

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09007

研究課題名(和文) 糖尿病・肥満・脂肪肝を介した肝発癌におけるアディポカインBAFFの役割

研究課題名(英文) The role of BAFF in hepatocarcinogenesis in diabetes, obesity and fatty liver

研究代表者

阿部 雅則 (Abe, Masanori)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40432786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アディポカインであるB細胞活性化因子(BAFF)の脂肪性肝疾患の進展過程の病態への関わりについてBAFF欠損マウス、BAFF受容体欠損マウスを用いた解析した。高脂肪食で飼育すると、BAFF欠損マウス、BAFF受容体欠損マウスではインスリン抵抗性および内臓脂肪組織炎症が軽減した。一方、肝脂肪化および肝発癌は高脂肪食飼育BAFF欠損マウスでは改善、高脂肪食飼育BAFF受容体欠損マウスでは増悪した。以上から、BAFFは脂肪性肝疾患の肝発癌を含めた進展に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the role of B cell activating factor (BAFF), which is one of adipokines, in the progression of fatty liver disease, using BAFF- and BAFF-receptor (BAFF-R) knockout (KO) mice. In a high fat diet (HFD) model, insulin resistance and adipose tissue inflammation were attenuated in both BAFF- and BAFF-R KO mice. Although hepatic steatosis and hepatocarcinogenesis were improved in HFD-fed BAFF-KO mice, they were enhanced in HFD-fed BAFF-R KO mice. These findings suggest that BAFF would be a key molecule of progression, including hepatocarcinogenesis, of fatty liver disease.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪性肝疾患 肝発癌 アディポカイン

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦の肝細胞癌の大半はC型肝炎ウイルス(HCV)感染に起因している。近年、HCVに対する治療法は急速に進歩し、副作用の少ない抗ウイルス薬の登場によりHCVは高率に排除可能となってきた。一方で、近年、非肝炎ウイルス感染者からの肝発癌の増加が報告され、今後もその傾向は顕著になることが予想されており、その肝発癌機構を明らかにする必要がある。複数の疫学研究から、非肝炎ウイルス感染者からの肝発癌例の多くが、肥満や糖尿病などの代謝異常を合併していることが明らかになっていることから、肝発癌機構を代謝異常の観点から明らかにし、非常に多くの肥満、糖尿病患者の中から肝病態進行例を抽出すること、またその治療戦略を確立することは急務である。

B cell activating factor (BAFF)はB細胞の生存、分化や活性化に関与するサイトカインである。申請者は、BAFFがインスリン抵抗性を誘導するサイトカインであることを見出し、その後の検討で以下の知見を明らかにしてきた。高脂肪食誘導肥満マウスでは血清BAFF濃度が増加しており、その発現は内臓脂肪組織で高い。また、マウスにBAFFを投与すると、内臓脂肪組織におけるグルコースの取り込みと他のアディポカインの産生を変化させ、インスリン抵抗性および耐糖能異常が増悪する。肥満の内臓脂肪組織からのBAFF産生には酸化ストレスが重要な役割を果たしている。非アルコール性脂肪肝疾患(NAFD)では肝線維化の進展に伴い血清BAFF濃度が増加している。以上から、BAFFはNAFDの基盤となる肥満・インスリン抵抗性の誘導に重要な役割を果たしており、さらに肝病態の進展に関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

申請者が同定したアディポカインであるBAFFの肥満・糖尿病を介した肝脂肪化および肝発癌機構における役割について、BAFF欠損マウス、BAFF受容体(BAFF-R)欠損マウスを用いた動物モデル、培養細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞に対するBAFFの影響

マウス(C57BL/6マウス)肝臓、初代培養肝細胞、高分化肝細胞株であるHepa1-6細胞を用いてBAFF-Rの発現をreal-time RT-PCR, western blotで解析した。

初代培養肝細胞、Hepa1-6細胞にBAFFを添加し、脂肪合成に関する遺伝子発現の変化をreal-time RT-PCRで解析した。

初代培養肝細胞、Hepa1-6細胞に脂肪酸(オレイン酸、パルミチン酸)を添加して、脂肪化を誘導した。この系にBAFFまたはPBSを添加して肝細胞内の中性脂肪量の変化を定量的に解析した。

