

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461002
研究課題名(和文) 肝細胞Rab11aを介した細胞内輸送の分子機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular trafficking in the liver

研究代表者

阪森 亮太郎 (Ryotaro, Sakamori)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10644685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Rab11aは細胞内輸送を司る分子である。脂肪の吸収・代謝・排出を含む細胞内輸送に関与すると考えられたため、脂肪食負荷により脂肪性肝炎モデルを作成し、肝細胞における脂肪代謝の検討に着手した。まず肝細胞特異的Rab11aノックアウトマウスを作成し、正常マウスと同様に長期に生存することを確認した。脂肪食負荷により体重や性腺周囲脂肪量による脂肪蓄積が増加していることが示唆され、肝細胞Rab11aが細胞内脂肪蓄積に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Rab11a, one of the small GTPases, is required for intracellular trafficking. We hypothesized that Rab11a involves in intracellular trafficking of lipid; absorption, metabolism and excretion. Hepatocyte specific Rab11a knockout mice were produced and survived as long as normal control mice. High fat diet was given for producing the NAFLD model mice for analysis of lipid metabolism in the liver. Results of increase of body weight and lipid accumulation in knockout mice were obtained. Hepatocyte Rab11a was related with intracellular lipid accumulation.

研究分野：消化器内科

キーワード：細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

肝臓は鉄の貯蔵、トランスフェリンやヘプシジンの産生を担っており、鉄代謝において重要な臓器である。また鉄の肝臓への過剰沈着は、肝細胞障害、肝線維化を引き起こすとともに、酸化ストレスの誘導、腫瘍増殖の促進、および免疫システムの修飾を介して発癌に関与していると考えられる。特にC型慢性肝炎において、肝細胞のトランスフェリン受容体の発現が亢進し鉄吸収が増加しているという報告もあり、肝臓における鉄代謝、及びトランスフェリン受容体の肝細胞内での動態の解明が病態解析に必要である。

トランスフェリン受容体は、細胞内でリサイクリングエンドソームを介する経路で代謝される。リサイクリングエンドソームは物質の再回収を担う細胞小器官であるが、物質輸送を含めた細胞内での役割は未解明である点が多い。近年、低分子量G蛋白質であるRab11aが上皮細胞において主に頂上膜側のリサイクリングエンドソームに局在し、トランスフェリン受容体などのリサイクリングを制御すると考えられている。またRab11aは胆細管形成を介して肝細胞の極性に関与し、ウイルス粒子の増殖がRab11aに依存していること、さらにB型肝炎ウイルスの肝細胞内への流入が細胞極性に依存することが報告され、Rab11aが細胞極性やウイルス感染の制御に関わることが示唆されている。しかしいずれの報告も培養細胞での検討であり、遺伝子改変動物を用いたRab11aの報告はない。また肝細胞の極性研究にはヒト肝癌細胞株HepG2が主に用いられているが、20-40%程度の細胞しか極性を示さないこと、胆細管構造を検出しづらいこと、頂側マーカーや微絨毛の局在異常がおこることなど、培養細胞特有の問題点が多い。さらに肝細胞は小葉内代謝領域特異性による不均一性を有する特殊な臓器であり、細胞極性を含む生体メカニズムの解明には動物モデルが不可欠である。

申請者は、Rab11aと同じsmall GTPaseであるCdc42の腸管特異的ノックアウト(KO)マウスを用い、腸管上皮幹細胞の極性維持や発生・分化にCdc42が不可欠であることをin vivoモデルで初めて明らかにした。また肝細胞特異的STAT3 KOマウスを用い、肝臓の機能解析についての研究成果を報告し(Sakamori R, et al. Hepatology 2007)、さらに共同研究者であるNan Gao教授(Rutgers University, USA)とともに、腸管特異的Rab11a KOマウスを用いて、Rab11aがTLR9、NF- κ Bの経路に関与して炎症性サイトカインの産生を制御することや炎症性の腫瘍形成を制御することを見出してきた。このように申請者は様々なKOマウスを用いて消化器臓器の遺伝子学的探索に取り組んできた。同様の手法を用いることで、肝細胞における細胞極性、リサイクリングエンドソームの役割を明らかにし、また肝炎・肝癌の

病態解明や治療戦略の構築を目指したい。

2. 研究の目的

肝細胞は、類洞に面する基底膜側と微小管に面する頂上側の、二極化した細胞膜を有する上皮細胞であり、代謝物質がそれぞれに選別される精巧な解毒代謝システムを有する。また肝臓の代謝系は、小葉内の肝細胞が均等に担うわけではなく、局在部位ごとに異なる代謝能を示す領域特異性を有する。このように肝臓は細胞単位と小葉単位の両方において組織構築が代謝制御に関わっており、細胞極性の解明が肝代謝の理解には欠かせないと考えられる。申請者は腸管上皮細胞特異的Rab11a KOマウスを作製し、細胞極性の破綻とともに腸管上皮細胞の重層化、細胞増殖の増加が見出した。同じ上皮細胞である肝細胞の細胞極性にもRab11aが関与することが推察されることから、本研究では、肝細胞特異的Rab11a KOマウスを用いて、肝細胞極性及び組織構築の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

