

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16152

研究課題名（和文）PPAR による炎症性エクソソーム制御を介した抗炎症作用の分子基盤解析

研究課題名（英文）Analysis of anti-inflammatory effect of exosome regulated by PPAR α

研究代表者

谷貝 知樹 (Yagai, Tomoki)

名古屋大学・環境医学研究所・特任講師

研究者番号：50868669

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）：本事業では4年間の助成期間で、肝脂質代謝主要制御因子PPAR が間接的に制御していると予測された炎症性の細胞外小胞の性質と生理的機能に注目し解析を行なった。マウス初代培養肝細胞に対してPPAR を活性化させ、細胞外小胞を回収し、骨髄由来マクロファージ等に添加し炎症の惹起を解析した。また、PPAR が転写制御する細胞外小胞分泌の調節因子を解析するため、当該調節因子の遺伝子座におけるPPAR 結合モチーフを欠損したノックアウトマウスを作製し解析した。これにより肝臓におけるNAFLD/NASH増悪化におけるPPAR を介した増悪化メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本事業は非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）および非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の増悪化因子と考えられる細胞外小胞の分子基盤を明らかにする研究である。近年NAFLDは我が国で健康診断を受診する患者の3割が罹患している疾患であり、NAFLD患者の2割は慢性炎症を伴った状態であるNASHである。非常に膨大な患者数が存在するにもかかわらず、NAFLDがどのようにNASHへと増悪化するのか分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。本事業では細胞外小胞がこの病態の増悪化に関わる可能性を示すことで、治療標的としての可能性を見いだした。

研究成果の概要（英文）：By the JSPS grant, inflammatory extracellular vesicles (EVs) regulated by hepatic PPAR were analyzed. PPAR in the liver is a master regulator of hepatic lipid metabolism, and our preliminary data suggested that PPAR might regulate EVs secretion having roles in NAFLD/NASH aggravation. EVs were harvested from PPAR-activated mouse primary hepatocytes and added to bone marrow-derived macrophages, showing inflammatory activation in the cells. To analyze transcriptional regulation for an EVs secretion regulator, a knockout mouse lacking the PPAR binding motif in the regulator gene locus was generated. The knockout mouse showed that PPAR activation does not repress the expression of EVs secretion regulator, meaning the motif is critical for the regulation.

研究分野：病態医化学

キーワード：肝臓 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体において最大の臓器の一つであり、恒常性維持のために様々な生化学反応が行われているが、近年先進国において食事の高カロリー化や運動不足等の深刻化により肝臓を起点とした生活習慣病を罹患する患者が増加している。例えば我が国における NASH の有病率は 3～5%と深刻な状況である上、300万人以上の糖尿病患者がいる。糖尿病の発症は肝臓の糖代謝やホルモン分泌能の破綻が深く関与しており、肝臓の生化学的・代謝学的基礎研究は今後のこれら代謝性疾患の治療戦略の開発に大きく寄与する可能性がある。

近年、核酸やタンパク質、脂質などを内包し細胞外へと排出される小胞の存在が注目を集めている。その小胞はエクソソームと呼ばれ、排出されたエクソソームを受け取った細胞は様々な生理状態の変化が起きる上、病態への関与も報告されている。エクソソームは分泌する細胞の特性や生理状態を反映し、脂質を内包するのみならず、エクソソーム自身が脂質で出来ており、申請者は肝脂質代謝とエクソソーム産生の関係性に興味を持った。肝臓の糖や脂質代謝に関連した酵素の発現を制御する主要制御因子の一つとして、**Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α)**という核内受容体がある。PPAR α は肝細胞に豊富に発現しており、取り込まれた脂肪酸が結合することで活性化し、糖・脂質代謝関連遺伝子の転写を制御する。PPAR α が制御する脂肪酸酸化経路は肝臓に蓄積した脂肪の代謝を促すことから、PPAR α およびその関連遺伝子がエクソソーム産生やエクソソームに内包される脂質を制御する可能性が考えられた。さらに近年、PPAR α の選択的アゴニストの投与が肝臓における炎症性サイトカインの分泌を抑制することが明らかとなっている一方で、そのメカニズムには謎が多い。PPAR α がエクソソームの産生に関わるのであれば、それらエクソソームが肝細胞 - マクロファージ間の炎症シグナルにも関わる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前項であげた学術的問いを実験病理学的に明らかにすることである。すなわち、遺伝子改変マウスや初代培養肝細胞、細胞株等を用いて PPAR α 経路による炎症性エクソソームの特徴と産生メカニズムを解析し、肥満・NASHモデルマウスの表現型とその変動を解析する。また臨床の糖尿病・代謝内科学研究室や東北メディカルメガバンクと連携し NASH および糖尿病患者の血清サンプル中のエクソソームの解析を行う。これにより新たな NASH・糖尿病の診断マーカーや治療標的の探索を行う。

