

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06872

研究課題名(和文) 障害肝細胞から分泌されるヘパトソームはアルコール性肝炎の病態進行に寄与する

研究課題名(英文) The hepatosomes released from damaged hepatocytes will contribute the progression of ALD

研究代表者

江口 暁子 (Eguchi, Akiko)

三重大学・医学系研究科・特任助教(研究担当)

研究者番号：00598980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルコール肝炎マウスモデルを使った実験により、アルコール摂取により障害を受けた肝細胞は小さな粒子を放出すること、さらにこの粒子は障害肝細胞の細胞成分を含有していることが分かった。この粒子の生物活性を調べるために、マウスの肝内マクロファージを分離し粒子を添加したところ、粒子はマクロファージに取り込まれ、さらにマクロファージが活性化(炎症に寄与)することが分かった。この結果は、障害肝細胞由来の粒子が「細胞間伝達物質」としてアルコール性肝障害の病態進行に寄与していることを意味している。将来的には、粒子成分を阻害することでマクロファージ活性を阻止する治療法の開発を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We revealed that damaged hepatocytes treated with alcohol released extracellular vesicles (EVs) and these EVs were contained the cellular composition from damaged hepatocytes using alcoholic liver disease mouse model. To investigate EV biological function, we isolated hepatic macrophages and incubated hepatic macrophages with EVs. EVs were internalized in the hepatic macrophages resulted in activation of hepatic macrophages. These results indicated that hepatocyte-derived EVs contributed the progression of alcoholic liver disease as cell-to-cell communicators. We will identify the EV composition to associate with hepatic macrophage activation and will develop new therapeutic approaches for inhibition of hepatic macrophage activation in future study.

研究分野：肝臓 細胞生物学 遺伝子デリバリー

キーワード：肝臓 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

ALD (alcoholic liver disease, アルコール性肝炎)はアルコール摂取を起因とする慢性肝疾患で、米国では肝硬変患者の80%をALDが占める (Mathurin *Gastroenterol Clin Biol* 2009)。また日本でもアルコール性肝硬変の患者が増加している (Horie et al. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 2015)。アルコールを摂取し続けることで脂肪肝・肝臓炎症を発症し、肝硬変・肝癌・肝不全へと病態が進行する。アルコール性肝障害の診断は肝生検が主流であるが、肝臓全体の把握が難しくまた患者の負担が大きい。そこで非侵襲性バイオマーカーの開発が急務である。またALDの病態進行過程には、肝細胞・クッパー細胞・肝星細胞の「細胞間コミュニケーション」が必須であると言われており、炎症性サイトカイン等の関与が知られている。しかし、既知の因子だけでは細胞間コミュニケーションの全容を説明できず、新たな細胞間伝達物質の存在が示唆されてきた。

EV (extracellular vesicle, 細胞外小胞)は、正常細胞からも少量放出されるが1細胞傷害や活細胞の活性化(炎症等を含む)によりEVの放出数が増加し、かつEVの構成成分(タンパク質・microRNA・脂質・mRNA・DNA等)が変化すること、2)EVは標的細胞に効率良く融合しEV成分を導入することで標的細胞を活性化することが知られている (Kornek Yanez-Mo et al. *J Extracell Vesicles* 2015)。2012年にヒトNASH患者の血中EV数が上昇することが報告されたが (Kornek et al. *Gastroenterology* 2012)、CD8⁺T cell や monocyte 等の免疫細胞由来のEVであった。

そこで研究代表者は、UCSDのFeldstein研究室で肝細胞由来のEV(ヘパトソーム)

に焦点をあて、ヘパトソームが細胞間コミュニケーションとなり非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態進行に寄与するメカニズムの解明を行った。さらにNASHの発症には肥満が密接に関与していることから、肥満細胞由来のEV(アディポソーム)が肝障害を誘発する可能性を視野に入れ、NASHの発症機序や病態進行機序の解明や新規バイオマーカーの開発に取り組み、下記の成果をあげた。

(1) NASHにおけるヘパトソームは内皮細胞や肝星細胞を活性化しNASHの病態進行に寄与する

(Povero et al. *Science Signaling* 2013) (Povero et al. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015)

(2) ヘパトソームの成分はNASHのバイオマーカーになる (Povero et al. *Plos One* 2014)

(3) アディポソームはマクロファージの活性化を介して炎症促進に寄与する。アディポソームはインシュリン抵抗性に相関をもつ新規バイオマーカーになる (Eguchi et al. *Plos One* 2015) (Eguchi et al. *revision*)

