

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461001

研究課題名(和文)肝細胞の生存・増殖・分化・脂肪毒性における脂肪組織の役割とその制御機構

研究課題名(英文) Roles of adipose tissue in survival, proliferation, differentiation and lipotoxicity of hepatocytes

研究代表者

西島 亜紀(Nishijima, Aki)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40566105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、内臓脂肪組織は皮下脂肪組織と比し、肝細胞のアポトーシス、脂肪滴蓄積を促進し、増殖、機能分化を抑制することが明らかとなった。すなわち、内臓脂肪組織が特異的に肝細胞の脂肪毒性を誘導した。この結果は、内臓脂肪蓄積を基盤とするメタボリック症候群が非アルコール性脂肪性肝疾患を発症しやすいという臨床データを支持するものである。肝細胞の脂肪毒性は液性因子を介して誘導され、パルミチン酸が部分的に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research has shown that visceral, but not subcutaneous adipose tissue promotes apoptosis and lipid droplet deposition of hepatocytes together with the inhibition of the growth and differentiation. That is, visceral adipose tissue promotes lipotoxicity of hepatocytes. Our results support the clinical finding that metabolic syndrome based on visceral fat accumulation is closely associated with non-alcoholic fatty liver disease. Our study has demonstrated that the free fatty acid palmitate may be involved in the lipotoxicity of hepatocytes partially.

研究分野：医学、病理学、肝臓病学

キーワード：脂肪毒性 脂肪組織 肝細胞 アポトーシス NAFLD

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、脂肪肝 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 肝線維症 肝硬変へと進行する病態を包括し、肝細胞癌にも進展しうる疾患である。NAFLD は肥満人口の増加とともに日本を含め世界的に増加しており、その対策は急務の課題である。近年、皮下、内臓脂肪組織の増加を基盤とする肥満、メタボリック症候群は NAFLD の発症・病態に深く関与している (Gastroenterology 142:711-25, 2012)。それ故に、上記脂肪組織が肝細胞の生存、増殖、分化や NAFLD の発症・病態に活発に影響していると予想される。しかし、脂肪組織が肝細胞に与える直接的な影響を解析した研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。

これまで、脂肪組織を培養することは困難であった。我々は、初めて脂肪組織のコラーゲン器官培養系を確立し、脂肪組織の長期維持や、脂肪酸、レプチン、アディポネクチンなどのアディポカインを活発に産生することを見出した (Sonoda, Toda et al. Endocrinology 149:4794-4798, 2008)。さらに、腎尿細管上皮 脂肪組織解析モデルを考案し、脂肪組織が尿細管上皮の極性化、機能分化、グリコーゲン産生を促進し、細胞死を抑制すること (Udo, Uozumi et al. Kidney Int 78:60-8, 2010) や、尿細管上皮が脂肪組織からのアディポネクチン産生を促進することを見出した。以上の研究により、脂肪組織が肝細胞に与える直接的な影響を解析することが初めて可能となった。

近年、肥満や糖尿病などのメタボリック症候群において、肝細胞の異所性脂肪蓄積が脂肪毒性を誘導し、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症・病態に深く関与していることが示唆されている (Hepatology 52:774-88, 2010)。HepG2 肝細胞株を用いた我々の予備実験でも、内臓脂肪組織 (VAT)

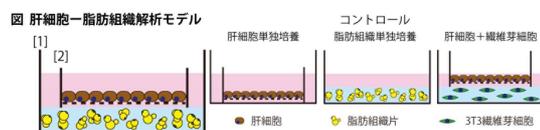
が肝細胞の脂肪蓄積、細胞死を促進する。それ故に、VAT が肝細胞に脂肪毒性を誘導することが予想されるが、その詳細は不明である。さらに、皮下脂肪組織 (SAT) の影響も不明であり、肝細胞 脂肪組織解析モデルを用いた肝細胞脂肪毒性の研究は国内外に報告はなく、その詳細は不明である。

以上の背景に基づいて、肝細胞の生存、増殖、分化、脂肪毒性における脂肪組織の役割とその制御機構を解明する本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、肝細胞 - 脂肪組織 (皮下、内臓) 解析モデル (図) を用いて、以下の点を明らかにする。

