

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09355

研究課題名(和文) 脂肪肝における肝由来低エントロピー小胞による動脈硬化発症のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The role of low entropy extracellular vesicles derived from steatotic liver cells on the generation of atherosclerosis

研究代表者

杉本 和史 (Sugimoto, Kazushi)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60378370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝(NAFLD)患者では疫学的に動脈硬化を有する例が多いことが示されているが、脂肪化肝細胞が動脈硬化形成にどのような役割を果たすかは明らかになっていない。今回の研究では脂肪化肝細胞より分泌された細胞外小胞(EV)が血管平滑筋細胞の炎症、アポトーシス、遊走関連遺伝子の発現を増強させることと平滑筋細胞の遊走能を増強させることを示した。これにより脂肪化肝細胞がEVを介して動脈硬化を発症させる機序が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLD患者では健常者に比べて死亡率が高く、その死因の第一位は心血管イベントであることが知られているが、これまで脂肪化肝細胞と動脈硬化の直接的な関連は示されていなかった。今回の研究は脂肪化肝細胞が細胞外小胞を介して血管平滑筋に働きかけ動脈硬化病巣を形成することが示された。この機序を抑制することでNAFLDにおける動脈硬化を抑制し、死亡率を下げる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several epidemiologic studies have shown NAFLD has close relation to atherosclerosis, however, whether steatotic liver cells can directly induce atherosclerosis is not clear yet. In this study, we showed extracellular vesicles (EV) derived from steatotic liver cells enhanced the gene expressions related inflammation, apoptosis and cell motility of arterial smooth muscle cells, and also enhanced cell migration of these cells. These data indicate steatotic liver cells play an important role in the generation of atherosclerosis by releasing EV.

研究分野：肝臓病

キーワード：脂肪肝 動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は炎症・線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、更には肝硬変・肝癌に進展しうる病態であり、2020年までにアメリカにおいて肝臓移植適応疾患の第一位になると予想される深刻な疾患である。本邦においても患者は増加しており、今後大きな社会問題になると考えられる。メタボリックシンドロームを基盤とした NAFLD/NASH と動脈硬化症の間には密接な関連がある。実際、NAFLD 自体が心血管イベントの危険因子であり、内皮機能を障害し動脈硬化を促進する因子であることが報告されており、欧米の疫学研究では NAFLD 患者の死因第一位は虚血性心疾患であることが報告されている。本邦でも NAFLD 患者では冠動脈のプラークを有する症例が多かったことが報告されている。しかし、NAFLD/NASH と動脈硬化症を繋ぐメカニズムは不明な点が多く、また NAFLD/NASH からの動脈硬化発症を予測できるバイオマーカーもない。動脈硬化症の進行過程では、慢性炎症に伴う組織傷害とともに組織の修復・再生が繰り返され、細胞外マトリックスの増生、血管平滑筋細胞の肥大・過形成が生じる。この慢性炎症に脂肪細胞やマクロファージから放出される炎症性アディポカインやサイトカインが関与していると言われていたが、日本の NAFLD 患者には肥満を伴わないものも多く存在し、炎症性アディポカインやサイトカインとは別に動脈硬化症に関与する他因子の存在が示唆されている。

申請者は、C型肝炎ウイルス (HCV) の研究において、肝で形成された HCV コア蛋白が脂肪細胞に作用し、アディポカインの産生プロファイルを変化させることにより、肝炎のみならず、全身のインスリン抵抗性等に導く可能性があることを報告した。また、腸内細菌の変化が肥満発症の因子になることも報告し、各臓器が影響しあい、様々な病態を形成していくことを明らかにした。このことから、肝由来の炎症性病態情報を高濃度に血管内皮細胞特異的に伝達できる物質が存在し、その物質が動脈硬化症に関与しているという仮説にいたった。

細胞外小胞とは、細胞から放出されるナノ粒子 (エクソソームやマイクロパーティクル) のことであり、1) 肝臓疾患等の炎症疾患において血中の細胞外小胞数が増加し、かつ細胞外小胞の構成成分 (タンパク質・microRNA・脂質・mRNA・DNA 等) が変化すること、2) 細胞外小胞は標的細胞に効率良く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。

