

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07177

研究課題名(和文) NASH肝臓マーカーおよび発がんメカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of markers and mechanisms of NASH-associated liver cancer

研究代表者

梯 アンナ (Kakehashi, Anna)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60382222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：二型糖尿病NASHモデルTSODマウスでは多数の肝変異性細胞巣(AF)および腫瘍が発生した。メタボローム分析により、グルコース代謝物やL-Arg上昇が見られ、それはArg1の減少とmTORの活性化に関連していることが明らかとなった。一型糖尿病NASHモデルSTAMマウスでは、肝臓のAFや腫瘍ではCACHD1の有意な過剰発現が観察され、CACHD1陽性AFやHCCではオートファジーマーカーおよびp62が減少した。ヒトNASH HCCにおけるArg1陰性及びCACHD1陽性患者の生存率が有意に減少した。本研究の結果ではARG1とCACHD1がNASH関連肝発癌マーカーであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満、糖尿病、脂質異常症などを伴ったいわゆるメタボリックシンドロームでみられるインスリン抵抗性が病因の一つとされている非アルコール性脂肪肝炎は、ウイルス性の慢性肝炎同様、肝細胞癌を発生することが明らかとなり、肝発癌の背景疾患として注目が高まっている。本研究で発見した新規NASH関連肝発癌マーカーCACHD1およびARG1がメタボリックシンドロームおよびNASHに由来肝細胞癌の早期発見、癌の予後、治療のために新規マーカーとして使用される可能性が示され、発がんメカニズムは明らかにするためにも重要である。

研究成果の概要(英文)：In obese diabetes/NASH model TSOD mice, a large number of altered foci (AF) and liver tumors were developed. Metabolome analysis revealed significant elevation of glucose metabolites and L-Arg in HCCs of TSOD mice. Furthermore, immunohistochemistry demonstrated rise in phosphokinases, P-mTOR and inhibition of arginase 1 (ARG1) in HCCs. It was concluded that elevation of glucose metabolites and L-Arg, decreased ARG1 expression and activation of mTOR pathway are main characteristics of NASH HCCs. In NASH model STAM mice, significant overexpression of CACHD1 was found in AF and tumors. Significant decrease of autophagy marker Atg12 and increase of p62 were detected in CACHD1+ precancerous lesions and tumors of STAM mice. In human NASH HCCs, the survival rate of ARG1- and CACHD1+ HCC patients was significantly reduced compared to ARG1+ and CACHD1- patients. It is suggested that ARG1 and CACHD1 are potential markers of NASH liver carcinogenesis.

研究分野：発がん

キーワード：発がん 発がんマーカー 動物モデル NASH

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) は非飲酒者に脂肪肝を認め、C型肝炎ウイルス(HCV)やB型肝炎ウイルス(HBV)の感染など、他の原因となる肝疾患が除外された病態である。NAFLDには肝脂肪化による非アルコール性脂肪肝から肝脂肪化に加えて肝臓への炎症細胞浸潤を伴い肝線維化を認める非アルコール性脂肪性肝炎(NASH: non-alcoholic steatohepatitis)までが含まれる。肥満、糖尿病、脂質異常症などを伴ったいわゆるメタボリックシンドロームでみられるインスリン抵抗性が病因の一つとされているNASHは、ウイルス性の慢性肝炎同様、肝細胞癌(HCC)が発生することが明らかとなり、肝癌発症の背景疾患として注目が高まっている。また、小児においてもメタボリックシンドロームに関連して問題視されており、今後の成人におけるNASH有病率の更なる増加が懸念されている。しかし、その病的発生過程や発がんメカニズムは明らかになっていない。NASH由来のHCCの早期発見・治療のために、新規マーカーやがん幹細胞をターゲットとする新規治療薬が重要視されている。

2. 研究の目的

本研究は、NASHに関連したHCC形成機序の解明を目標とし、実際に変化している蛋白質の発現や代謝の差異に注目し、NASH肝発がんに関連しているターゲット因子の解明を試みることである。そのためにNASHモデルマウスである(TSOD) (Tsumura, Suzuki, Obese Diabetes)およびSTAM (C57Bl/6-NASH)マウスを用いてNASH肝臓組織および作成した肝腫瘍における病理組織学的変化、分子生物学的な特徴を調べた。また、TSOD、STAMマウスおよびヒトNASH HCCや肝臓組織を用いて、プロテオーム解析を行い、特異的な蛋白質を同定し、ターゲット分子について、マウスモデルによりNASH肝発がん機序を調べた。TSODマウスの肝腫瘍および肝臓組織においてCE-TOFMSやCE-QqQMSを用いて、メタボロームおよびバイオインフォマティクス解析を行い、特異的なメタボロームや細胞内シグナリングの変化を検索した。さらに、ヒト肝癌細胞株を用いてターゲット蛋白質の発現を確認し、遺伝子をノックダウンし、機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒトNASH生検組織およびNASH由来肝細胞癌のプロテオーム解析