肝細胞特異的Rab11a KOマウスを用いる。Rab11aをfloxedしたRab11a lox/loxマウスは前述のNan Gao教授より供与され、当研究室が保有するAlb-Creマウスと交配させることでCre-loxPシステムにより肝細胞特異的KOマウスを作製する。また成長後にノックアウトを誘導するためにMx1Creマウスとの交配も併せて行い、polyI.C.投与によりCre発現を誘導するKOマウスも作製する。また仔マウスの尾よりDNAを抽出しPCR法によりマウスの遺伝子型(Rab11a loxP及びCre)を同定する。KOマウスにはRab11a lox/lox; AlbCreマウスを使用し、コントロールにはRab11a lox/loxマウスを用いる。また適宜ヘテロタイプとしてRab11a lox/+; AlbCreマウスを使用する。誘導型KOマウスはRab11a lox/lox; Mx1CreマウスにpolyI.C.を腹腔内投与することで作製し、コントロールとしてCreを有しないRab11a lox/loxマウスに同量のpolyI.C.を投与する。マウス肝から蛋白を回収しウェスタンブロット法によりRab11aの蛋白発現を確認する。またRab11a activation assay kitを用いて活性型Rab11aも併せて確認する。さらに組織学的にもRab11aの発現を確認するためRab11a抗体により免疫組織染色を行う。またこの抗体は、すでに腸管上皮細胞特異的KOマウス、及び肝癌細胞株に対して用いており、ウェスタンブロット法及び免疫組織染色に使用可能であることが確認されている。

4. 研究成果

臓器特異的Rab11aノックアウトマウスとして、肝細胞特異的Rab11aノックアウトマウス、腸管上皮細胞特異的Rab11aノックアウトマウスを作成した。

腸管上皮細胞特異的 Rab11a ノックアウトマウスについては、海外の共同研究者とともに解析を行った。腸管上皮細胞特異的 Rab11a ノックアウトマウスの腸管上皮においては、細胞増殖マーカーの増加を認めていた。また腸管上皮細胞特異的 Rab11a ノックアウトマウスの腸管上皮において、膜蛋白の細胞内局在、特に先天免疫に関与する TLR9 の細胞内局在に変化が生じていた。さらに Rab11a ノックアウトマウスの腸管上皮における IL-6 を始めとする炎症性サイトカインの発現増加とともに Stat3 の活性化を認めていた。さらに P65 や RelB の発現上昇にみられる NF- κ B、MAP kinase 経路の活性化もみられた。またこの経路に Rab8 は関与していなかった。腸内細菌を認識する TLR そのものを Rab11a が制御しており、IKKs/NF- κ B や MAPK 経路を介した IL-6 や IL-1 といったサイトカイン産生を制御していることが明らかとなり、Rab11a が腸管上皮における TLR9 を介した免疫系に関与していることが示された。

一方、肝細胞特異的 Rab11a ノックアウトマウスについては、腸管上皮細胞特異的 Rab11a ノックアウトマウスとは異なり、正常マウスと同様に長期に生存したため、負荷実験を行った。Rab11a は細胞内輸送を司る分子であり、脂肪の吸収・代謝・排出を含む細胞内輸送に関与すると考えられたため、脂肪食負荷により脂肪性肝炎モデルを作成し、肝細胞における脂肪代謝の検討に着手した。脂肪食負荷により体重や性腺周囲脂肪量による脂肪蓄積が増加していることが示唆され、肝細胞 Rab11a が細胞内脂肪蓄積に関与していることが明らかとなった。

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 12 件)

Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. *Hepatology*. 査読有, 64(6), 2016, 1994-2014.

doi: 10.1002/hep.28820.

Sodium taurocholate cotransporting polypeptide inhibition efficiently blocks hepatitis B virus spread in mice with a humanized liver. Nakabori T, Hikita H, Murai K, Nozaki Y, Kai Y, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Wada H, Eguchi H, Takahashi T, Suemizu H, Sakamori R, Hiramatsu N, Tatsumi T,

Takehara T. *Sci Rep*. 査読有, 6, 2016, 27782.

doi: 10.1038/srep27782.

Evaluation of Fucosylated Haptoglobin and Mac-2 Binding Protein as Serum Biomarkers to Estimate Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. Tawara S, Tatsumi T, Iio S, Kobayashi I, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hiramatsu N, Miyoshi E, Takehara T. *PLoS One*. 査読有, 11(3), 2016, e0151828.

doi: 10.1371/journal.pone.0151828.