BAFF-R欠損マウスから肝細胞を単離し、脂肪酸添加による肝細胞内の中性脂肪量の変化を解析した。

(2) 肥満マウスモデルを用いたBAFFのインスリン抵抗性および肝脂肪化への影響
BAFF欠損マウス、BAFF-R欠損マウスおよび対照であるC57BL/6マウス(コントロールマウス)に高脂肪食を摂取させた。

空腹時血糖値、インスリン値を測定するとともに、糖負荷試験、インスリン負荷試験による耐糖能とインスリン感受性の評価を行った。

内臓脂肪組織中に浸潤する炎症細胞の評価をフローサイトメトリーで行った。また、内臓脂肪組織におけるマクロファージおよび炎症に関与する遺伝子発現をreal-time RT-PCRで解析した。

各群の経時的に採取した肝臓を用いて以下の検討を行った。

1) 脂肪蓄積: 肝臓の組織学的検索と肝内脂肪量測定を行った。また、脂肪取り込み、脂肪合成、酸化、脂肪流出に関与する因子の遺伝子発現および蛋白発現をreal-time RT-PCR, western blotで解析した。

2) 炎症、免疫異常: 肝組織で壊死の程度を観察するとともに、炎症性サイトカインなどの発現をreal-time RT-PCRで解析した。

(3) 肥満マウスモデルを用いたBAFFの肝発癌への影響

BAFF欠損マウス、BAFF-R欠損マウスおよび対照であるC57BL/6マウス(コントロールマウス)に生後14日目にジエチルニトロサミン(DEN 25mg/kg)またはPBSを単回投与し、4週後から通常食または高脂肪食で飼育した。

各群のマウスから経時的に肝臓を採取し、肝組織像と肝癌の合併率を検討した。

血清を用いて肝機能、脂質や耐糖能を含む生化学検査などの測定を行った。

各群の経時的に採取した肝臓を用いて脂肪沈着、炎症・免疫異常、細胞ストレスなどに関する遺伝子発現をreal-time RT-PCRで解析した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞に対するBAFFの影響

マウス肝臓、初代培養肝細胞、Hepa1-6細胞にはBAFF-R mRNAおよび蛋白が発現していた。

初代培養肝細胞、Hepa1-6細胞に脂肪を添加してもBAFF-R mRNAの発現には変化がなかった。脂肪合成に関与するSRBPE-1cやFASなどの遺伝子発現は増加した。

脂肪化を誘導した肝細胞およびHepa1-6細胞にBAFFを添加するとPBS添加に比し肝細胞内の中性脂肪量は減少した。

BAFF-R欠損マウスの肝細胞に脂肪酸を添加すると、C57BL/6マウスの肝細胞に比して中性脂肪量は増加した。

(2) 肥満マウスモデルを用いた BAFF のインスリン抵抗性および肝脂肪化への影響

A. BAFF-R 欠損マウスを用いた解析

高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスでは、コントロールマウスに比し空腹時血糖が低かった。また、糖負荷試験による血糖値上昇が低く、インスリン負荷試験による血糖低下率が増加した。

高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスの内臓脂肪組織ではコントロールマウスに比し浸潤するマクロファージ数が減少しており、とくに CD11c(+) の M1 マクロファージが減少していた。また、内臓脂肪組織における F4/80, CD11c, TNF α , レジスチンの発現は高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスでコントロールマウスに比し低下していた。

高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスでは、コントロールマウスに比し脂肪沈着の増悪がみられ、肝内の中性脂肪含有量が有意に増加していた。肝細胞壊死については両群で差はなかった。

高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスの肝臓では FAS, SREBP-1c などの脂肪合成系の遺伝子発現の増加がみられた。一方、炎症に関する遺伝子発現は両群で同等であった。

B. BAFF 欠損マウスを用いた解析

高脂肪食摂取 BAFF 欠損マウスでは、BAFF-R 欠損マウスと同様にコントロールマウスに比し空腹時血糖が低かった。また、糖負荷試験による血糖値上昇が低く、インスリン負荷試験による血糖低下率が増加した。

高脂肪食摂取 BAFF 欠損マウスの内臓脂肪組織では、BAFF-R 欠損マウスと同様にコントロールマウスに比し浸潤するマクロファージ数、とくに M1 マクロファージが減少していた。また、内臓脂肪組織における TNF α , レジスチンの発現が低下していた。

一方、高脂肪食摂取 BAFF 欠損マウスでは、BAFF-R 欠損マウスと異なり、コントロールマウスに比し脂肪沈着の軽減がみられ、肝内の中性脂肪含有量が有意に減少していた。肝細胞壊死については両群で差はなかった。