2006年1月から2016年12月内に当院でNASHと診断された患者の肝臓生検(10例)や、肝臓癌手術症例(30例)、大腸癌転移患者の正常肝臓組織(10例)を対象とした。術前化学療法を行った症例は除外した。対象症例は、平均年齢71(54-82)歳、男性22例、女性8例で、HCC組織型は高分化型癌3例、中分化型癌(14例)、低分化型癌(13例)を用いた。診断は当院病理部所属の病理医により行われた。NASH生検(10例)、肝臓腫瘍および非腫瘍(10例)、または大腸癌転移患者の正常肝臓組織(10例)を用いて、プロテオーム解析および臨床病理組織学的解析を行った。

(2) NASHモデルTSODマウスの実験

6週齢TSODマウス(日本エスエルシー株式会社)20匹およびその対照動物のTSNO (Tsumura, Suzuki, Non Obesity)マウス5匹を60週齢で屠殺し、肝臓を摘出した。Hematoxylin & Eosin (HE)染色を用いて病理組織学的検討を行い、発生した腫瘍を用いて、プロテオームやメタボローム解析、透過型顕微鏡解析、ターゲット蛋白質の免疫組織学的解析を行った。マウスの体重、空腹時の血中および尿中のグルコースレベルは、60週齢時の剖検を行う前に測定した。

(3) NASHモデルSTAMマウスの実験

2日齢C57Bl/6J雄マウス(Charles River laboratories Inc., Yokohama, Japan)15匹にstreptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 200 µg/mouseを皮下投与した。対照群としてAIN-93G飼料を与えた群(G1: コントロール群(AIN-93G飼料; 5匹))および6週齢からインスリン抵抗性を誘導するため高脂肪食(D12492) (Research Diet Inc., New Brunswick, NJ, USA)を与えた群(G2: STAM群 (HFD-60投与; 10匹))を設定した。17週齢時に屠殺剖検し、採取したマウス肝臓腫瘍や肝臓組織を用いて病理組織学的解析、QSTAR LC-Ms/Msを用いたプロテオーム解析、目的蛋白質の免疫組織学的解析を行った。

(4) 肝臓のLC-Ms/Msを用いたプロテオーム解析

ヒトNASH患者から採取された肝臓生検検体、HCC手術検体の癌部および非癌部、大腸癌の肝転移患者から正常肝臓組織を採取し、研究に用いた。10%ホルマリンに固定後(3日以内)、パラフィン包埋しプロテオーム解析および病理診断に用いた。プロテオーム解析のため9 µmに薄切後、hematoxylin染色を行い、microdissectionおよびneedle dissection法で目的的部位を選出し、liquid tissueまたはZwittergent入りの溶解バッファを用いて蛋白質を抽出した。動物実験については、TSODおよびSTAMマウスの肝臓腫瘍部、非腫瘍部およびコントロールマウス(TSNOやC57Bl/6Jマウス)の肝臓の凍結組織を用いて、9M Urea/2% ChapsおよびT-per溶解バッファにより肝臓サンプルを均質化後、蛋白質を抽出した。それぞれの蛋白質量を20 µgとし、DiNa-AI nano LC System (KYA Technologies, Tokyo, Japan)およびQSTAR Elite hybrid mass spectrometer (AB Sciex, Concord, ON, Canada)を用いて解析を行った。

LC-MS/MSプロテオーム解析によってコントロールマウスの肝臓と比較し、癌部において発現の変化した蛋白質を見出した。さらに、Ingenuity Pathway解析(IPA; Ingenuity Systems, Mountain View, CA, USA)にて上流調節因子解析およびネットワークの同定を行った。

(5) メタボローム解析

TSODおよびTSNOマウスの肝臓腫瘍部、非腫瘍部および正常肝臓において、CE-TOFMSやCE-QqQMSを用いたメタボローム解析を行った(Human Metabolome Technologies (HMT) Technologies Co., 鶴岡、日本)。解析には各グループ約50 mgの凍結組織を用いた。データはKEGGデータベース

(<http://www.genome.jp/kegg/>)およびIPAにより解析し、代謝経路、レギュレーターおよびシグナル伝達経路の変化を評価した。

(6) *In vitro*機能解析

NASH関連蛋白質の遺伝子のsiRNAを用いて、ヒトがん肝細胞(Huh7, HepG2)にリバーストランスフェクションによる遺伝子のRNAサイレンシング(ノックダウン)を行い、細胞の成長、細胞増殖、細胞死について検討した。

