

## 研究終了報告書

### 「遠隔臓器間の病態伝播を担う内在性微粒子 microparticle の機能解明」

研究期間： 2018 年 10 月～2022 年 3 月

研究者： 江口 暁子

#### 1. 研究のねらい

提案者のこれまでの成果として、① 障害肝細胞から放出される内在性微粒子 extracellular vesicles (HC-EV: hepatocyte-derived EVs) が、肝星細胞や肝内皮細胞を活性化することで病態進行に寄与する細胞間病態伝播体であることや、② 肥大化脂肪細胞が放出する EV がマクロファージの活性化を介して脂肪組織内の炎症に寄与するだけでなく、肝臓内の炎症を誘発する臓器間病態伝播体である可能性を報告してきました。肝臓疾患では、③ 慢性肝疾患の終末像で非可逆性の病態である肝硬変において、肝性脳症・肝腎症候群・門脈圧亢進症等の合併症を併発することや、可逆性の慢性肝疾患においても脳炎が見られることが知られていますが、既存の液性因子でこの現象を説明できず全容解明はなされていません。さらに近年、④ 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における肝線維化とサルコペニア (骨格筋量の減少・筋力の低下) に相関があることや、サルコペニアを併発した肝疾患群で予後が悪いことが明らかになりましたが、このメカニズムは不明です。③と④から、肝由来の病態情報を保持し効率良く骨格筋や脳に伝播できる病態伝播体が存在し、その伝播体が遠隔臓器内の病態進行に寄与していることが示唆されています。

そこで本研究では「HC-EV は遠隔臓器間の病態伝播体である」と定義し、HC-EV の遠隔臓器への体内動態や、HC-EV が遠隔臓器内で寄与する病態進行メカニズムを明らかにし、病態伝播に関わる HC-EV の特性をヒトで検証することを目的しました。本研究で得られた成果を、将来的には慢性肝疾患からの合併症を予測するバイオマーカーや合併症を抑制できる治療法の開発へと発展させることも目的としています。

#### 2. 研究成果

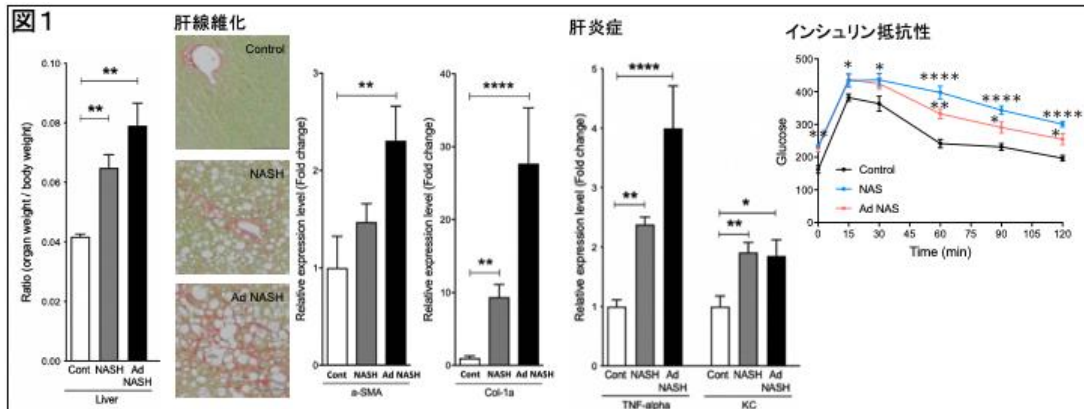
##### (1) 概要

まず、慢性肝疾患マウスの遠隔臓器での障害を検討した結果、慢性肝疾患合併症発症マウスが構築できたことを明らかにしました。さらに、HC-EV が標的細胞の活性化に寄与していることを明らかにし、その成分同定も実施しました。現在、どの成分が標的細胞の活性化に寄与しているかを検討中です。最後に、慢性肝疾患合併症の患者血中 EV 成分の同定をおこないましたが、この成果については今後患者の人数を増やした検証作業を通じて確定していく必要があります。

