)。一方で、HFD および WD 摂餌 12 週間後に肝臓を採取し、組織学的評価を行ったが、野生型および VNUT 欠損マウスの F4/80 陽性細胞数、ALT 値に有意な差は認めず、HE 染色では肝組織での炎症所見が乏しかったため、NASH の評価は HFD、WD 摂餌 12 週では困難と考えられた。さらに野生型マウスへ WD 20 週負荷後においても肝臓の炎症は軽度であり、VNUT 欠損マウスへの骨髄移植実験では肝臓の炎症の評価には長期間必要と考えられたため、より短期間で NASH 様変化を解析可能な NASH モデルマウスである MC4R

※LPS投与3時間後のWTを1としたときの相対値

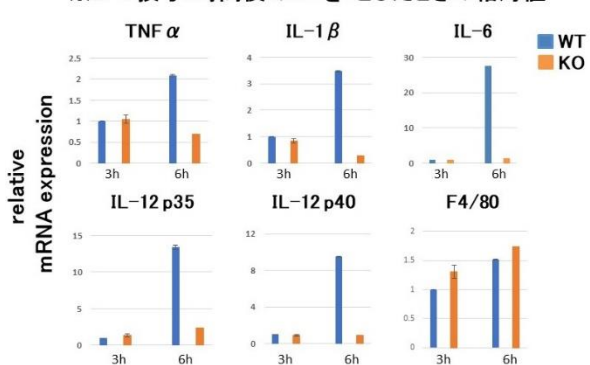


図2 LPS投与後のBMDMにおける炎症性サイトカイン発現

欠損マウスを用いることとした。MC4R 欠損マウスおよび野生型マウスへ VNUT 欠損マウスおよび野生型マウス由来の骨髄細胞をそれぞれ移植し、これら 4 群のマウスに WD 負荷を行った。4 群とは具体的に①野生型マウスかつ野生型マウス由来の骨髄②野生型マウスかつ VNUT 欠損マウス由来の骨髄③MC4R 欠損マウスかつ野生型マウス由来の骨髄④MC4R 欠損マウスかつ VNUT 欠損マウス由来の骨髄である。予備実験において野生型マウスに GFP マウスの骨髄細胞を移植後の骨髄における GFP 陽性細胞の占める割合は 92.6%であった。WD 負荷後 8 週の時点で MC4R 欠損マウス (③、④) は野生型マウス (①、②) と比較して摂餌量が多く、体重増加がみられ、ALT 値も高値であったが、移植した骨髄細胞間 (①と②、③と④の比較) では有意な変化は認めなかった。病理組織学的評価及びマクロファージの解析等は MC4R が NASH 様変化を来すとされる WD 負荷後 20 週時点で予定している。

また、アセトアミノフェンを野生型および VNUT 欠損マウスに投与したところ、肝臓における F4/80 陽性細胞数および TUNEL 陽性細胞数は野生型と比較して VNUT 欠損マウスで減少していた。

以上の結果から、高濃度グルコース等の刺激により VNUT を介して肝細胞および BMDM から分泌された ATP (図 3 内 ①) はそれぞれ傍分泌および自己分泌機構を介して炎症性マクロファージへの分化を誘導し、炎症性サイトカイン増加により炎症を活性化することが示唆された。さらに炎症の活性化は肝細胞のアポトーシスを誘導し、肝細胞からのさらなる ATP の分泌 (図 3 内②) を促し炎症を増悪・持続させるというプリン作動性化学伝達による新たな炎症誘導機序が想定された (図 3)。さらに細胞外 ATP は食作用を減じることで、肝臓における炎症の持続に関与している可能性が示唆された。

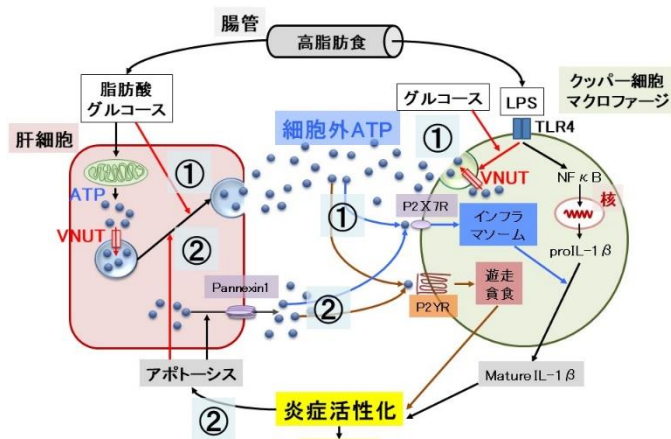


図3 プリン作動性化学伝達によるNASH発症機序仮説

今後はより詳細なメカニズムの解明のため細胞および個体レベルでの上記検証を継続する。尚、メチオニン・コリン欠乏食および高脂肪・高コレステロール食負荷による NASH および薬剤性急性肝障害モデルマウスに VNUT 阻害薬であるクロドロン酸の投与が有効であったことが報告されており (引用文献⑤)、上記仮説に矛盾しない結果であった。申請者も上記 in vitro および in vivo の実験においてクロドロン酸の有効性を検証する。

<引用文献>

- ① Clintoria RW, Juan LC, Kathleen H. Berecek, Erik MS. Extracellular ATP and zinc are co-secreted with insulin and activate multiple P2X purinergic receptor channels expressed by islet beta-cells to potentiate insulin secretion. **Purinergic Signal.** 4(4):393-405, 2008
- ② Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. Identification of a vesicular nucleotide transporter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 105(15):5683-6, 2008
- ③ Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, Shibata A, Uneyama H, Takayanagi R, Yamamoto A, Omote H, Nomura M, Moriyama Y. Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. **Sci. Rep.** 4:6689, 2014
- ④ Tatsushima K, Hasuzawa N, Wang L, Hiasa M, Sakamoto S, Ashida K, Sudo N, Moriyama Y, Nomura M. Vesicular ATP release from hepatocytes plays a role in the progression of nonalcoholic steatohepatitis. **Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.** 1867(3):166013, 2021
- ⑤ Hasuzawa N, Tatsushima K, Wang L, Kabashima M, Tokubuchi R, Nagayama A, Ashida K, Ogawa Y, Moriyama Y, Nomura M. Clodronate, an inhibitor of the vesicular nucleotide transporter, ameliorates steatohepatitis and acute liver injury. **Sci. Rep.** 11(1):5192, 2021

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 Tatsushima Keita, Hasuzawa Nao, Wang Lixiang, Hiasa Miki, Sakamoto Shohei, Ashida Kenji, Sudo Nobuyuki, Moriyama Yoshinori, Nomura Masatoshi	4. 巻 1867
2. 論文標題 Vesicular ATP release from hepatocytes plays a role in the progression of nonalcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166013 ~ 166013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2020.166013	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 Yukina Takeichi, Takashi Miyazawa, Shohei Sakamoto, Yuki Hanada, Lixiang Wang, Kazuhito Gotoh, Keiichiro Uchida, Shunsuke Katsuhara, Ryuichi Sakamoto, Takaya Ishihara, Keiji Masuda, Naotada Ishihara, Masatoshi Nomura, Yoshihiro Ogawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Non-alcoholic fatty liver disease in mice with hepatocyte-specific deletion of mitochondrial fission factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetologia	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) 10.1007/s00125-021-05488-2	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------