細胞生存アッセイ

細胞増殖活性を調べるために、WST-8アッセイ(Cell counting Kit, Wako, Japan)を用いた。

細胞浸潤アッセイ

癌細胞の浸潤能検討に、BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Becton, Dickinson and Company, Bedford, USA) を用いた。

(7) 免疫組織化学的検査

細胞増殖活性の検討に、Ki-67 ウサギ一次抗体 (1:400, ab16667, Abcam) または PCNA マウスモノクローナル抗体 (1:300, Dako, Japan) を用いて ABC 法にて免疫染色を行った。抗原の可視化は、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 反応により行った。アポトーシスの検討に TUNEL 法を用いた (ApopTaq Peroxidase in Situ Kit, Merck, Darmstadt, Germany)。各動物について肝臓や腫瘍細胞の核を少なくとも 3000 個計測し、Ki-67、PCNA および TUNEL 染色陽性細胞の標識率を算出した。TSOD、STAM マウスおよびヒト NASH 関連肝臓腫瘍や組織に対して、ABC 法および DAB またはアルカリホスファターゼによる免疫染色を行った。下記の抗体を用いた: mTOR 抗体 (Cell Signaling, Danver, USA); リン酸化-mTOR (p-mTOR) (Abcam, Cambridge, 英国); forkhead box O3A (FOXO3a) (Cell Signaling, Danver, USA); リン酸化-FOXO3a (p-FOXO3a) (Abcam); ribosomal protein S6 kinase (S6) (Cell Signaling) およびリン酸化-S6 (p-S6) (Cell Signaling); arginase 1 (ARG1) (1:100, ab124917, Abcam); P-Akt (Ser473) (1:100, #4060 (D9E), Cell Signaling); P-PI3K (ab86714, Abcam); P-ERK1/2 (Thr202) のウサギの抗体, 8-hydroxy-2'-deoxy guanosine (8-OHdG) マウスモノクローナル抗体 (N45.1, Japan Institute for the control of Aging, 日本); p62-SQSTM1 (1:300; MBL Co., 大阪, 日本)。ATG12 (1:100; Cell Signaling)。

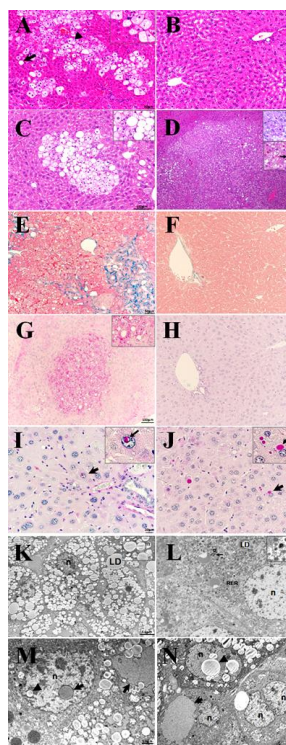
(8) 統計処理

StatLight-2000 (C) プログラム、(Yukms, 神奈川, 日本) および SPSS statistics version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いて、統計分析を行った。平均の差については F 検定により、等分散の場合は Student の t-検定またはマンホイットニー-U 検定 (両側) を用い、等分散でない場合には Welch の方法により行った。また、フィッシャーの正確確率検定をグループ間の比較に使用した。データは、平均±標準偏差 (SD) 値として提示する。免疫組織化学染色は、 χ^2 検定により評価し、P 値 < 0.05 が統計的に有意であるとした。

4. 研究成果

(1) TSOD マウスの肝細胞癌の発生およびプロテオーム、メタボロームおよびシグナリング解析

TSOD マウスの最終体重が TSNO マウスに比べ増加し、肝臓の絶対 (TSOD: 3.0 ± 0.6 g; TSNO: 1.4 ± 0.1 g) および相対 (TSOD: 4.6 ± 0.8 TSNO: 3.6 ± 0.2) 重量が TSNO マウスの肝臓に対して優位に上昇した。さらに、血糖値が優位に増加した。 (TSOD: 131 ± 46 g/dl, TSNO: 98 ± 12 g/dl)。TSOD マウスでは、ヒト NASH 様の組織変化を背景として多数の変異肝細胞巣と肝腫瘍の発生が認められた。TSOD マウス肝臓における代表的な組織病理学的変化を図 1 に示した。