また、高脂肪食摂取 BAFF 欠損マウスの肝臓では FAS, SREBP-1c などの脂肪合成系の遺伝子発現がコントロールマウスに比し低下していた。さらに、炎症に関する遺伝子(TNF α , MCP-1, F4/80 など)の発現は BAFF 欠損マウスでコントロールマウスに比し低下していた。

(3) 肥満マウスモデルを用いた BAFF の肝発癌への影響

少量の DEN 投与後に通常食で飼育すると、コントロールマウス、BAFF 欠損マウス、BAFF-R 欠損マウスのいずれの群でも肝発癌はみられなかった。

DEN 投与後に高脂肪食で 36 週飼育するとコントロールマウスでは 70%のマウスに肝発

癌がみられた。BAFF 欠損マウスでは肝発癌率が有意に低下した。一方で、BAFF-R 欠損マウスでは肝発癌が増加した。

各群の血糖、脂質や肝酵素値については差はみられなかった。

各群の肝臓を用いて遺伝子発現の解析を行っている。特に各群で変化がみられているアポトーシス関連遺伝子について、引き続き解析を進めている。

以上から、本研究では BAFF がインスリン抵抗性および内臓脂肪組織の炎症を増悪させることから、BAFF の制御はこれらの病態の修飾に重要な働きをしていることを 2 種類のノックアウトマウスを用いて明らかにした。一方で、当初の予想に反して、肝脂肪化は BAFF 欠損マウスで軽減、BAFF-KO マウスでは増悪という結果が得られた。同様の結果は、培養肝細胞を用いた *in vitro* の系でもみられ、脂肪合成系遺伝子発現の変化もこれらの結果を支持している。この機序については不明な点もあるが、BAFF には BAFF-R 以外に TAC1, BCMA という 2 つの受容体が存在することが分かっており、その影響も否定できない。現段階ではこれらの経路の関与は否定的であるが、詳細な解析をすすめていきたい。

さらに、肝発癌についても BAFF 欠損マウスで軽減、BAFF-KO マウスでは増悪という結果を得た。申請者らの教室で行っている他の肝発癌モデルでも同様の結果が得られることから、今回の実験系に限った現象ではないと考えている。本研究では、「脂肪性肝疾患からの肝発癌」という課題を解明する上で有用な実験系を得たことから、肝線維化への影響なども含めて今後研究を進展させていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Masugi Y, Abe T, Tsujikawa H, Effendi K, Haraguchi A, Abe M, Imai Y, Hino K, Hige S, Kawanaka M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Sakamoto M. Quantitative assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Commun.* 2: 58-68, 2018. [査読有]

Hirooka M, Koizumi Y, Miyake T, Watanabe T, Yoshida O, Yukimoto A, Nakamura Y, Imai Y, Abe M, Hiasa Y. Nonalcoholic fatty liver with a hepatic arterial buffer response strongly associated with future metabolic disease. *Hepatol Commun.* 1: 573-576, 2017. [査読有]

Utsunomiya H, Yamamoto Y, Takeshita E, Tokumoto Y, Tada F, Miyake T, Hirooka M, Abe M, Kumagi T, Matsuura B, Ikeda Y, Hiasa

Y. Upregulated absorption of palmitic acids with changes of intestinal transporters in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J Gastroenterol.* 52: 940-954, 2017. [査読有]

Miyake T, Hirooka M, Yoshida O, Furukawa S, Kumagi T, Koizumi M, Yamamoto S, Kuroda T, Arimitsu E, Takeshita E, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y. Differences in the risk of fatty liver for onset of impaired fasting glucose according to baseline plasma glucose levels. *J Gastroenterol* 52; 237-244, 2017. [査読有]

Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aikata H, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Nozaki Y, Kawaguchi T, Torimura T, Abe M, Hiasa Y, Fukai M, Kamiyama T, Taketomi A, Mizokami M, Kanto T. Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 6; 28814, 2016. [査読有]

Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Furukawa S, Yoshida O, Koizumi M, Yamamoto S, Watanabe T, Yamamoto Y, Tokumoto Y, Takeshita E, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y. Low alcohol consumption increases the risk of impaired glucose tolerance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 51; 1090-1100, 2016. [査読有]