- 1) SAT および VAT が、肝細胞のアポトーシス、増殖、分化に与える影響とその相違を解明する。
- 2) SAT および VAT が、肝細胞の脂肪蓄積に伴う脂肪毒性に与える影響とその相違を解明する。脂肪毒性機構として、脂肪酸輸送分子、酸化ストレス・小胞体ストレス分子、アディポカイン、脂肪酸、アディポソーム (Adiposome) を解析し、脂肪毒性制御因子を明らかにする。
- 3) 上記 1) 2) の肝細胞 - 脂肪組織相互作用の仲介因子を同定する。



## 3. 研究の方法

1) 材料: 肝細胞: HepG2 肝細胞、RL-34 肝細胞、およびラットから単離した肝細胞を用いる。脂肪細胞組織: 5-6 週齢 Wistar rat およびヒト (学内倫理委員会の許可症例) の SAT/VAT を細切した脂肪組織片を用いる。

2) 培養システム：肝細胞 - 脂肪組織解析モデルを用いる (図)。外皿 [1] に、0.5-1 mm 径に細切した脂肪組織片 (0.5 ml) を 5 ml の I 型コラーゲングル内に包埋し、1 日間培養する。同時に、コラーゲンでコーティングした底面がニトロセルロース膜から成る内皿 [2] に、肝細胞 (50 万個) を播種し 1 日間培養する。その後、内皿 [2] を、外皿 [1] に入れて、培養する。対照は、肝細胞や脂肪組織の単独培養である。脂肪組織が肝細胞に与える影響の特異性を検証するために、外皿 [1] に 3T3 線維芽細胞を培養した系で、内皿 [2] に肝細胞を培養する。培養 0.5, 1, 2, 4, 6 日で、肝細胞 - 脂肪組織解析モデルで再現された現象を、ホルマリン及びグルタルアルデヒド固定切片、細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて、以下のように解析する。

3) 肝細胞の生存、増殖、分化に関する解析：肝細胞のアポトーシスを Cleaved caspase-3 の免疫染色と CK-18 fragments (M30 Apotosense®) の ELISA で、増殖を Ki67 の免疫染色で、構造分化をミトコンドリア、粗面・滑面小胞体、ゴルジ装置の形成を指標に透過電顕で、機能分化をアルブミンの real-time RT-PCR で、アンモニア除去能をアンモニアテスト (Wako) で、ATP 産生を ATP assay キットで比較検討する。以上により、SAT/VAT が、肝細胞の生存、増殖、構造・機能分化に与える影響とその相違を解明する。

4) 肝細胞の脂肪滴蓄積、脂肪酸輸送・酸化ストレス・小胞体ストレス分子の解析：肝細胞の脂肪滴蓄積をオイルレッド O 染色と透過電顕、adipophilin, perilipin 免疫染色を用いて検討する。脂肪酸を細胞内に取り込む脂肪酸輸送分子を FATP-2, -5, CD36 免疫染色で検討する。脂肪蓄積に伴うストレス応答として、セラミドの発現や酸化ストレス分子 (8-OHdG, 4-HNE, NFkB, ERK-1/2, p38, SOD)、小胞体ストレス分子 (IRE1 $\alpha$ , JNK, PERK,

eIF2 $\alpha$ , ATF6 $\alpha$ ,  $\beta$ ) の発現を、免疫組織化学、Western blot で比較検討する。以上により、SAT/VAT が肝細胞の脂肪蓄積、脂肪毒性や脂肪酸輸送・酸化ストレス・小胞体ストレス分子の発現に与える影響とその相違を明らかにする。

5) 脂肪組織のアディポカイン・脂肪酸・アディポソーム産生の解析：培養液中のアディポカイン (adiponectin, leptin, resistin, TNF- $\alpha$ ) を ELISA キットで、遊離脂肪酸 (FFA) をガスクロマトグラフィーで測定する。また、炎症性疾患や癌と密接に関与する脂肪細胞が分泌する機能性膜小胞であるアディポソームの産生を、超遠心法および CD63 の Western blot にて解析する。