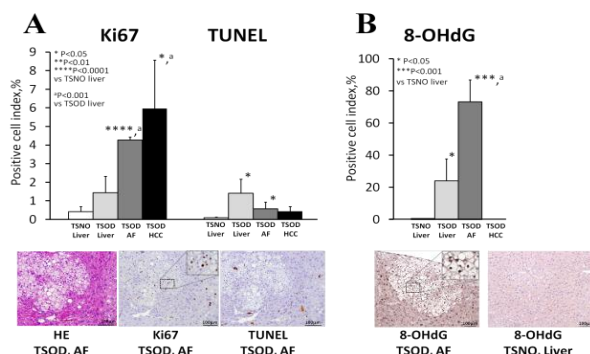


TSOD マウスの肝臓では脂肪変性、炎症性細胞浸潤、肝細胞バルーニングなどの NASH 様の変化が肝組織に認められた (図 1A)。また、脂質蓄積変異性病巣 (AF; 図 1C) および HCC (図 1D) が見られた。60 週齢の TSOD マウスでは HCC および肝細胞腺腫 (HCA) の発生率 (TSOD、81%、n=16; TSNO、0%、n=5、P<0.05) および個数 (TSOD: 1.7 ± 1.4 no./マウス; TSNO: 0.0 ± 0.0 no./マウス) が有意に上昇していた。

アザン染色では、TSOD マウスの肝臓において線維症の発症を示したが (図 1E)、TSNO マウス (図 1F) では示さなかった。さらに、TSOD マウスの肝臓では PAS 陽性 AF (図 1G)、核および細胞質内封入体 (図 1I, J) が観察された。

TSOD マウスに見られる HCC 細胞の TEM 写真を図 1(K-N) に示した。TSOD マウスの HCC と HCA では、大小の脂質の沈着、脂質変性、脂質滴 (LD) と肝細胞のバルーニングが観察された (図 1K)。LD の数が多い腫瘍細胞では、ミトコンドリアの数 (m) が減少していた。さらに、ペルオキシソーム (p) および粗面小胞体 (RER) が顕著に認められた (図 1L)。また、TEM 解析でも TSOD マウスの肝臓腫瘍細胞では、脂質および細胞質内封入体や核内細胞質封入体 (図 1M, N) が見られた。

図 1. 60 週齢の TSOD マウスの肝臓における代表的な組織病理学的 (H&E) (A-D)、アザン (E, F)、PAS (G-J) 染色および透過型顕微鏡解析 (TEM) (K-N) の肝臓組織 (A-C, E-J) および肝細胞癌 (D, K-N)、および TSNO マウスの肝臓 (B, F, H) を制御します。脂質変性、脂肪変化 (矢印)、軽度の炎症 (A)、空胞化/脂質蓄積病巣 (C) および HCC (D)、TSOD マウスの肝臓に見られる好酸球の顆粒 (矢印) およびアザン陽性領域 (線維症) (E)。TSOD マウスの肝臓における PAS 陽性の変異性細胞巣 (AF) (G)、核 (I) および細胞質 (J) の封入体 (矢印)。TEM 解析 (K, N) により、脂肪滴 (LD)、ペルオキシソーム (p)、多数の核 (n)、脂質沈着 (三角形の矢印)、ミトコンドリア (m) と核内細胞質封入体の増加が明らかになった。Bar: $200 \mu\text{m}$ (D); $100 \mu\text{m}$ (C, G); $50 \mu\text{m}$ (A, B, E, F, H); $20 \mu\text{m}$ (I, J); $5.6 \mu\text{m}$ (K); $2.5 \mu\text{m}$ (L, N); $2.0 \mu\text{m}$ (M)

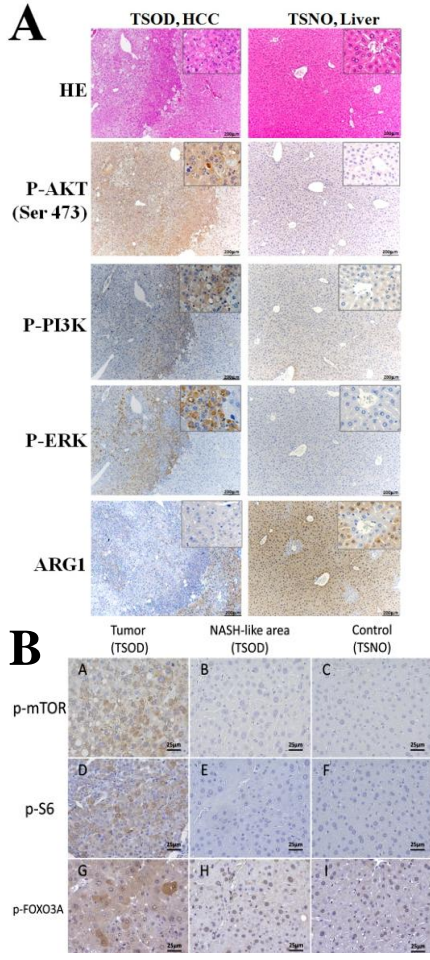


TSNO マウスと比較して、TSOD マウスの変異性細胞巣および肝臓腫瘍では、細胞増殖 (Ki67) およびアポトーシス (TUNEL) は有意に増加した (図 2A)。また、TSOD マウスの肝臓および変異細胞巣において、酸化的 DNA 傷害マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の陽性率は有意に上昇した (図 2B)。HCC 組織では核に 8-OHdG 陽性を示す細胞が認められなかった。