### 2. 研究の目的

前述の学術的背景から、NASH 肝由来の細胞外小胞が臓器間伝達物質として血管内を循環し、血管内皮細胞を活性化することで動脈硬化症を誘発することが予想される。さらに NASH 肝由来の細胞外小胞は、動脈硬化症を予測するバイオマーカーになる可能性も秘めている。本研究では、肝細胞内の病態情報であるタンパク質や microRNA を小胞膜内に分画・保持する NASH 肝細胞由来の細胞外小胞を「低エントロピー性情報伝達体」(病態情報を分解・拡散させることなく遠隔臓器に伝達) と定義し、細胞外小胞を介した病態情報伝播による動脈硬化症の病態連繋の解明に取り組む。最終的にはメカニズム解明を通じて NASH 肝由来の細胞外小胞を用いた動脈硬化症の治療標的の探求とバイオマーカーの開発へとつなげることが研究目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞からの EV の抽出

ヒト肝芽腫細胞株である HepG2 を 10cm 培養皿で DMEM により培養した。培養液にウシ血清アルブミン (BSA) と 500  $\mu$ M のパルミチン酸 (PA) を添加 (PA 群)、コントロールとして BSA のみを添加し共培養した。24 時間後、培養上清を回収し、3000rpmx10 分の遠心分離を 2 回試行し、細胞分解産物などの夾雑物を除去した。その後上清に 4 で 28000rpmx9 分の超遠心を行い EV を回

回収した。回収した EV を PBS で洗浄後、再度 4 で 28000rpmx9 分の超遠心をかけ精製した。また、同様の検討をオレイン酸添加にて行った。

### (2) EV 添加による血管内皮細胞の変化

ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を HepG2 由来の EV と共培養した。24 時間後に細胞より RNA を抽出し (RNeasy mini kit, QIAGEN) その後 cDNA を作成した (Prime script, TAKARA) 動脈硬化に関連すると考えられる遺伝子発現の変化を real time-PCR (RT-PCR) により解析した。

### (3) EV 添加による血管平滑筋細胞の変化

ヒト血管平滑筋細胞 (大動脈由来) を同様に HepG2 由来の EV と共培養し、24 時間後に RNA を抽出し、遺伝子発現の変化を RT-PCR により解析した。また、EV 添加後の細胞増殖能の変化を MTT アッセイ (Promega) により解析、細胞遊走能の変化を real time cell analyzer (Roche) により解析した。

### (4) 脂肪肝マウスの作成

生後 4 週の C57BL/6 マウスに低脂肪食 (Fat Cal 10%) (コントロール群) と高脂肪/高フルクトース食 (Fat Cal 40%、フルクトース添加) (NAFLD 群) を与え飼育した。4 週、8 週、12 週、16 週後に肝組織、血清を採取した。血清より超遠心法により EV を回収した。

得られた EV をマウス血管平滑筋細胞と共培養し、遺伝子発現の変化、細胞遊走能に与える変化を比較解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 培養肝細胞の EV 産生量の変化

BSA/PA (PA 群) または BSA のみ (コントロール群) と共培養 24 時間後の HepG2 を Oil-Red-O で染色し、顕微鏡で観察したところ、PA 群ではコントロール群に比して細胞質に有意に多量の脂肪滴を認めた。また、細胞内の Oil-Red-O を 100% イソプロパノールにより抽出し、OD450nm で吸光度測定により定量したところ、PA 群では優位に Oil-Red-O 量が多く ( $p < 0.05$ ) (図 1) 培養細胞でも PA 添加により脂肪化が生じていることが判明した。

次に、培養上清より EV を超遠心により回収し、等量の細胞培養液に懸濁し、EV 量をフローサイトメトリー (BD FACSCanto, Beckton Dickenson) により測定した (図 2)。PA 群ではコントロール群に比べて優位に EV 産生量が増加していることが示された ( $p < 0.05$ )。