##### (2) 詳細

研究テーマA「慢性肝疾患合併症発症マウスの構築」

慢性肝疾患マウスとして、NASH や進行 NASH(Ad NASH)マウスにおいて、肝臓や脾臓の重量の増加が見られ脂肪肝になっていることや(図1)、Sirius Red 染色(肝線維化は赤)により、NASH マウスでは強い肝線維化が形成され、肝線維化を示す collagen-1a や $\alpha$ -SMA の遺伝子発現が有意に上昇することがわかりました(図1)。また、TNF- $\alpha$ や KC(neutrophil chemokine)という炎症関連遺伝子の有意な上昇もみられました(図1)。血液の解析から肝逸脱酵素の上昇がみられ、ヒトの NASH と同様にインシュリン抵抗性も示しました(図1)。



また、慢性肝疾患マウスでは血中の EV 数が増加することも観察されました。この結果から慢性肝疾患マウスが作成できていることがわかりました。さらに、遠隔臓器に障害を発生するマウスの構築をおこない、実際に遠隔臓器で障害が発生し遠隔臓器に障害を有する慢性肝疾患マウスの作製に成功しました。

### 研究テーマ B 「HC-EV が関与する病態進行メカニズムの解明」

慢性肝疾患マウスの肝臓が受ける障害を培養化で模倣した系として、培養肝細胞に脂肪毒性を付加し障害を受けた肝細胞から HC-EV を回収する系を構築しました。これらの HC-EV を標的細胞に添加したところ、細胞の糖代謝や脂肪代謝、分化、炎症に関する遺伝子変化が観察されました。この結果は、HC-EV が様々な標的細胞を活性化する役割を担っていることを示唆しています。

この標的細胞の活性化に関わる HC-EV 成分を特定するため、HC-EV の成分同定をおこないました。その結果、タンパク質や microRNA など、様々な成分が変動していることがわかりました。現在、この成分の中から標的細胞の活性化に寄与する成分を特定する作業をすすめています。

### 研究テーマ C 「慢性肝疾患患者における EV のプロファイル」

慢性肝疾患患者の血中 EV を回収し、その成分同定を試みました。健常者と比較して有意に変動した成分がいくつかありましたが、人数を増やしてこの成分同定の結果を検証する必要があります。さらに上記の HC-EV の成分と一致しているものは数個であり、この点についてもさらなる検証が必要です。

## 3. 今後の展開

今後は、HC-EV が各種標的細胞を活性化するメカニズムを約2年程度で解明することで、

HC-EV の新たな機能を明らかにします。さらに、約2-3年をかけて合併症患者 EV の検証作業を実施することで、新たなバイオマーカー開発を行う予定です。

#### 4. 自己評価

当初の目的を順調に達成することができました。ただし、コロナ禍で研究の遅れや、当初予定になかった実験を追加したことから、当初計画した実験を完全に達成できていないところもあります。今後、本さきがけの成果を元に研究費を獲得し、解明できなかった点を明らかにしていく予定です。

研究実施体制として動物や細胞実験の補助に際して実験補佐員が、患者検体の回収に際して消化器内科の医師が加わり、迅速に研究を遂行することができました。さらに研究を行う過程で、さきがけ内外の多くの研究者と共同研究を実施し、適切かつ効率良く研究を進行することができました。研究費は成分同等等の高額な経費が必要とされる項目に適切に執行し、成果を得ることができました。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

##### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 第44回日本分子生物学会年会

フォーラム さきがけ「生体における微粒子の機能と制御」

第3回成果報告会～動植物体内をめぐる微粒子の世界～

発表者: 江口暁子、湯川博、小山隆太、藤田尚信、馬場嘉信、岩佐元雄

題名: 肝細胞由来の微粒子は慢性肝疾患合併症の病態進行に寄与する

- 2021年度 愛知地区講演会 —分析化学が切り開く生命科学の最前線—

演者: 江口暁子

題名: 分析化学が貢献する臓器・細胞間応答に重要な細胞外小胞の機能解明

- 実験医学「増刊」細胞外小胞の生物学

Vol. 39-No. 20, p86-92, 2021年

著者: 江口暁子、岩佐元雄、竹井謙之

題名： 肝疾患の病態伝播を担う細胞外小胞の役割