

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19313

研究課題名(和文) 脂質代謝経路を標的としたNASH発癌予防と進展抑止策；新規マウスモデルによる検討

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for NASH-related HCC targeting lipid metabolism

研究代表者

中川 勇人 (Nakagawa, Hayato)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00555609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満関連肝癌ではCPT2発現低下によるmetabolic reprogrammingが生じており、それは過剰な酸化を抑制して癌細胞を脂肪毒性から回避させると同時に、アシルカルニチン蓄積を介して癌幹細胞機能を獲得しlipid richな環境に適応するという合目的反応であることを見出した。またその機序として、CPT2発現低下によるSrc-JNK経路活性化抑制および、アシルカルニチン特にAC18:1を介したSTAT3活性化が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We conducted untargeted metabolomics profiling using obesity-driven HCC mouse models, and found suppression of fatty acid β -oxidation (FAO) and subsequent extensive accumulation of acylcarnitine species in HCC tissues, which was caused by downregulation of CPT2, a key enzyme of FAO. CPT2 downregulation enabled HCC cells to escape lipotoxicity by inhibiting Src-mediated JNK activation, and accumulated acylcarnitine, specifically oleoylcarnitine, enhanced carcinogenesis by conferring stem cell properties to HCC through STAT3 activation. A high-fat diet and carnitine supplementation synergistically promoted HCC development with acylcarnitine accumulation in mice. Intriguingly, in obesity-driven HCC, glucose was utilized for oxidative phosphorylation to compensate suppressed FAO, unlike the Warburg effect. NASH-HCC patients also revealed CPT2-mediated metabolic reprogramming. Increased serum acylcarnitine was a potential biomarker of NASH-HCC.

研究分野：消化器病

キーワード：NASH 肝細胞癌 メタボリックリプログラミング CPT2 アシルカルニチン

1. 研究開始当初の背景

近年肝炎ウイルスの関与のない肝癌の割合が増加しており、背景には肥満人口の増加に伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の罹患率上昇がある。加えて肥満はウイルス性肝炎からの発癌も促進することが知られている。しかしながら、肥満やNASHによる発癌促進機構は未だ不明な点が多い。

最近の研究から、癌細胞は周囲の環境に適応しかつ自身の成長に有利な状況を作り出すため、正常細胞とは異なった固有の代謝変化、いわゆる“metabolic reprogramming”が生じていることが明らかとなりつつあり、治療標的としても注目されている。一方、肥満やNASHを背景とした肝癌において、癌細胞に脂肪が蓄積しNASH類似の組織像を示すSteatohepatic HCC (SH-HCC)という亜型が比較的高頻度(約30%)にみられることがわかってきた。興味深いことに、申請者はこれまでいくつかのNASH・肥満関連肝癌マウスモデルを樹立し報告してきたが、いずれのモデルにおいても腫瘍部に強い脂肪沈着があり、SH-HCCに似た組織像を呈していた。よってSH-HCCはNASH・肥満関連肝癌固有の代謝変化を反映し、発癌促進機構解明の鍵を握るのではないかと仮説を立て、研究を開始した。

2. 研究の目的

NASH・肥満関連肝癌特異的に生じている代謝変化を同定し、その病態進展における意義および治療標的としての可能性を探索する。

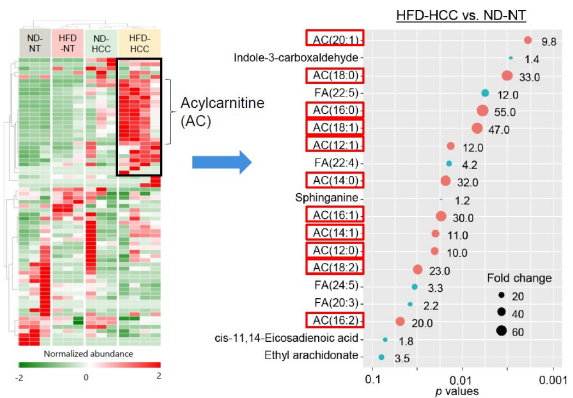
3. 研究の方法

マウスに肝化学発癌剤DENを投与した後、高脂肪食を与えると肝発癌が促進されることが知られている。そこでDEN投与後に通常食および高脂肪食下で飼育したマウスの癌部・非癌部組織を用いてメタボローム解析を行い、肥満関連肝癌に起きている代謝変化を網羅的に検討、さらにその結果を基に病態における意義をin vivo, in vitroで検討した。

4. 研究成果

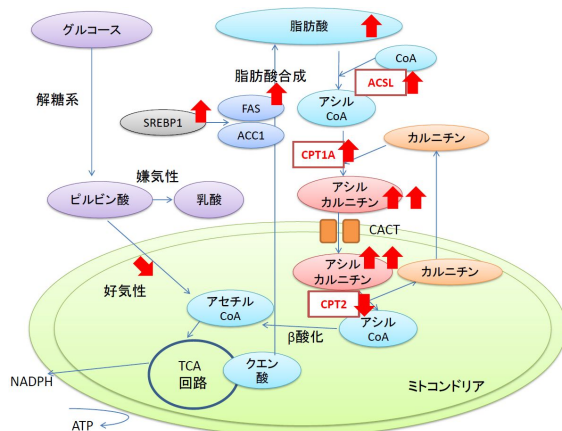
(1) マウス肥満関連肝癌組織を用いたメタボローム解析(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: LC-MS)