図 2. TSOD マウスの肝臓および肝臓腫瘍における細胞増殖およびアポトーシス活性 (AF, altered foci) (A) および 8-OHdG (B) の形成

QSTAR LC-MS/MS プロテオーム解析を行った結果、TSOD マウスの肝臓腫瘍で glutathione-S- transferase Mu 1, Mu2, Mu3 (GSTM1, GSTM2, GSTM3)、myoglobin (MB)、cytochrome P450 2A5 (CYP2A5)、apolipoprotein A-I、(APOA1)、glutamine synthetase、ornithine aminotransferase (OAT)、annexin A5 (ANXA5)、carboxylesterase 2E (CES5)、epoxide hydrolase 1 (EPHX1) などの蛋白質の高発現が認められた。一方、ornithine carbamoyltransferase (OTC)、glycine N-methyltransferase (GNMT)、argininosuccinate synthase (ASS)、arginase 1 (ARG1)、acyl-coenzyme A oxidase 1 (ACOX1)、carboxylesterase 2A (CES2A)、betaine-homocysteine S-methyltransferase 1 (BHMT1) などの蛋白質の発現が減少した。また、IPA 解析結果では TSOD マウスの肝臓腫瘍においてインスリンシグナリングの活性化、RICTOR, ADORA2A、SIM1 の活性化が認められた。

免疫染色の解析結果から TSOD マウスの肝臓腫瘍に対する p-mTOR、p-S6、p-PI3K、p-Erk1/2、p-Akt の有意な高発現と核内の p-FOXO3a の発現減少が見られ、それらは mTOR シグナリングの活性化に起因すると考えられた。また、ARG1 の有意な発現減少が明らかとなった (図 3)。



(2) TSOD マウスの肝細胞癌におけるメタボローム解析

TSOD および TSNO マウスの肝臓腫瘍と肝臓組織においてメタボローム解析の結果を表 2 に示した。

メタボローム解析によって TSOD マウスの腫瘍では糖代謝物質 (14-390 倍) および L-arginine レベルの増加 (13.5 倍)、adenylate と guanylate エネルギーチャージ、S-Adenosylhomocysteine (SAH) と S-Adenosylmethionine (SAM) の比率の有意な上昇、そして glycine や methionine および酸化型グルタチオン (GSSG) の有意な減少が認められた。一方、citrulline/L-arginine 比は、HCC (25 倍) と TSOD マウス肝臓組織 (2 倍) で大幅に減少しており、citrulline から L-arginine への有意な代謝シフトを示した。さらに、TSOD マウス HCC における L-arginine/ornithine 比 (24.6 倍) の増加が明らかになった。プロテオーム解析の結果から L-arginine の増加が arginase 1 (ARG1) の発現減少により引き起こされることが考えられた。また、TSOD マウス HCC では、L-arginine から合成される、ATP と重要なエネルギープールをリサイクルするための高エネルギーリン酸の急速に移動可能な phosphocreatine (8 倍) の有意な増加が観察された。

TSNO マウスの肝臓と比較して、TSOD マウスの HCC では glucose-1-リン酸 (16 倍)、glucose-6-リン酸 (17 倍)、galactose-1-リン酸 (25 倍)、fructose-6-リン酸 (14 倍) および 1,6-fructose-ニリン酸 (390 倍) の増加が認められた。TSOD マウスの NASH 肝臓でも、glucose 代謝産物の増加傾向が観察された。TSOD マウスの HCC における L-arginine および glucose 代謝産物レベルの上昇は、乳酸の有意な上昇と関連していた。さらに、ATP と GTP の上昇と AMP と GMP の減少が TSOD マウスの HCC で観察された。

図 3. TSOD および TSNO マウス肝臓における p-AKT (Ser 473)、p-PI3K、p-ERK、ARG1 (A) および p-mTOR、p-S6、p-FOXO3A (B) の免疫染色解析結果

(3) STAM マウスの肝細胞癌のプロテオームおよび新規前がん病変マーカー解析

STAM マウスの肝臓では脂肪変性、炎症性細胞浸潤、肝細胞バラーニングなどの NASH 様の変化が肝組織に認められた。STAM マウスにおいて病理組織学的解析の結果により有意な肝細胞癌の発生頻度 (71%, P<0.01) および個数 (1.0±0.8; P<0.05) の増加が認められた。

STAM マウスの肝臓では PAS 陽性の変異性細胞巣 (AF)、HCA や HCC が観察された。さらに、アザン染色では STAM マウスの肝臓組織や肝臓腫瘍において線維症の発症を示し、しかし、C57B1/6J のコントロールマウスでは観察されなかった。

