

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12698

研究課題名(和文)機能性脂質の代謝制御に着目した非アルコール性脂肪肝炎の発がん機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating mechanisms specific to NASH-associated HCC development

研究代表者

太田 嗣人(Ota, Tsuguhito)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・准教授

研究者番号：60397213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に特異的な発がんメカニズムは不明である。本研究では、機能性脂質であるスフィンゴシン1リン酸(S1P)の合成酵素であるスフィンゴシンキナーゼ(SphK)に着目し、NASH特異的な発がん機構を明らかにすることを目的とした。NASHモデルや患者の肝臓では、SphKの酵素活性が増加していること、一方、SphKのノックダウンにより、腫瘍増殖が低下し、肝発がんが抑制された。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease. It is characterized by a wide spectrum of hepatic changes, which may progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and cirrhosis. Ectopic fat or lipotoxicity in the liver can cause NASH-associated hepatocellular carcinoma (HCC). However, its underlying mechanism is unclear. In this study, we studied the role of a functional bioactive lipid 'S1P' and its rate-limiting enzyme sphingosine kinase (SphK) in the development of NASH-associated HCC. We found that SphK activity and mRNA expression increased in the liver of both NASH mice and NASH patients compared those in normal liver. By contrast, knockdown of SphK led to suppress HCC development in hepatoma cell lines. Moreover, we found that diet or chemical-induced carcinogenesis in the liver were significantly decreased in SphK knockout mice compared to that in control mice. Thus, SphK might be a novel therapeutic target of NASH-associated HCCs.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：機能性脂質 スフィンゴシンキナーゼ 非アルコール性脂肪肝炎 肝がん スフィンゴシン1リン酸

## 1. 研究開始当初の背景

飽食の時代と云われて久しい現代において、肥満人口や糖尿病患者の急激な増加を背景に、非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) は増加の一途をたどっている。NAFLD は単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) からなるが、両疾患の予後は大きく異なる。脂肪化に続いて炎症・線維化が生じる NASH は肝硬変・肝がんへと進展することから、NASH の病態解明とそれに基づく治療法確立は、現代医学の重要課題である。

一方、近年、肥満や糖尿病はがんの危険因子として注目される。特に、肝がんによる死亡率は、米国の肥満者では非肥満者に比し 4.5 倍に増加し、全がんのうち最も高いとされる (NEJM 348:1625-38, 2003)。また、日本人糖尿病患者の肝がんリスクは 1.97 倍と、全がんの中で最も高い (糖尿病学会・癌学会による報告書 2013 年、糖尿病 56:374, 2013)。その要因として、肥満や 2 型糖尿病の増加に伴う NAFLD の急増が少なからず寄与し、実際、NAFLD の進行型である NASH は肝硬変、肝がんへと進行する。NASH からの肝がんへの進展、及び肥満・糖尿病に関連する肝がんの発生促進には、異所性脂肪蓄積から生じるインスリン抵抗性や自然免疫の過剰応答による炎症等の肝臓へのリポトキシシティ (脂肪毒性) が共通のメカニズムとして想定される。しかし、リポトキシシティの本質に関わる脂質メディエーターが全く不明である。ゆえに、「脂質代謝の破綻」という病態の上流に存在すべき NASH 特異的肝がんの分子標的は未だに同定されていない。

リン脂質の一群は、細胞間や臓器間のメディエーター分子として、生理的・病理的状況で重要な役割を担っている。中でも、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、生体内で微量かつ半減期が短いにもかかわらず、S1P 作用

の低下した S1P 受容体欠損マウスにおいて腫瘍増殖や血管新生、炎症細胞浸潤が減弱すること (Nat Rev Immunol 11:403, 2011) 等から、がん細胞の増殖や炎症に關与する機能性脂質メディエーターとして、近年、注目される。S1P はスフィンゴシンを基質とし、脂質キナーゼ sphingosine kinase (SphK) により合成される。S1P の合成律速酵素である SphK の抑制により S1P 産生は減少する。従って、SphK は S1P を介した発がん及び腫瘍形成の鍵を握る分子標的として注目される。

## 2. 研究の目的

申請者は、非環式レチノイドが生体内で微量にしか存在しないスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の合成酵素であるスフィンゴシンキナーゼ (SphK) の活性を強力に阻害し、腫瘍形成を抑制することを新たに見出した。

本研究では、機能性脂質 S1P を介した肝がん形成の分子標的と考える SphK の遺伝子改変マウスを駆使して、1) NASH 特異的発がんにおける S1P とその代謝の鍵を握る SphK の役割を明らかにし、2) S1P 代謝異常が NASH からの発がんを促進するという仮説を検証する。最終的に、機能性脂質メディエーターの代謝制御に基づく、新しい NASH 特異的肝がん治療薬の開発への展開を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) NASH 発がんモデルにおける SphK の役割に関する基礎的検討

申請者は予備的検討から、肝がん再発抑制薬である非環式レチノイドが、肝がん細胞株において SphK1 遺伝子発現を時間・濃度依存性に低下させること、NASH モデルマウス (Hepatology 2007) の肝がん抑制群では SphK1 タンパク発現が顕著に低下していることから、SphK1 は肝がん抑制の新規分子標