DEN投与後に通常食および高脂肪食下で飼育したマウスの癌部・非癌部組織(通常食非腫瘍部:ND-NT、通常食腫瘍部:ND-HCC、高脂肪食非腫瘍部:HFD-NT、高脂肪食腫瘍部:HFD-HCC)を用いてLC-MSを行い、肥満関連肝癌に起きている代謝変化を脂溶性物質の観点から網羅的に解析した。その結果、様々な炭素数のアシルカルニチン(脂肪酸がミトコンドリア内膜に運搬される際、アシルCoAとカルニチンが結合して生成される化合物)が癌部で増加しており、さらに高脂肪食負荷によって際立って増加していた(右図)。



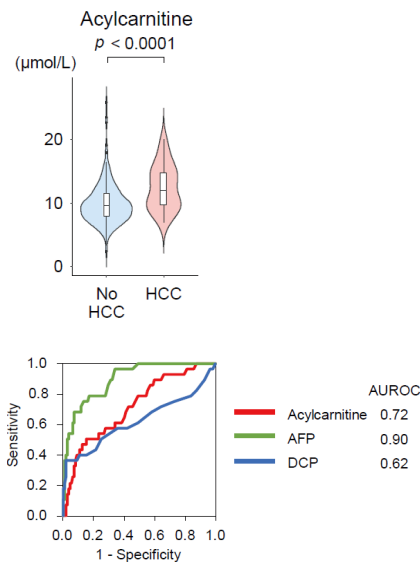
(2) アシルカルニチン代謝に関連する酵素の発現解析

次に肥満関連肝癌でアシルカルニチンが蓄積する原因を調べるため、アシルカルニチン代謝に関連する遺伝子の発現を調べた。肥満関連肝癌では脂肪酸からアシルCoAを生成する酵素ACSL4や、アシルCoAとカルニチンを結合させアシルカルニチンを生成する酵素CPT1Aの発現が亢進している一方で、ミトコンドリア内でアシルカルニチンからカルニチンとアシルCoAに分解する酵素CPT2の発現が低下していた。すなわち癌部では、アシルカルニチンを合成する経路が活性化している一方、分解が低下しており、細胞内にアシルカルニチンが蓄積しやすい状況になっていることがわかった(下図)。中でもCPT2の発現低下は、他のNASH・肥満関連肝癌モデルでも共通して認められる所見であった。ヒト肝細胞癌組織を用いた検討でも、癌部において有意にCPT2の発現は低下しており、特にSH-HCCにおいて顕著であった。さらにマウスDEN肝癌由来細胞株Dih10においてCPT2をノックダウンすると、培養上清中へのアシルカルニチンの放出がみられたことから、CPT2発現低下はアシルカルニチン蓄積の主要な原因と考えられた。加えて上清中にアシルカルニチンが放出されることから、マウス血清中のアシルカルニチン濃度を測定したところ、高脂肪食負荷癌マウスで有意に血清アシルカルニチンレベルが上昇していた。すなわち癌で蓄積したアシルカルニチンは血中に放出されている可能性が示唆された。



(3) NAFLD 症例における血清アシルカルニチン濃度

アシルカルニチンのバイオマーカーとしての可能性を探索するため、生検で非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) と診断された 250 名 (HCC なし 222 名、HCC あり 28 名) の血清アシルカルニチン濃度を測定した。マウスの実験結果と同様に、HCC を有する NAFLD 患者では有意に血清アシルカルニチンが高値であり、高アシルカルニチン血症は年齢や肝線維化で補正後も有意に HCC と関連していた。さらにアシルカルニチンは腫瘍マーカーである PIVKA と同程度の腫瘍検出能を有していた。これらの結果から、アシルカルニチンは NAFLD 肝癌のバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された (下図)。



(4) マウス肥満関連肝癌組織を用いたメタボローム解析 (Capillary electrophoresis-mass spectrometry: CE-MS)

さらに肥満関連肝癌で起きている代謝変化の全体像を評価するため、CE-MSを行った。肥満関連肝癌では酸化の副産物である β -ヒドロキシ酪酸が低下しており、CPT2 発現低下に伴い酸化が抑制されていると考えられた。またそのことが病理学的な脂肪蓄積として現れていると推察された。一方で酸化の抑制にもかかわらず TCA サイクルは保持されており、その原材料は解糖系および、グルタミンからグルタミン酸を生成する Glutaminolysis の亢進によって供給されていることがわかった。