次に LC-MS/MS やシグナリング解析を行い、STAM マウスの肝臓腫瘍においてβ-catenin や PPAR-αの活性化とともに、cache domain containing 1 (CACHD1) の高発現が見られた。また、STAM マウスの HCC では cytokeratin 8 (CK8)、cytokeratin 18 (CK18)、GSTM1、GSTM2、GSTM3、prohibitin 1/2 の上昇と ASS、ARG1 および BHMT の減少が認められた。興味深いことに、STAM マウスの肝臓の免疫組織学的解析を行った結果、cache domain containing 1 (CACHD1) 陽性細胞巣が発見された (図 4)。

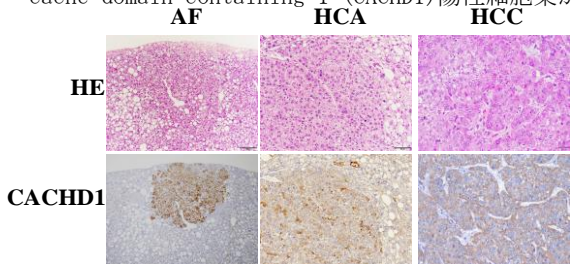


図 4. HFD 処理 STAM マウスの肝臓における CACHD1 および PCNA の免疫染色

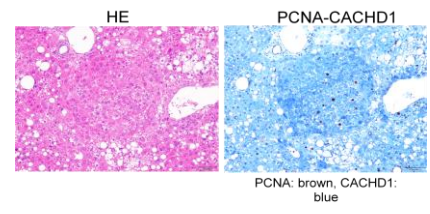


図 5. STAM マウスの肝臓における CACHD1 の免疫染色

CACHD1 陽性細胞巣における細胞増殖マーカー (PCNA) の陽性細胞数が上昇していることが認められた (図 5)。また、CACHD1 陽性細胞巣の数と面積がコントロールマウスに対して有意に上昇していた (図 6)。その結果から CACHD1 が NASH 関連新規発がんマーカーになりうる可能性が示された。

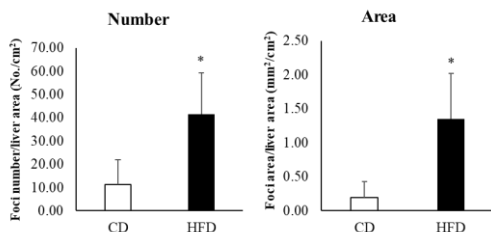


図 6. STAM マウス肝臓組織における CACHD1 陽性細胞巣の数および面積

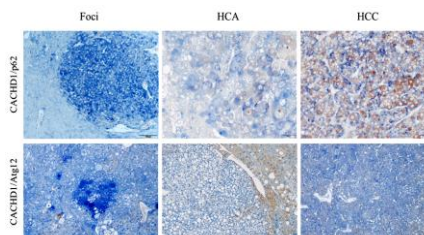


図 7. STAM マウス肝臓組織における Atg12, p62 と CACHD1 の二重染色結果.
Brown: p62, Atg12; Blue: CACHD1

さらに、免疫染色解析では STAM マウスの CACHD1 陽性細胞巣および腫瘍においてオートファジーマーカーである Atg12 の抑制と p62 の有意な上昇が見られ (図 7)、CACHD1 がオートファジーを抑制することにより、NASH 肝臓がんを促進することが明らかとなった。

(4) In vitro 機能解析の結果

Huh-7 および HepG2 ヒト肝細胞株を用いて CACHD1 の siRNA を用いてリバーストランスフェクションし、遺伝子の RNA サイレncing を行った。CACHD1 のノックダウンを確認するため real-time Q-PCR およびウェスタン・ブロットを行い、Huh-7 および HepG2 細胞において CACHD1 の mRNA および蛋白質の発現低下が認められた。

CACHD1 をノックダウンした Huh7 および HepG2 肝細胞癌株において、QSTAR LC-MS/MS や IPA 解析を行った結果、細胞骨格蛋白質の有意な発現減少やオートファジーマーカー、Nrf2、Atg12、p62、および c-myc の抑制が認められた。また、有意な細胞生存率の抑制や、浸潤能の減少傾向が認められた (表 1)。

表 1. CACHD1 ノックダウン Huh7 細胞の生存および浸潤活動

	Huh7 Cell viability (%)	Huh7 Invasion (%)
Control kn	100.0±12.2	100.0±32.8
CACHD1 kn-1	28.9±15.8 ^a	80.5±7.1
CACHD1 kn-2	12.8±10.0 ^b	80.2±10.3