6) 上記 5) により予想される候補因子や、cDNA microarray による網羅的遺伝子解析により同定した候補遺伝子の蛋白とその阻害因子の投与実験により、SAT/VAT 誘導性の肝細胞の細胞動態制御因子や、脂肪毒性促進因子および防御因子を同定する。

#### 4. 研究成果

1) 肝細胞株 (ヒト HepG2 およびラット RL34) と SAT/VAT (ラット/ヒト) との共培養を行うと、VAT のみが肝細胞のアポトーシスを促進し、増殖を抑制した。

2) 脂肪組織との共培養により肝細胞内に脂肪滴が蓄積しており、脂肪滴数は、SAT と比較し VAT との共培養時に有意に多かった。

3) 上記 1) 2) の結果は、VAT が特異的に肝細胞に脂肪毒性を誘導することを示している。

4) 脂肪組織片の培養上清を肝細胞単層培養に投与すると、VAT の培養上清のみが肝細胞の脂肪毒性を誘導した。すなわち、VAT 特異的な肝細胞の脂肪毒性は、液性因子が仲介していることが示唆された。

5 )VAT特異的な肝細胞の脂肪毒性機構には、アディポカインであるアディポネクチン、レプチン、レジスチン、TNF $\alpha$ の関与は明瞭ではない。遊離脂肪酸のうち、パルミチン酸 (PA) が部分的に関与していることが示唆されたが、PA 誘導性の脂肪毒性と VAT 誘導性の脂肪毒性には形態学的に相違があった。

6 )cDNA microarray による網羅的遺伝子解析により候補遺伝子を模索し、PTGR1 の発現について解析を行ったが、肝細胞の脂肪毒性機構への関与は明瞭ではなかった。

7 ) SAT/VAT 産生 adiposome を超遠心法にて回収したが、ごく微量により十分な解析が行えなかった。

8 ) ラット由来初代培養肝細胞を単離し、肝スフェロイドを形成し、SAT/VAT との共培養を試みたが、形態学的に明らかな差異は認められなかった。

以上のように、脂肪組織と肝細胞の明瞭な相互作用が解析された。VAT は肝細胞に特異的に脂肪毒性を誘導する。肝細胞の脂肪毒性には、アディポネクチンやレプチンの関与は乏しく、パルミチン酸が部分的に関与していることが示唆された。この研究結果は、内臓脂肪蓄積を基盤としたメタボリック症候群において、肝細胞の異所性脂肪蓄積が脂肪毒性を誘導し、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症・病態に関与するという臨床データを支持するものであり、さらに本研究は、非肥満状態でも、SAT より VAT が脂肪毒性を誘導しやすいことを示した初めての報告である。本解析モデルを応用することで、NAFLD の病態生理を解明する有用なツールになると期待される。

5 . 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } ( 計 10 件 )

1. Nakayama A, Aoki S, Uchihashi K, Nishijima-Matsunobu A, Yamamoto M, Kakihara N, Iwakiri R, Fujimoto K, Toda S. Interaction between esophageal squamous cell carcinoma and adipose tissue in vitro. *Am J Pathol.* 186(5) 1180-1194, 2016 査読有り

DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.01.003

2. Kawasaki-Nanri M, Aoki S, Uchihashi K, Yamamoto M, Udo K, Nishijima-Matsunobu A, Kakihara N, Noguchi M, Uozumi J, Toda S. Differential effects of adipose tissue stromal cells on the apoptosis, growth and invasion of bladder urothelial carcinoma between the superficial and invasive types. In Press. *Int J Urol*, 2016 査読有り

DOI: 10.1111/iju.13086

3. Tanaka T, Kitajima Y, Miyake S, Yanagihara K, Hara H, Nishijima-Matsunobu A, Baba K, Shida M, Wakiyama K, Nakamura J, Noshiro H. The apoptotic effect of HIF-1 $\alpha$  inhibition combined with glucose plus insulin treatment on gastric cancer under hypoxic conditions. *PloS one*, 10(9) e0137257, 2015 査読有り

