

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第717号	氏名	得丸智子
審査委員会委員	主査氏名	柴田洋孝	②
	副査氏名	兒玉雅明	③
	副査氏名	神山長慶	④
論文題目 Hepatic extracellular ATP/adenosine dynamics in zebrafish models of alcoholic and metabolic steatotic liver disease (アルコール性および代謝異常関連脂肪性肝疾患ゼブラフィッシュモデルにおける肝細胞外 ATP/adenosine 動態の解明)			
論文掲載雑誌名 Scientific Reports			
論文要旨 【緒言】近年、アルコール性肝疾患 (ALD) や代謝異常関連脂肪性肝疾患 (MASLD) が注目されている。ダメージを受けた肝細胞から細胞外に分泌される ATP やアデノシン (Ado) を可視化できるゼブラフィッシュを作製し、病態のメカニズム解明と治療応用への展開を目的とした。 【研究対象及び方法】1) 野生型成魚にエタノール (EtOH 群) または高脂肪食負荷 (HFD 群) を投与し肝臓の組織と肝 ATP/Ado 含量を解析した。2) ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2 細胞) に EtOH またはパルミチン酸を添加し、細胞上清の ATP/Ado 含量を解析した。3) GFP を指標に肝細胞外 ATP および Ado 動態を可視化できる GRAB _{ATP} , GRAB _{Ado} ゼブラフィッシュを作製し、EtOH 群、高コレステロール食給餌群 (HCD 群) で蛍光強度を解析した。また、野生側稚魚にて EtOH 群、HCD 群の肝組織 (HE 染色) と遺伝子発現 (リアルタイム PCR 法) を検討した。 4) VNUT 阻害剤 (クロドロン酸) を HCD 群に投与し、実験 3) 同様に解析した。 【結果】1) EtOH 群、HFD 群いずれも肝臓内に脂肪滴沈着を認めた。肝 ATP 量は EtOH 群ではコントロール群と比べて有意に減少していたが、HFD 群では増加した。2) 細胞上清中 ATP/Ado 量は有意に増加しており、GRAB _{ATP/Ado} 過剰発現後の GFP 蛍光強度も有意に増強した。3) EtOH 群、HCD 群の GRAB _{ATP} , GRAB _{Ado} ゼブラフィッシュは GFP 蛍光レベルの有意な増強を認めた。同様の刺激を行った野生型稚魚では肝組織に脂肪的沈着を認め、炎症、線維化マーカーの発現が有意に増加した。4) クロドロン酸投与にて、HCD 群の GRAB _{ATP} , GRAB _{Ado} ゼブラフィッシュの蛍光強度増強や炎症マーカーの発現が抑制された。 【考察】ゼブラフィッシュにおいて EtOH や高脂肪食負荷により ALD, MASLD が惹起された。HepG2 細胞および GRAB _{ATP} , GRAB _{Ado} ゼブラフィッシュモデルにおいて、肝細胞外 ATP, Ado が放出され、GFP 蛍光強度と関連を認めた。クロドロン酸の MASLD の病態改善を認めた。 【結語】肝臓特異的 GRAB _{ATP} , GRAB _{Ado} ゼブラフィッシュの作製に成功し、肝細胞外 ATP/Ado 動態と病態の進展との関連やメカニズムの解析に有用である。 本研究は、肝細胞外 ATP/Ado を可視化できる脂肪性肝疾患のゼブラフィッシュモデルを作製し、病態との関連および新規治療への発展に有用なモデルであると考えられた。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 ① 課 ・ 論	第 717号	氏 名	得 丸 智 子
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	柴田 洋孝	②
	副査氏名	兒玉 雅明	③
	副査氏名	神山 長慶	④
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. アルコール性肝疾患 (ALD) と代謝障害関連肝疾患 (MASLD) の病態生理の違いは何か？ 2. ALD, MASLDの病態における細胞内やin vitroのATPやアデノシンの動態はどうか？ 3. ALDやMASLDの人種差や地域差はどうか？ 4. 齧歯類と比べてゼブラフィッシュの利点、欠点は何か？ 5. 成魚と稚魚で肝細胞、Kupffer細胞などの成熟は同程度か？ 7. GRAB ATP/Adoプラスミドを胚への導入効率は何の程度であったか？ 8. DAMPsとしてのATPやアデノシンは、AST, ALTと同様に肝細胞からの漏出因子と考えられるか？ 9. ゼブラフィッシュの食餌内容の炭水化物が少ない理由は何か？ 10. HepG2細胞とゼブラフィッシュにおいてアルコールによる細胞障害の機序は同じか？ 11. HepG2細胞へのプラスミドのトランスフェクション効率は良いか？エレクトロポレーションは試したか？ 12. 各グループのゼブラフィッシュの数はどのように決定したか？ 13. GRAB ATP/Ado導入ゼブラフィッシュ確立の意義は何か？ 14. なぜHepG2細胞をin vitroの系として用いたのか？ 15. ALDモデルの方がMASLDモデルより肝臓内脂肪滴が明らかに多いのはなぜか？ 16. Clodronateで稚魚の肝障害が改善しているのは、細胞内ATP、アデノシンが肝細胞傷害のセカンドヒットとして機能したと考えられるか？ 17. エタノールと高コレステロールの同時負荷では肝障害はさらに重症化するか？ 18. Fig 3e, 4cではエタノールの低濃度、高濃度の結果の乖離をどう考えるか？ 19. エタノールと高コレステロール食処置の実験でコントロール群のATP, Ado値が異なるのはなぜか？ 20. 稚魚のGRAB ATP/Adoモデルでは、炎症、inflammasome、線維化の指標の変化がエタノールと高コレステロール食で乖離したのはなぜか？ 21. 稚魚のALDやMASLDモデルでは、負荷刺激を取り去ると肝障害は可逆的に改善するか？ 22. ATP分解酵素欠損マウスではMASLDモデルに耐性を示すと考えられるか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 得丸 智子