^aP<0.01; ^bP<0.001

有意な上昇と、癌部における有意な抑制を認めた。また、NASH 生検や肝細胞癌部におけるインスリンシグナリング、SMAD3-TGF-beta、β-catenin、Nrf2、SREBP-LXRalpha および nuclear receptor-interacting protein 1 (NRIP1) 転写因子の活性化が観察された。さらに、PPARs や p53 の抑制、ミトコンドリア機能不全、脂質代謝不全、アルコール代謝不全、線維化および酸化的ストレスの誘導が認められた。

ヒト NASH 肝細胞癌患者の病理組織学的および臨床学的解析を行い、CACHD1 の高発現と患者生存率の減少に有意な相関関係が見られた (図 8)。その結果から、CACHD1 が NASH 由来の肝細胞癌の特異的な予後マーカーになりうる可能性を示した。また、CACHD1 の発現が高血糖および脂質沈着により誘導され、遺伝子転写、分子伝達および細胞増殖に関与することが示された

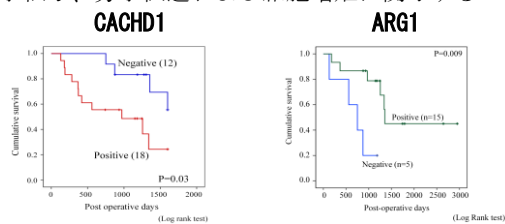


図 8. ヒト NASH 関連 CACHD1 陽性および陰性 (A) または ARG1 陽性および陰性 (B) の肝細胞癌患者の生存率の変化の肝細胞癌患者の生存率の変化 (Kaplan-Meier 方法)

(5) ヒト NASH 肝細胞癌や NASH 生菌のプロテオーム、IPA 解析およびバイオマーカーの検討

ヒト NASH 生検肝組織、肝細胞癌部、非癌部、およびヒト大腸癌肝転移患者の正常肝臓組織を用いて、QSTAR LC-MS/MS、IPA 解析、シグナリング伝達解析および目的蛋白質の免疫組織学的解析を行った結果、NASH 生検肝臓では CK8/18 の

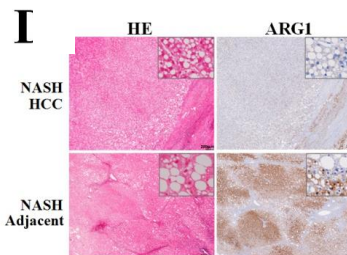


図 9. ヒト NASH HCC における ARG1 の発現

次に、ヒトの NASH HCC の ARG1 の病理組織学的および臨床学的解析を行い、癌部において ARG1 発現の抑制が見られた (図 9)。また、NASH 肝細胞癌において ARG1 の発現と腫瘍分化度 (P=0.035) および病理学的ステージ (P=0.022) の有意な相関関係が認められた。さらに、ARG1 陰性の NASH HCC 患者の生存率が ARG1 陽性の HCC 患者に対して有意に減少していた (P=0.009) (図 8)。ARG1 が NASH 由来の肝細胞癌の予後マーカーになりうる可能性を示した。

以上の結果から、二型糖尿病・メタボリックシンドローム・NASH モデル TSOD マウスでは L-arginine およびブドウ糖代謝物質の上昇、または mTOR 経路の活性化が肝臓がんの発生や促進に重要な役割を示すことが思われた。ヒト NASH 肝臓がんにおいて ARG1 の発現減少が予後マーカーになりうる可能性が認められた。