Yao L, Abe M, Kawasaki K, Akbar SMF, Matsuura B, Onji M, Hiasa Y. Characterization of liver myeloid-derived suppressor cells and their role in murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 11: e0149948, 2016. [査読有]

Miyake T, Kumagi T, Furukawa S, Hirooka M, Kawasaki K, Koizumi M, Todo Y, Yamamoto S, Tokumoto Y, Ikeda Y, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y. Short sleep duration reduces the risk of nonalcoholic fatty liver disease onset in men: A community-based longitudinal cohort study. *J Gastroenterol.* 50: 583-589, 2015. [査読有]

[学会発表](計 9 件)

Abe M, Nakamura Y, Miyake T, Yukimoto A, Imai Y, Watanabe T, Yoshida O, Hirooka M, Hiasa Y. Increased frequency of myeloid-derived suppressor cells in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *AASLD Liver Meeting 2017* (2017.10.20-24, Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, USA)

Abe M, Lao Y, Nakamura Y, Miyake T, Imai Y, Watanabe T, Koizumi Y, Yoshida O,

Tokumoto Y, Hirooka M, Kumagi T, Hiasa Y. Accumulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells in the liver of a murine model of non-alcoholic fatty liver disease. *AASLD Liver Meeting 2017* (2016.11.11-15, John B. Hynes VEeteran Memorial Convention Center, Boston, USA)

阿部雅則、姚立穎、中村由子、吉田理、三宅映己、今井祐輔、渡辺崇夫、徳本良雄、廣岡昌史、日浅陽一. NAFLD マウスモデル肝臓における骨髄由来抑制細胞の増加機序の解析. 第 20 回日本肝臓学会大会 (2016.11.3-4, 神戸コンベンションセンター, 神戸市)

阿部雅則、姚立穎、中村由子、三宅映己、吉田理、今井祐輔、渡辺崇夫、小泉洋平、熊木天児、徳本良雄、廣岡昌史、日浅陽一. NAFLD マウスモデルにおける肝骨髄由来抑制細胞の機能解析. 第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 (2016.7.16, 石川県立音楽堂, 金沢市)

阿部雅則、姚立穎、中村由子、今井祐輔、渡辺崇夫、吉田理、小泉洋平、徳本良雄、廣岡昌史、日浅陽一. 肝臓に局在する単球系骨髄由来抑制細胞の同定と免疫抑制機序の解析. 第 52 回日本肝臓学会総会 (2016.5.19-20, ホテルニューオータニ幕張, 千葉市)

Yao L, Abe M, Miyake T, Nakamura Y, Imai Y, Koizumi Y, Watanabe T, Yoshida O, Hirooka M, Tokumoto Y, Matsuura B, Hiasa Y. Identification of liver monocytic myeloid-derived suppressor cells and elucidation of their roles in non-alcoholic fatty liver disease. *The Liver Meeting 2015* (2015.11.13-17, Moscone North and South Convention Center, San Francisco, USA)

Yao L, Abe M, Kawasaki K, Miyake T, Hiasa Y. Liver monocytic myeloid-derived suppressor cells in NAFLD mice are associated with impaired T cell function. 第 19 回日本肝臓学会大会 (2015.10.8-9, グランドプリンスホテル新高輪, 東京都)

姚立穎、阿部雅則、川崎敬太郎、吉田理、三宅映己、日浅陽一. NAFLD マウスモデルにおける肝 MDSC の同定と免疫抑制機序の解析. 第 52 回日本消化器免疫学会総会 (2015.7.30-31, 京王プラザホテル, 東京都)

阿部雅則、三宅映己、今井康陽、澤井良之、日野啓輔、原裕一、髭秀平、坂元亨宇、山田剛太郎、鹿毛政義、日浅陽一、是永匡紹、溝上雅史、久野敦、成松久. NAFLD における新規糖鎖マーカー-WFA+-M2BP による肝線維化進展性の抽出. 第 2 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 (2015.5.23 シーモールパレス, 下関市)

[図書](計 1 件)

阿部雅則、三宅映己、今井康陽、日野啓輔、髭秀平、坂元亨宇、山田剛太郎、鹿毛政義、是永匡紹、溝上雅史、久野敦、成松久. NAFLD における新規糖鎖マーカー-WFA+-M2BP による

肝線維化予測に対する有用性. 肝胆膵 70
(増刊号): 45-50, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部 雅則 (Abe, Masanori)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 40432786