(4) アディポソームは肝臓の炎症を誘発する臓器間伝達物質である (Eguchi et al. *in preparation*)

非アルコール性肝炎とアルコール性肝炎の病態進行メカニズムには共通する点が多い。このことから非アルコール性肝炎の研究で明らかにできた「ヘパトソームが肝炎病態進行に寄与する新規細胞間伝達物質であり、治療標的や非侵襲性バイオマーカーとして使用できる」という成果は、アルコール性肝炎にも応用できるという構想に至った。

2. 研究の目的

アルコール性肝炎の病態進行には肝細胞・クッパー細胞・肝星細胞の細胞間コミュニケーションが重要な役割を担うがメカニズムの全容は不明である。またアルコー

ル性肝炎の進行状況を判定できる非侵襲性バイオマーカーも確立されていない。近年我々は、非アルコール性肝炎において障害肝細胞から放出される細胞外小胞（ヘパトソーム）が標的細胞の活性化を介して病態進行に寄与することやバイオマーカーとして使用可能なことを明らかにした。そこで本研究では、アルコール性肝炎におけるヘパトソームが標的細胞の活性化を介して病態進行に寄与するメカニズムの解明を行い、アルコール性肝炎の新規治療標的の開発へとつなげる。将来的には、本研究のヘパトソームの成分同定の成果を、非侵襲性バイオマーカーの開発へと発展させることが可能である。

3. 研究の方法

研究代表者は予備実験として、アルコール性肝炎（ASH, Alcoholic steatohepatitis）マウスにおいて、1）血中 EV 数が上昇すること、2）ヘパトソームが上昇すること、3）ヘパトソームは標的細胞を活性化することを見出した。そこで本研究では、ASH マウスのヘパトソームの成分解析を行い標的細胞の活性化メカニズムの解明、引き続いて標的細胞の活性化に関与するヘパトソーム成分を阻害し ASH マウスでの治療効果（病態進行の抑制）を検討する。

ASH 肝細胞又は正常肝細胞からヘパトソームを回収し、1）プロテオミクスやリピドミクスを用いて ASH 特異的なヘパトソームの成分を同定する。次に、2）ヘパトソームが標的細胞の活性化を介して病態進行に寄与するメカニズムを解明し、ヘパトソーム成分の治療標的としての可能性を探究する。具体的には、ヘパトソームが標的細胞（クッパー細胞や肝星細胞）に取り込まれ、ヘパトソーム成分が標的細胞内のシグナル経路を活性化するメカニズムを解明する。さらに、標的細胞の活性化に関与する

ヘパトソーム成分を阻害することで標的細胞の活性化が抑制されるか（*in vitro*）また ASH の病態進行を阻止できるか（*in vivo*）を検討する。

4. 研究成果

アルコール性肝炎マウスにおいて、アルコール摂取により障害をうけた肝細胞が細胞外小胞を放出し血中を循環することで、血中細胞外小胞数が有意に上昇することを明らかにした。この肝細胞から放出された細胞外小胞（ヘパトソーム）の生物活性を調べる為に、肝内マクロファージを分離してヘパトソームを添加した。ヘパトソームは肝内マクロファージに効率良く取り込まれ、また肝内マクロファージ中の炎症関連遺伝子が上昇し、肝内マクロファージが活性化することが明らかになった。この結果はヘパトソームが肝内細胞間伝達物質として、アルコール性肝炎の病態進行に寄与していることを示している。

ヘパトソームは障害肝細胞由来の細胞成分（microRNA やタンパク質）を含有していることが分かった。タンパク質成分については炎症に関与する候補は見つけられなかったが、microRNA 成分においては、炎症に寄与する複数の microRNA が同定できた。現在肝内マクロファージの活性化に寄与する成分についての同定を進めており、将来的にはヘパトソーム成分を阻害することで、病態進行を阻止できる治療法の開発へとつなげていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1.

Akiko Eguchi, Yoshiyuki Takei, Hidekazu Tsukamoto and Ariel E. Feldstein, Hepatocyte-derived EVs (extracellular vesicles) in alcoholic steatohepatitis contain specific microRNA barcode and modulate macrophage phenotype,

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 暁子 (Eguchi, Akiko)
三重大学・医学系研究科・特任助教(研究担当)
研究者番号：00598980

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()