一型糖尿病モデル NASH モデル STAM マウスにおいて CACHD1 が NASH 関連の新規前がん病変マーカーであることが示された。CACHD1 が STAM モデルにおいて NASH 肝臓がん評価のための新規マーカーとして、またヒト NASH 関連肝臓癌の予後マーカーとして使用できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 13件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Gi, M., Fujioka, M., Totsuka, Y., Matsumoto, M., Masumura, K., Kakehashi, A., Yamaguchi, T., Fukushima, S., and Wanibuchi, H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 279-287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mutage/gez015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Okuno, T., Gi, M., Fujioka, M., Yukimatu, N., Kakehashi, A., Takeuchi, A., Endo, G., Endo, Y., and Wanibuchi, H.	4. 巻 169
2. 論文標題 Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicol Sci	6. 最初と最後の頁 456-464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfz051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yukimatsu, N., Gi, M., Okuno, T., Fujioka, M., Suzuki, S., Kakehashi, A., Yanagiba, Y., Suda, M., Koda, S., Nakatani, T., and Wanibuchi, H.	4. 巻 93
2. 論文標題 Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Toxicol	6. 最初と最後の頁 3617-3631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-019-02605-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamaguchi, T., Gi, M., Fujioka, M., Tago, Y., Kakehashi, A., and Wanibuchi, H.	4. 巻 32
2. 論文標題 A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 127-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2018-0067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okuno, T., Kakehashi, A., Ishii, N., Fujioka, M., Gi, M., and Wanibuchi, H.	4. 巻 10
2. 論文標題 mTOR activation in liver tumors is associated with metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis in both mouse models and humans.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers10120465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Gi, M., Fujioka, M., Kakehashi, A., Okuno, T., Masumura, K., Nohmi, T., Matsumoto, M., Omori, M., Wanibuchi, H., and Fukushima, S.	4. 巻 92
2. 論文標題 In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arch Toxicol	6. 最初と最後の頁 3207-3221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1007/s00204-018-2282-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu, Y., Tamada, S., Kato, M., Takeyama, Y., Fujioka, M., Kakehashi, A., Nakatani, T., Wanibuchi, H., and Gi, M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Ther Med	6. 最初と最後の頁 4463-4470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2018.6787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Gi, M., Fujioka, M., Yamano, S., Kakehashi, A., Oishi, Y., Okuno, T., Yukimatsu, N., Yamaguchi, T., Tago, Y., Kitano, M., Hayashi, S., and Wanibuchi, H.	4. 巻 92
2. 論文標題 Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arch Toxicol	6. 最初と最後の頁 3565-3583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1007/s00204-018-2316-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukushima, S., Gi, M., Fujioka, M., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., and Matsumoto, M.	4. 巻 34
2. 論文標題 Quantitative approaches to assess key carcinogenic events of genotoxic carcinogens.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicol Res	6. 最初と最後の頁 291-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.5487/TR.2018.34.4.291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakehashi, A., Stefanov, V. E., Ishii, N., Okuno, T., Fujii, H., Kawai, K., Kawada, N., and Wanibuchi, H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18020434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakehashi, A., Ishii, N., Okuno, T., Fujioka, M., Gi, M., and Wanibuchi, H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Enhanced Susceptibility of Ogg1 Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18081801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakehashi, A., Ishii, N., Okuno, T., Fujioka, M., Gi, M., Fukushima, S., and Wanibuchi, H.	4. 巻 2017
2. 論文標題 Progression of hepatic adenoma to carcinoma in Ogg1 mutant mice induced by phenobarbital.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/8541064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamaguchi, T., Gi, M., Fujioka, M, Doi, K., Okuno, T., Kakehashi, A., and Wanibuchi, H.	4. 巻 42
2. 論文標題 A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Toxicol Sci	6. 最初と最後の頁 475-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.42.475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、鰐淵英機
2. 発表標題 NASHモデルSODマウスにおける肝臓腫瘍および肝臓のメタボローム解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機
2. 発表標題 Acetoaceto-o-toluidideはラット膀胱上皮の細胞増殖を促進し、発がん促進作用を示す
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥野高裕、魏民、梯アンナ、末水洋志、秦順一、鰐淵英機
2. 発表標題 アフラトキシンB1はキメラ化したヒト化TK-NOGマウスのヒト肝領域を特異的に障害する
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、梯アンナ、高橋智、鰐淵英機
2. 発表標題 Nicotineの膀胱がん促進効果とその機序
3. 学会等名 発癌病理研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎の肝臓癌におけるアルギニンおよび糖代謝産物の蓄積
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 鰐淵英機、魏民、梯アンナ、鈴木周五
2. 発表標題 ジフェニルアルシン酸の長期毒性およびその発現機序 - 動物試験から得られた知見 -
3. 学会等名 第23回ヒ素シンポジウム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 梯アンナ、石井真美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機
2. 発表標題 NASH肝臓がんにおける新規マーカー候補分子の検討
3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会総会および学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 魏民、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機
2. 発表標題 ジフェニルアルシン酸のマウスにおける経胎盤発がん作用
3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会総会および学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 行松直、魏民、梯アンナ、鈴木周五、鰐淵英機
2. 発表標題 ラットにおけるBBN誘発膀胱発がんに対するo-Acetoacetotoluidideの促進効果
3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会総会および学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、多胡善幸、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機
2. 発表標題 NASHモデルTSODマウスにおける肝臓腫瘍および肝臓組織のメタボローム解析
3. 学会等名 第35回日本毒性病理学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、藤岡正喜、多胡善幸、魏民、鰐淵英機
2. 発表標題 メタボリックシンドロームモデルTSODマウスにおけるNASH肝臓組織及び腫瘍のメタボローム解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、魏民、鰐淵英機
2. 発表標題 NASH由来の肝細胞癌におけるmTORの活性化
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝組織と肝がんにおけるプロテオーム解析
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 梯アンナ、石井直美、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎の肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析
3. 学会等名 第 76 回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 梯アンナ、奥野高裕、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機
2. 発表標題 NASHの肝臓組織や肝臓癌におけるプロテオーム解析
3. 学会等名 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 奥野高裕、梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機
2. 発表標題 NASHモデルマウスを用いた肝細胞癌の発がんメカニズム解析
3. 学会等名 第32回発癌病理研究会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----