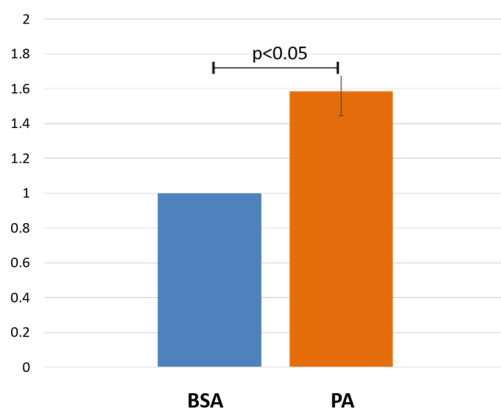


図 1

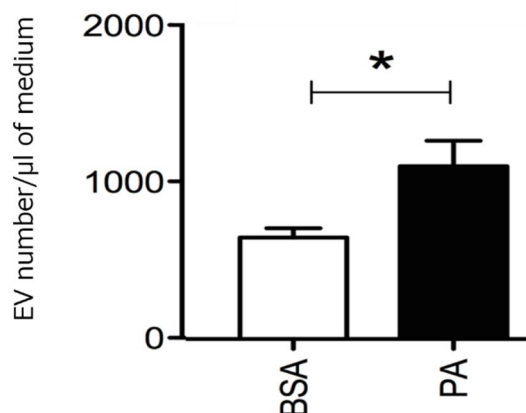


図2 EV量の変化

### (2) 血管内皮細胞の遺伝子発現の変化

次に、得られた EV を HUVEC 細胞と 24 時間共培養し遺伝子発現の変化を RT-PCR により 2 群間で比較した。

動脈硬化に関連すると考えられる遺伝子として、エンドセリン ( hEDN1 )、ICAM- 1 (hICAM-1)、セレクチン ( hSELE )、VCAM-1(hVCAM-1)、TIMP-3、メタロプロテアーゼ-2(hMMP-2)、トロンボモデュリン (hTHBD) の mRNA 発現量を BSA 群を 1 として PA 群由来 EV

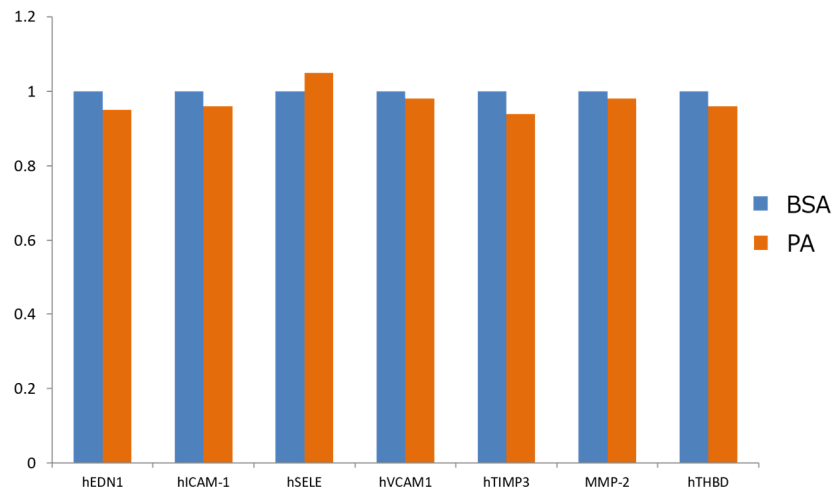


図3 HUVECにおける遺伝子発現の変化

添加群での量を計算した(図3)。この結果、両群間でいずれの遺伝子発現にも差を認めなかった。

### ( 3 ) 血管平滑筋に与える変化

同様に EV が血管平滑筋細胞の遺伝子発現に与える影響を RT-PCR により解析した(図4)。BSA 群の遺伝子発現量を 1 とし、PA 群での遺伝子発現量を計算した。PA 群では MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-12、IL-6、IL-1、MCP-1、BCL2A1 が上昇しており、PA 由来の EV が血管平滑筋細胞の遊走、炎症、アポトーシスにかかわることが示唆された。

また、動脈硬化形成の際に、血管平滑筋細胞の増殖、遊走は非常に大きな役割を演じることが知られているため、EV がこれらに与える影響を解析した。血管平滑筋細胞の増殖能は EV 添加により両群間での差は認めなかった。一方、細胞遊走能は PA 群 EV 添加により 1.5 時間から 3 時間までコントロールに比して増強を認めた(図5、 $p < 0.05$ )。