(5) 肥満関連肝癌における CPT2 発現低下の意義

一般に癌では酸化が亢進しており、その増殖に利用しているとされることが多いが、肥満関連肝癌ではむしろ酸化が抑制されていることがわかった。その理由を突き止めるため、Dih10 細胞で CPT2 をノックダウンしそのフェノタイプを解析した。CPT2 をノックダ

ウンしても細胞増殖には変化がなかったが、パルミチン酸やステアリン酸といった飽和脂肪酸による細胞死、いわゆる脂肪毒性に耐性を示すことが分かった。またその効果は細胞死誘導に重要な Src-JNK 経路活性化を抑制することによって発揮されていた。

肥満患者においては、食事から摂取する総脂肪量が多だけでなく、インスリン抵抗性を介して内臓脂肪からの脂肪分解も亢進しており、これらが門脈を通過して多量に肝細胞へ流入する。この肝細胞への過剰な脂肪蓄積は脂肪毒性による肝細胞死・炎症・線維化を惹起し、NASH から発癌へと病態が進展していく引き金となる。しかし一方で、癌細胞はこのような "lipid-rich" な環境に適応し生存していかなければならないと考えられる。これは多くの癌の中でも、NASH・肥満関連肝癌にかなり特異的な癌微小環境と言える。よって CPT2 発現低下は、脂肪毒性を回避し lipid-rich な環境に適応するための合目的な反応と考えられた。

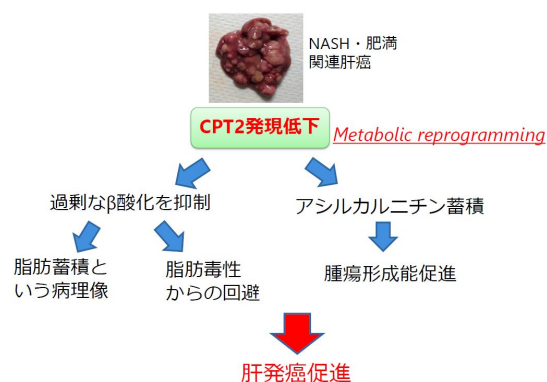
(6) アシルカルニチン蓄積が肝発癌に与える影響

次に癌組織に蓄積しているアシルカルニチンが、単なる CPT2 発現低下の surrogate marker なのか、あるいは直接癌化に寄与しているのかを検討した。肥満関連肝癌で顕著に蓄積していたアシルカルニチンである AC16:0 と AC18:1 を肝癌細胞 Dih10 に添加しそのフェノタイプを解析したところ、AC18:1 が stem cell marker の発現上昇を伴い肝癌の sphere 形成能を促進する作用を有することがわかった。AC18:1 添加後に、肥満による肝癌促進に寄与すると報告されているパスイウエイの活性化状況を調べたところ、STAT3 Y705 のリン酸化が増加していた。さらに STAT3 阻害剤によって AC18:1 による stem cell marker 発現上昇や sphere 形成能亢進がキャンセルされたことから、これらの作用は、STAT3 を介した作用であることが示唆された。これらの結果から、腫瘍組織に蓄積しているアシルカルニチンには、直接腫瘍形成を促進する作用があることがわかった。

(7) 高脂肪食とカルニチン負荷による肝癌促進作用の検討

ヒトにおいて高脂肪食と赤身肉は肝発癌を促進することが報告されているが、赤身肉にはカルニチンが多く含まれている。そこで高脂肪食と赤身肉は、アシルカルニチン蓄積を介して協調的に発癌を促進しているのではないかと仮説を立てた。生後 2 週間で DEN を投与後、6 週齢から通常食と高脂肪食と与える群に分け、さらに 24 週齢から飲料水にカルニチンを添加した群としてない群にそれぞれ分類し、合計 4 群で 8 か月齢での肝発癌の程度を比較した。その結果、通常食下ではカルニチンを負荷しても発癌に影響しなかったが、高脂肪食を同時に与えると有意に

発癌が促進された。癌組織中のアシルカルニチン量を調べたところ、高脂肪食とカルニチンを負荷した群では AC18:1 をはじめとするアシルカルニチンが増加しており、さらに in vitro 同様 STAT3 の活性化が亢進していた。これらの結果はアシルカルニチンによる肝癌促進作用をより支持するものと考えられた。



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 1 件)

Fujiwara N, Nakagawa H, et al. CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis via acylcarnitine accumulation in obesity. Gut. in press.

[学会発表](計 2 件)

1) NASH・肥満関連肝癌における特異的代謝変化に着目した発癌促進機構解明、藤原直人、中川勇人、小池和彦、第 53 回肝臓学会総会、広島、2017/6/8

2) Obesity-driven HCC adapts to lipid-rich conditions by CPT2 downregulation and promotes carcinogenesis through acylcarnitine accumulation. Naoto Fujiwara, Hayato Nakagawa, Kenichiro Enooku, Kazuhiko Koike, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) annual meeting, Washington, 2017/10/23

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 勇人 (Nakagawa, Hayato)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00555609