本研究の学術的独自性と創造性の一つは、これまで不明であった肝臓における PPAR α による抗炎症作用の分子基盤をエクソソームという着眼点から解析し、NASH・糖尿病への寄与をメカニズムレベルで明らかにした上で、その臨床的な有用性までを検証する一貫したトランスレーショナル解析にある。特に NASH の病態は患者ごとに個人差があり通常の肝障害血清診断マーカーでは診断出来ないが、末梢血中からでも単離できるエクソソームが診断マーカーとして使用できれば NASH 診断における大きな進歩となる。また炎症性エクソソームの成分を標的とした薬剤も治療標的として有効である可能性があり、これら疾患の創薬研究に新たなブレークスルーをもたらしうると考えている。

3. 研究の方法

本研究では前項で記述した解析を行うために Albumin promoter 制御下 Cre リコンビナーゼ発現

(Alb-Cre)マウスと PPAR α flox マウスを掛け合わせた肝細胞特異的 PPAR α ノックアウト (PPAR $\alpha^{\Delta\text{Hep}}$)マウスを用いる。Aim 1. まず *in vivo* において PPAR α が炎症性エクソソームの分泌と NASH・糖尿病の増悪化に関わっている可能性を検証するため、これらマウスに対して高脂肪高コレステロール飼料を与え表現型を解析する。PPAR α が炎症性エクソソームの分泌を抑制するのであれば、PPAR $\alpha^{\Delta\text{Hep}}$ マウスは野生型マウスと比較して炎症性エクソソームの分泌が増加し、脂肪肝から NASH への移行およびインスリン抵抗性が増悪化すると考えられる。一方で野生型マウスでは炎症性エクソソーム分泌が減少し、NASH への移行およびインスリン抵抗性は相対的に改善すると予想される。この予測に基づき、Insulin tolerance test や Glucose tolerance test によりこれらマウスの糖・インスリンの感受性解析を行う。また炎症性マーカー遺伝子の発現解析、肝灌流法による肝マクロファージの単離・FACS 解析等により肝臓における炎症の増悪度を解析する。

Aim 2. 次に PPAR α 経路によって産生される炎症性エクソソームの特性を解析する。PPAR α は脂質代謝を制御しており、脂質成分の変化が炎症を惹起するトリガーになっている可能性に焦点を当てる。先述の肥満・NASH モデル PPAR $\alpha^{\Delta\text{Hep}}$ マウスの肝臓や血清あるいは初代培養肝細胞の培養上清からエクソソームを採取、骨髄由来マクロファージの培地に添加し、炎症性マーカーを定量することでこれらエクソソームの炎症惹起能を解析する。さらに炎症性エクソソームに含まれる脂質を LC-MS などのリポドミクス解析により明らかにする。この解析は NASH や糖尿病患者の血清サンプルから採取されたエクソソームに対しても行われ、比較解析することでヒトにおける NASH の診断マーカー、そして NASH・糖尿病の治療標的候補を探索する。

Aim 3. PPAR α のエクソソーム分泌に対する抑制メカニズムは、ゲノムレベルで二つの可能性が考えられる。すなわち、エクソソーム分泌を制御する他の転写因子に直接結合し干渉する抑制メカニズム(Trans-acting repression)、そして標的遺伝子座のゲノム領域に結合することでプロモーター活性を抑制するメカニズム(Cis-acting repression)である。申請者はすでに野生型マウス肝臓における PPAR α を対象とした ChIP-seq 解析を行い、マウスゲノム上の PPAR α 結合領域を把握している。さらにデータベース上の Pol II 等の ChIP-seq データと比較解析することで、エクソソーム分泌関連遺伝子座周囲の PPAR α 制御領域とを予測する。そしてこれらの領域をルシフェラーゼアッセイに供することで、PPAR α による転写抑制が Trans 型や Cis 型による直接制御であるか確認する。また、予備実験ではメトフォルミンがエクソソーム分泌を抑制しており、PPAR α の発現抑制メカニズムに関わることが示唆されている。初代培養肝細胞を用いたこのルシフェラーゼアッセイ時にメトフォルミンや PPAR α の選択的アゴニストを添加することでエクソソーム分泌関連遺伝子に対する制御領域の違いや抑制レベルを解析する。

4. 研究成果

本研究課題では PPAR α 経路によって制御されるエクソソーム制御関連遺伝子の同定に成功した。また、その遺伝子座における PPAR α 結合領域を欠損したノックアウトマウスの作製に成功した。作成したノックアウトマウスでは PPAR α を活性化させてもエクソソーム分泌関連遺伝子の発現量は抑制されず、PPAR α が転写制御レベルでエクソソームの分泌を制御していることが明らかになった。さらに当該ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して NASH の増悪化がみられなかったことから、NAFLD において分泌されるエクソソームは炎症性に関わる可能性が示された。

一方で、NASH モデルマウスや脂肪毒性を誘導した初代培養肝細胞からエクソソームを単離す

るのは DAMPs やアポトーシス小体との区別が難しく、純度の高いエクソソームの解析が困難であることが明らかとなった。今後はエクソソームの精製法を検討することで、その生理機能の解析につなげていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yagai Tomoki, Nakamura Takahisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Mechanistic insights into the peroxisome proliferator-activated receptor alpha as a transcriptional suppressor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	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/fmed.2022.1060244	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 該当する
1. 著者名 Aibara Daisuke, Takahashi Shogo, Yagai Tomoki, Kim Donghwan, Brocker Chad N., Levi Moshe, Matsusue Kimihiko, Gonzalez Frank J.	4. 巻 25
2. 論文標題 Gene repression through epigenetic modulation by PPARA enhances hepatocellular proliferation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104196 ~ 104196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104196	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 該当する
1. 著者名 Yan Tingting, Yan Nana, Wang Hong, Yagai Tomoki, Luo Yuhong, Takahashi Shogo, Zhao Min, Krausz Kristopher W, Wang Guangji, Hao Haiping, Gonzalez Frank J	4. 巻 181
2. 論文標題 FXR-Deoxycholic Acid-TNF- Axis Modulates Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 273 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfab027	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 該当する
1. 著者名 Yagai Tomoki, Yan Tingting, Luo Yuhong, Takahashi Shogo, Aibara Daisuke, Kim Donghwan, Brocker Chad N., Levi Moshe, Motohashi Hozumi, Gonzalez Frank J.	4. 巻 36
2. 論文標題 Feedback repression of PPAR signaling by Let-7 microRNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109506 ~ 109506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109506	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 該当する

1. 著者名 Fan Shicheng, Gao Yue, Qu Aijuan, Jiang Yiming, Li Hua, Xie Guomin, Yao Xinpeng, Yang Xiao, Zhu Shuguang, Yagai Tomoki, Tian Jianing, Wang Ruimin, Gonzalez Frank J., Huang Min, Bi Huichang	4. 巻 75
2. 論文標題 YAP TEAD mediates PPAR α -induced hepatomegaly and liver regeneration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 74 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.32105	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 該当する

〔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
---------	---------