論 文 題 目

Hepatic extracellular ATP/adenosine dynamics in zebrafish models of alcoholic and metabolic steatotic liver disease

(アルコール性および代謝異常関連脂肪性肝疾患ゼブラフィッシュモデルにおける肝細胞外 ATP/adenosine 動態の解明)

要 旨

ア. 緒言 (目的) : 2023年6月に、全ての脂肪性肝疾患が **steatotic liver disease (SLD)** と総称されるようになった事を機に、改めて全世界的に同疾患への注目が高まっている。近年、ダメージを受けた肝細胞から細胞外に分泌される ATP やアデノシン (Ado) が **damage-associated molecular patterns (DAMPs)** として、**alcohol-associated liver disease (ALD)** や **metabolic dysfunction associated steatotic liver disease (MASLD)** 病態の肝臓の炎症や線維化を助長することが明らかになってきた。一方で、ALD、MASLD の病態進行に伴う肝細胞外 ATP/Ado 動態に関する報告は未だ認められていない。本研究では、肝細胞から放出される ATP および Ado に着目し、細胞外 ATP、Ado を可視化できるゼブラフィッシュ (**GRAB_{ATP}**、**GRAB_{Ado}** フィッシュ) を独自に作製し *in vivo* にて解析することで、ALD、MASLD を含む SLD 病態に関する新たな分子メカニズムの解明を目指し、さらに肝 ATP/Ado 経路を介する治療応用への展開を目的とした。

イ. 研究対象及び方法 (材料を含む) : ①野生型ゼブラフィッシュ成魚にエタノール暴露 (以下 EtOH

群) もしくは高脂肪食負荷 (以下 HFD 群) をさせ、肝臓の組織学評価、肝 ATP/Ado 含量を解析した。

②ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2 細胞) にエタノール、もしくはパルミチン酸を添加し細胞上清の ATP/Ado 含量を解析した。さらに pDisplay-CMV-GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} をトランスフェクションし、同試薬添加後の蛍光強度を測定した。③GFP を指標に肝細胞外 ATP および Ado 動態を可視化できる GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} ゼブラフィッシュを作製し、EtOH 群、高コレステロール食給餌群 (以下 HCD 群) で蛍光強度を解析した。また、野生型稚魚において EtOH 群、HCD 群それぞれの病態を組織学的評価 (HE 染色)、リアルタイム PCR 法で解析した。④VNUT 阻害剤であるクロドロン酸を HCD 群の GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} ゼブラフィッシュに投与し、実験③と同様の評価を行った。

ウ. 結果: ①EtOH 群、HFD 群いずれの HE 染色でも肝臓内に脂肪滴沈着を認めた。LC/MS/MS にて EtOH 群ではコントロール群に比べて肝 ATP 量が有意に減少していたが、一方 HFD 群の肝 ATP/Ado 量はいずれも有意に増加していた。②細胞上清内の ATP/Ado 量は有意に増加しており、pDisplay-CMV-GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} トランスフェクション後の GFP 蛍光強度はコントロール群と比較して有意に増強した。③EtOH 群、HCD 群の GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} ゼブラフィッシュは GFP 蛍光レベルの有意な増強を認めた。同様の刺激を行った野生型稚魚では肝組織に脂肪滴沈着を認め、炎症、線維化の一部のマーカーの発現が有意に増加した。④クロドロン酸投与にて、HCD 群の GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} ゼブラフィッシュの蛍光強度増強が抑制され、炎症マーカーの発現が抑制された。

エ. 考察: ゼブラフィッシュにおいてエタノール、および高脂肪食負荷により SLD が惹起された。また、HepG2 細胞を用いた *in vitro* 実験において同負荷により ATP/Ado が細胞外に放出され、GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} センサーの GFP 蛍光強度と相関することが判明した。さらに、GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 実験においても、同負荷後に同様の結果を得た。以上より、肝臓特異的 GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} ゼブラフィッシュを作製・解析することは、SLD の新たな病態メカニズムを解明するのに有用であることが示された。またクロドロン酸が HCD 負荷時の病態を改善したことより、クロドロン酸の MASLD の新規治療薬としての有用性が示唆された。

オ. 結語 (まとめ): 肝臓特異的 GRAB_{ATP}、GRAB_{Ado} ゼブラフィッシュを作製・解析することで、SLD の肝細胞外の ATP/Ado 動態と SLD の病態・進展度との相関、ならびにその分子メカニズムが明らかになった。