DOI: 10.1371/journal.pone.0137257

4. Kamachi K, Kojima K, Nishijima A, Takeshita M, Ando T, Kimura S. Small lymphocytic lymphoma presenting as bulky renal incidentaloma. *Int J Hematol.* 100(2) 107-108, 2014 査読有り

DOI: 10.1007/s12185-014-1609-8

5. Uchihashi K, Tsuruta T, Mine H, Aoki S, Nishijima-Matsunobu A, Yamamoto M, Kuraoka A, Toda S. Histopathology of tenosynovium in trigger fingers. *Pathology International.* 64(6) 276-282, 2014 査読有り

DOI: 10.1111/pin.12168

6. Aoki S, Takezawa T, Miyazaki-Oshikata A, Ikeda S, Nagase K, Koba S, Inoue T, Uchihashi K, Nishijima-Matsunobu A, Kakuhara N, Hirayama H, Narisawa Y, Toda S. Collagen

vitrigel membrane: a powerful tool for skin regeneration. *Inflammation and Regeneration*. 34(3) 117-123, 2014 査読有り

DOI:

<http://doi.org/10.2492/inglammregen.34.117>

7. Uchihashi K, [Nishijima-Matsunobu A](#), Matsuyama A, Yamasaki F, Tanabe T, Uemura T, Aragane N, Yakushiji M, Yamamoto M, Aoki S, [Toda S](#). Phosphaturic mesenchymal tumor, nonphosphaturic variant, causing fatal pulmonary metastasis. *Hum Pathol*. 44(11), 2614-2618, 2013 査読有り

DOI: 10.1016/j.humpath.2013.04.027.

8. [Nishijima-Matsunobu A](#), Aoki S, Uchihashi K, Fujimoto K, [Toda S](#). Three-dimensional culture model for analyzing crosstalk between adipose tissue and hepatocytes. *Cell Tissue Res* 352, 611-621, 2013 査読有り

DOI: 10.1007/s 00441-013-1588-8

9. Aoki S, Udo K, Morimoto H, Ikeda S, Takezawa T, Uchihashi K, [Nishijima-Matsunobu A](#), Noguchi M, [Toda S](#). Adipose tissue behavior is distinctly regulated by neighboring cells and fluid flow stress: a possible role of adipose tissue in peritoneal fibrosis. *J Artif Organs*. 16, 322-331, 2013 査読有り

DOI: 10.1007/s 10047-013-0702-8

10. Uchihashi K, Aoki S, [Matsunobu A](#), Ootani A, Node K, [Toda S](#). Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: A novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte. *Bone* 52 (1) 102-110, 2013 査読有り

DOI: 10.1016/j.bone.2012.09.001

〔学会発表〕(計 4 件)

[西島亜紀](#)、高橋宏和、[戸田修二](#)、江口有一郎．慢性肝疾患患者による脂肪組織と肝組織の病理学的検討．第 2 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 2015 年 05 月 23 日 シーモールパレス (山口県下関市)

[西島亜紀](#)、山本美保子、内橋和芳、青木茂久、大森泰文、杉原甫、[戸田修二](#)．肥大した成熟脂肪細胞径は肝の脂肪沈着と関連する．第 104 回日本病理学会総会 2015 年 05 月 02 日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[西島亜紀](#)、青木茂久、内橋和芳、山本美保子、[戸田修二](#)．肝細胞 脂肪組織相互作用解析モデルの確立．第 21 回肝細胞研究会、2014 年 06 月 27 日-28 日、東京医科歯科大学 (東京都文京区)

[西島亜紀](#)、青木茂久、内橋和芳、藤本一眞、[戸田修二](#)．脂肪組織 肝細胞相互作用解析モデルの確立．第 18 回アディポサイエンス・シンポジウム 2013 年 8 月 24 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
[西島 亜紀](#) (Nishijima-Matsunobu, Aki)  
秋田大学・医学(系)研究科・助教  
研究者番号：40566105

(2)研究分担者  
[戸田 修二](#) (Toda, Shuji)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：80188755