

福島真典 論文内容の要旨

主 論 文

StAR-related lipid transfer domain 11 (STARD11)-mediated ceramide transport mediates extracellular vesicle biogenesis

(StAR 関連脂質輸送ドメイン 11(STARD11)媒介セラミド輸送は細胞外小胞合成に関与する)

福島真典, Debanjali Dasgupta, Amy S Mauer, 嘉数英二,
中尾一彦, Harmeet Malhi

掲載雑誌名 Journal of Biological Chemistry (2018) 293(39) 15277-15289

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：中尾一彦教授)

緒 言

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は世界的に急速に増加している肝疾患であり、NASH 進展による肝硬変は、いまや米国では肝移植の原因疾患の第 2 位を占め、本邦でもその症例数は急速に増加している。NASH の病態は複雑でいまだ不明な点が多いが、近年 NASH の病態のひとつである脂肪毒性が肝細胞から細胞外小胞 (exosome) の分泌を増加させ肝細胞の炎症や線維化に関与しているという報告がみられる。

Exosome は核酸やタンパク質を内包した細胞間コミュニケーションツールとして注目され、様々な疾患の病態に関与していることが明らかになっており近年研究が盛んな分野である。Exosome の合成機構に関してはいまだ不明な点が多いが、exosome は多胞体 (MVB) 内で形成され、その産生にはセラミドが必要であると言われている。一方セラミドは NASH の病因である脂肪毒性の主因となる飽和脂肪を前駆体として小胞体 (ER) で合成され、合成されたセラミドは、セラミド輸送蛋白として知られる STARD11 を介してゴルジ体に運搬・スフィンゴ脂質に変換される。以上の報告から、NASH と exosome はセラミドという点でリンクしていることに注目し、NASH で exosome の分泌が増加するメカニズムとして、ER で合成されたセラミドが STARD11 を介して MVB へも運搬され exosome の合成に使用される機構が存在するのではないかと仮説を立て検証した。

対象と方法

細胞培養には、ヒト肝癌細胞株 (Huh7)、不死化したマウス肝細胞株 (immortalized mouse hepatocyte; IMH) を使用した。Exosome は培養上清から超遠心法を用いて分離し、その測定には nanoparticle tracking analysis を用いた。セラミドは tandem mass spectrometry にて解析した。飽和脂肪酸としてパルミチン酸 (PA) を用いるにあたり、肝細胞の細胞死を起こさない程度の最適な濃度・処理時間を細胞の viability を解析し検討した。また各種肝細胞株に STARD11 が発現していることを Western blotting にて確認した。CRISPR/Cas9 を用いて STARD11 を knockout (KO) した肝細胞株を作成し、PA 刺激による肝細胞由来の exosome の分泌量を解析した。また細胞内・exosome

中のセラミド量を測定し、その変化を解析した。次いで ER と MVB 間で STARD11 が作用することを証明するため、STARD11 の細胞内での局在を蛍光免疫染色で検討した。

結 果

使用する PA の濃度・処置時間は 400nM にて 16 時間処理することとした。各種ヒト・マウス肝細胞株に STARD11 の発現を認め、PA 刺激による STARD11 の発現量に変化は認めなかった。Huh7、IMH とともに wild type 群では PA 刺激により exosome の分泌量は有意に増加したが、STARD11 KO 群では PA 刺激による exosome の増加は認めず、exosome 産生に STARD11 が必要であることが示唆された。Wild type 群では PA 刺激にて exosome 中のセラミド量は有意に増加したが、STARD11 KO 群では増加は認めなかった。一方、細胞内のセラミド量は STARD11 KO 群では wild type 群に比べ増加し、STARD11 が細胞内で産生されたセラミドを exosome として放出する機構に関与していることが示唆された。蛍光免疫染色法にて STARD11、ER、MVB の 3 者の局在に一致を認め、PA 刺激にてその一致部の割合は増加した。つまり、STARD11 は ER と MVB に近接した部位に存在していることが示され、PA 刺激によりセラミドは STARD11 により ER から MVB に運搬されていることが示唆された。

考 察

本研究において脂肪毒性による肝細胞由来の exosome 産生に STARD11 が寄与することを示した。飽和脂肪酸により合成されたセラミドは STARD11 を介し MVB へと運搬され exosome の合成へと使用されると考えられる。この exosome 合成機構は新たな知見であり、脂肪毒性環境下での exosome 合成の基本的経路と考えられる。この経路は NASH をはじめとした脂肪毒性とそれに伴う exosome が関与する疾患において、新たな治療ターゲットとなる可能性も期待される。