Plasmalemma Vesicle Associated Protein Truncation Causes Lethal Protein-Losing Enteropathy in Humans. Sakamori R, Zhang L, Gao N. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 査読有, 1(4), 2015, 348-349.

doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.06.003

The Hepatitis B Virus Genotype Affects the Persistence of Viral Replication in Immunodeficient NOG Mice. Yokoyama Y, Miyagi T, Hikita H, Yoshioka T, Mukai K, Nawa T, Sakamori R, Ohkawa K, Hiramatsu N, Takahashi T, Suemizu H, Ryo A, Tatsumi T, Takehara T. *PLoS One*. 査読有, 10(12), 2015, e0144775.

doi: 10.1371/journal.pone.0144775.

S100A8 Production in CXCR2-Expressing CD11b+Gr-1high Cells Aggravates Hepatitis in Mice Fed a High-Fat and High-Cholesterol Diet. Mukai K, Miyagi T, Nishio K, Yokoyama Y, Yoshioka T, Saito Y, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Hikita H, Sakamori R, Yoshihara H, Imai Y, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. *J Immunol*. 査読有, 196(1), 2016, 395-406.

doi: 10.4049/jimmunol.1402709.

Activation of the Mitochondrial Apoptotic Pathway Produces Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Hepatocytes That Contribute to Liver Tumorigenesis. Hikita H, Kodama T, Tanaka S, Saito Y, Nozaki Y, Nakabori T, Shimizu S, Hayashi Y, Li W, Shigekawa M, Sakamori R, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. *Cancer Prev Res (Phila)*. 査読有, 8(8), 2015, 693-701.

doi: 10.1158/1940-6207.

Rab8a vesicles regulate Wnt ligand delivery and Paneth cell maturation at the intestinal stem cell niche. Das S, Yu S, Sakamori R, Vedula P, Feng Q, Flores J, Hoffman A, Fu J, Stypulkowski E, Rodriguez A, Dobrowolski R, Harada A, Hsu W, Bonder

EM, Verzi MP, Gao N. *Development*. 査読有, 142(12), 2015, 2147-62.

doi: 10.1242/dev.121046.

Invariant natural killer T cell deficiency leads to the development of spontaneous liver inflammation dependent on T cells in mice. Nishio K, Miyagi T, Tatsumi T, Mukai K, Yokoyama Y, Yoshioka T, Sakamori R, Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Nawa T, Yoshihara H, Hiramatsu N, Yamanaka H, Seino K, Takehara T. *J Gastroenterol*. 査読有, 50(11), 2015, 1124-33.

doi: 10.1007/s00535-015-1060-5.

Global ablation of the mouse Rab11a gene impairs early embryogenesis and matrix metalloproteinase secretion. Yu S, Yehia G, Wang J, Stypulkowski E, Sakamori R, Jiang P, Hernandez-Enriquez B, Tran TS, Bonder EM, Guo W, Gao N. *J Biol Chem*. 査読有, 289(46), 2014, 32030-43.

doi: 10.1074/jbc.M113.538223.

CDC42 inhibition suppresses progression of incipient intestinal tumors. Sakamori R, Yu S, Zhang X, Hoffman A, Sun J, Das S, Vedula P, Li G, Fu J, Walker F, Yang CS, Yi Z, Hsu W, Yu DH, Shen L, Rodriguez AJ, Taketo MM, Bonder EM, Verzi MP, Gao N. *Cancer Res*. 査読有, 74(19), 2014, 5480-92.

doi: 10.1158/0008-5472.

TLR sorting by Rab11 endosomes maintains intestinal epithelial-microbial homeostasis. Yu S, Nie Y, Knowles B, Sakamori R, Stypulkowski E, Patel C, Das S, Douard V, Ferraris RP, Bonder EM, Goldenring JR, Ip YT, Gao N. *EMBO J*. 査読有, 33(17), 2014, 1882-95.

doi: 10.15252/embj.201487888.

〔学会発表〕(計 3 件)

田中 聡司、疋田 隼人、野崎 泰俊、甲斐 優吾、牧野 祐紀、中堀 輔、齋藤 義修、阪森 亮太郎、巽 智秀、竹原 徹郎。非アルコール性脂肪肝炎病態形成における、オートファジー制御蛋白 Rubicon の役割。第 22 回肝細胞研究会、2015 年 6 月 5 日、米子

Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Sadatsugu Sakane, Yasutoshi Nozaki, Yugo Kai, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. Enhanced expression of Rubicon inhibits autophagy and promotes apoptosis by increasing endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver

disease. The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 66th Annual Meeting, November 14, 2015, San Francisco

田中 聡司、疋田 隼人、中堀 輔、齋藤 義修、清水 聡、阪森 亮太郎、宮城 琢哉、巽 智秀、竹原 徹郎。NASH 病態形成におけるオートファジーとアポトーシスの意義。第 100 回日本消化器病学会総会、2014 年 4 月 23 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪森 亮太郎 (SAKAMORI, Ryotaro)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10644685

(2) 研究分担者

巽 智秀 (TATSUMI Tomohide)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20397699

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

Nan Gao (GAO, Nan)

Rutgers University, Associate Professor