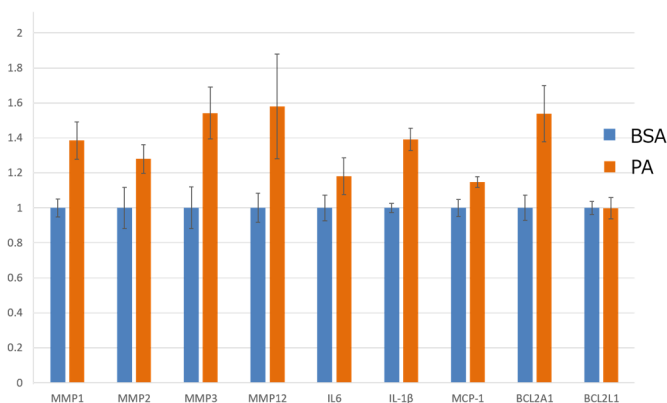


図4 血管平滑筋細胞の遺伝子発現量の変化

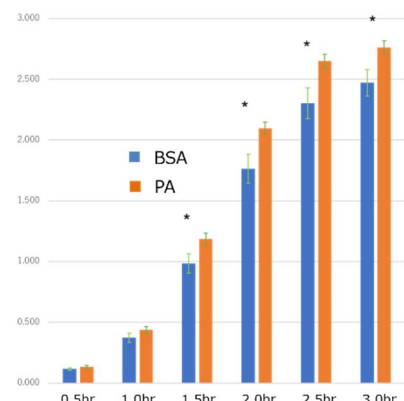


図5 血管平滑筋の遊走能の変化

### ( 4 ) NAFLD マウスでの検討

C57BL/6 マウスに生後 4 週より高脂肪/高フルクトース食 (NAFLD 群) または低脂肪食 (コントロール群) を与えて 16 週間、経時的に肝組織、血液を採取した。マウス肝組織は NAFLD 群で経時的に肝の脂肪沈着の増強を認めたが、線維化は認めなかった。コントロール群では 16 週後も肝の脂肪沈着、線維化いずれも認めなかった。フローサイトメトリーで測定した血中の EV 量は NAFLD 群で経時的に増加していた。

マウス血液より得られた EV をマウス培養血管平滑筋細胞と共培養し、細胞遊走能に与える影響を検討した(図6)。図に示されるように、NAFLD 群 16 週目のマウス血中 EV 添加により血管平滑筋細胞の遊走能には有意に増強が認められた。次に血管平滑筋細胞と EV を共培養し 24 時間後の遺伝子発現の変化を解析した。その結果、NAFLD 群 EV 添加により血管平滑筋細胞の MCP-1 遺伝子発現の上昇を認めた。

以上の結果より NAFLD 肝細胞由来の EV は血管平滑筋に作用し、細胞遊走能を増強させるほか、炎症、アポトーシス、細胞遊走に関連する遺伝子の発現を増強させ、動脈硬化形成に積極的に働くことが示された。

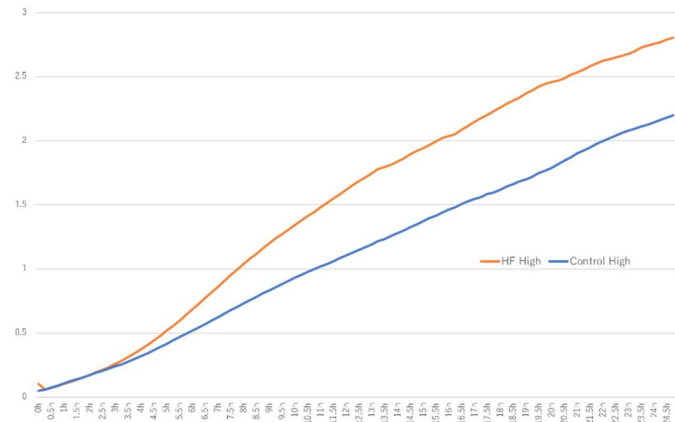


図6 マウス血中EVによる血管平滑筋遊走能の変化

以上の結果より NAFLD 肝細胞由来の EV は血管平滑筋に作用し、細胞遊走能を増強させるほか、炎症、アポトーシス、細胞遊走に関連する遺伝子の発現を増強させ、動脈硬化形成に積極的に働くことが示された。

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 2件）

1. 著者名 Ogura Suguru, Tameda Masahiko, Sugimoto Kazushi, Ikejiri Makoto, Usui Masanobu, Ito Masaaki, Takei Yoshiyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 A substitution in the pre-S1 promoter region is associated with the viral regulation of hepatitis B virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-019-1169-x	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 -

1. 著者名 Yoshizawa Naohiko, Sugimoto Kazushi, Tameda Masahiko, Inagaki Yuji, Ikejiri Makoto, Inoue Hiroyuki, Usui Masanobu, Ito Masaaki, Takei Yoshiyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 miR?3940?5p/miR?8069 ratio in urine exosomes is a novel diagnostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2677-2684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11357	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本和史・川崎優也・吉澤尚彦・江口暁子・竹井謙之
2. 発表標題 脂肪化肝細胞由来の細胞外小胞の動脈硬化に対する影響の検討
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本和史、岩佐元雄、竹井謙之
2. 発表標題 -GTP上昇例におけるアルコール関与の判別に踏査欠損トランスフェリン（CDT）は有用である
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分担者	江口 暁子  (Eguchi Akiko)  (00598980)	三重大学・医学系研究科・特任講師(研究担当)   (14101)	
研究 分担者	白木 克哉  (Shiraki Katsuya)  (90263003)	三重大学・医学系研究科・連携教授   (14101)	