的であると考えた。さらに、この NASH 肝がんモデルの背景肝では SphK の発現のみならず、*in vitro* SphK assay により測定した酵素活性が著明に亢進し、S1P 産生が増加していること、同様に、ヒト肝細胞がん組織の SphK 遺伝子発現が増加していることを見出している。S1P 合成の律速酵素である SphK が NASH 発がんの分子標的となるかを検証するため、培養肝細胞を用いた SphK プロモーター解析、NASH モデルの肝臓における SphK の発現と局在、RNAi を用いた肝がん細胞増殖における SphK の機能解析、NASH 進展の背景にある脂肪酸等の栄養素の過剰供給が SphK 活性に与える影響について分子レベルで解析する。

#### (2) NASH の進展と肝発がんにおける SphK の役割の解析

SphK には 2 つのアイソザイムが存在する。細胞膜に局在する SphK1 は、様々な腫瘍で発現が増加し ras 等のがん遺伝子を誘導することや、TNF- $\alpha$  により活性化されることから、SphK1 の発がんや炎症への関与が知られている。一方、SphK2 の機能は不明な点が多い。ここでは、SphK1 欠損マウスおよび SphK2 欠損マウスに食餌性および化学的に NASH および肝発がんを誘導し、SphK 欠損マウスにおける NASH 肝がんの表現型を比較する。

#### 4 . 研究成果

スフィンゴシン合成の律速酵素である SphK が NASH 発がんの分子標的となるかを検証するため、培養肝細胞を用いた SphK プロモーター解析、NASH モデル動物の肝臓における SphK の発現と局在を検討した。

NASH モデルマウスの肝臓では、正常肝に比し、SphK の酵素活性が増加していること、SphK の遺伝子発現が増加し、細胞質において強く発現していることを明らかにした。SphK のノックダウンにより、SphK の酵素活性を低

下させると、腫瘍増殖が低下し、肝発がんが抑制されること可能性が示唆された。

また、ヒトの肝組織において、肝がんを発症した背景肝において、SphK の酵素活性が増加し、遺伝子発現が増加していることを見出した。また、抗腫瘍効果を持つレチノイドを投与した肝がん治療群の肝臓では、SphK の発現が低下しており、SphK が肝がん治療の新規標的となりうると考えられた。

SphK1 欠損マウスに NASH を背景とした肝発がんを誘導すると、腫瘍のサイズおよび腫瘍の数が、対照マウスに比べて、いずれも減少しており、その詳細な検討を現在行っている。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

Kobori M, Takahashi Y, Sakurai M, Ni Y, Chen G, Nagashimada M, Kaneko S, Ota T. Hepatic Transcriptome Profiles of Mice with Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Treated with Astaxanthin and Vitamin E. *Int. J. Mol. Sci.* 18(3), E593, 2017 doi: 10.3390/ijms18030593 ( 査読有 )

Nagata N, Xu L, Kohno S, Ushida Y, Aoki Y, Umeda R, Fuke N, Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, Takahashi C, Suganuma H, Kaneko S, Ota T: Glucoraphanin Ameliorates Obesity and Insulin Resistance Through Adipose Tissue Browning and Reduction of Metabolic Endotoxemia in Mice. *Diabetes*, 2017. DOI: 10.2337/db16-0662 ( 査読有 )

Guanliang C, Ni Y, Nagata N, Xu L, Ota T: Micronutrient Antioxidants and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17(9), 1379, 2016 doi:10.3390/ijms17091379 ( 査読有 )

Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, Nagata N, Liang Xu, Mukaida N, Kaneko S, Ota T: DPP-4 inhibition by linagliptin attenuates obesity-related inflammation and insulin resistance by regulating M1/M2 macrophage polarization. *Diabetes* 65 (10):2966-2979, 2016. doi: 10.2337/db16-0317 ( 査読有 )

Ni Y, Zhuge F, Nagashimada M, Ota T: Novel Action of Carotenoid on Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Macrophage Polarization and Liver Homeostasis. *Nutrients* 8(7), 391; doi: 10.3390/nu8070391,2016 ( 査読有 )

Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, Nakanuma Y, Kaneko S, Ota T: Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. *Sci Rep* 5:17192, 2015 ( 査読有 ) doi: 10.1038/srep17192.

Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T: Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Biomolecules* 5(3):1563-1579, 2015 doi: 10.3390/biom5031563 ( 査読有 )

Ni Y, Nagashimada M, Zhan L, Nagata N, Kobori M, Sugiura M, Ogawa K, Kaneko S, Ota T: Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid, -cryptoxanthin. *Endocrinology* 156(3):987-999, 2015 doi: 10.1210/en.2014-1776 ( 査読有 )

[学会発表](計 2 件)

Ota T, Ushida Y, Aoki Y, Xu L, Zhuge F, Suganuma H, Kaneko S, Nagata N: Glucoraphanin-mediated Nrf2 activation reduces obesity and insulin resistance by increasing energy expenditure and limiting endotoxaemia-related chronic inflammation. EASD 2016 年 9 月 12 日 Munich, Germany

Ota T, Ushida Y, Aoki Y, Xu L, Zhuge F, Suganuma H, Kaneko S, Nagata N: Glucoraphanin-mediated Nrf2 activation ameliorates obesity, insulin resistance and NAFLD through adipose tissue browning and reduction of metabolic endotoxemia. Keystone Symposia Conference C1: Bile Acid Receptors as Signal Integrators in Liver and Metabolism 2017 年 3 月 5 日 モントレー, 米国

[図書](計 0 件)  
該当なし

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)  
該当なし

[その他]  
ホームページ等  
<http://ota.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

太田 嗣人 (OTA Tsuguhito)  
金沢大学・脳・肝インターフェースメディ  
シン研究センター・准教授  
研究者番号: 60397213

### (2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし