

令和元年5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15933

研究課題名(和文)慢性炎症を背景とした肝発がん・再発機序の解明

研究課題名(英文) Analyzes the mechanism of liver tumorigenesis and recurrence through chronic inflammation.

研究代表者

岡田 光 (Okada, Hikari)

金沢大学・医学系・博士研究員

研究者番号：50788916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病因はまだ不明であり、肝細胞癌(HCC)の発症予防は確立されていない。申請者は、ペレチノインがマウスの肝組織においてオートファジーを誘導することを見出した。NASH病態進行に伴い肝組織内のAtg16L1の発現の減少がみられた。HepG2細胞におけるAtg16L1の過剰発現は、パルミチン酸誘発NF- $\kappa$ B活性化およびIL6 / STAT3活性化を阻害した。我々は、Atg16L1がIL6受容体であるGp130の脱リン酸化を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) NASH、肝線維化、肝発がんの影響を、実臨床に即した発がんモデルで解析を行うことで臨床応用に貢献できる。2) ウイルス、腸内細菌、肥満を背景とした肝疾患病態進行による肝組織内のATG16L1発現回復は、慢性炎症を抑制し、肝線維化の進行や肝細胞癌の再発に対する新規治療標的になり得る可能性がある。Atg16L1の分子メカニズムを解明は、肝細胞癌の再発率および生存率の改善に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is still unclear and the prevention of the development of hepatocellular carcinoma (HCC) has not been established. We found that peretinoin induced autophagy in the liver of mice, which was characterized by the increased co-localized expression of LC3B-II and Lamp2, and increased autophagosome formation and autophagy flux in the liver. Especially, Atg16L1 was repressed at both the mRNA and protein level. Decreased Atg16L1 mRNA expression was also found in the liver of patients with NASH according to disease progression. Interestingly, Atg16L1 overexpression in HepG2 cells inhibited palmitate-induced NF- $\kappa$ B activation and IL6/ STAT3 activation. We showed that Atg16L1 induced the de-phosphorylation of Gp130, a receptor subunit of interleukin-6 family cytokines, which subsequently repressed phosphorylated STAT3 (Tyr705) levels, and this process might be independent of autophagy function.

研究分野：消化器疾患

キーワード：ペレチノイン オートファジー 慢性炎症 発癌 肝線維化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝硬変を背景とした肝細胞癌患者では、根治的治療後でも肝細胞癌が高率に再発し、再発率は年間約 20-25%、5 年では 70%以上に上ることから肝細胞癌の再発抑制が治療上極めて重要な課題である。申請者は、肝線維化から肝発がんモデルである血小板増殖因子(PDGF)-C Tg マウスを用いて国内新規肝細胞癌再発抑制薬ペレチノインが SP1/ PDGFR / 経路を阻害することで、肝線維化・血管新生・肝発がんを抑制することを報告した(Okada H et al. Cancer research 2009)。本論文は、PDGFR シグナルを抑制することが、肝発がんおよび再発に重要な治療標的であることを示した。ペレチノインの非実質細胞に対する影響をこれまでに評価してきたが、実質細胞である肝細胞に対する影響を検討していない。

### 2. 研究の目的

申請者は、肝線維化の病態形成の基盤となる慢性炎症に着目し、申請者の施設で開発した高脂肪動脈硬化食(Ath+HF)非アルコール性脂肪肝炎(NASH)からの肝発がんモデルマウス (Matsuzawa N. Hepatology. 2007 Nov;46(5))を用いて継時的に解析を行い、肝線維化・肝発がんに対する新規治療標的を探索した。申請者は、インスリン抵抗性脂肪肝(NAFLD)から脂肪肝炎(NASH)・肝線維化の病態進行につれて Atg16L1 由来オートファジーが抑制されていることを発見した。本研究では、NASH からの肝発がん病態形成における Atg16L1 由来オートファジーの生理的役割を解明する。さらに、Atg16L1 の発現誘導因子を同定し、肝線維化からの肝細胞癌の発がん・再発に対する新規治療標的の可能性を検討する。

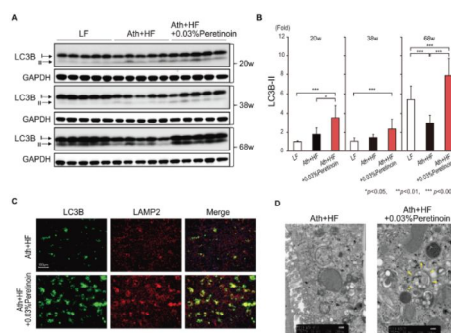
### 3. 研究の方法

10 週齢の雄性 C57BL6/J マウスに非アルコール性脂肪肝炎(NASH)からの肝発がんモデルである申請者の施設で開発した高脂肪動脈硬化食(Ath+HF) (Matsuzawa N. Hepatology. 2007 Nov;46(5))を投与後 12, 30 週間で NASH・肝線維化を経て 60 週間後に肝発がんを発症するため、継時的に解析を行い慢性炎症・肝線維化・肝発がんに対する影響を検討する。また、0.01%または 0.03%のペレチノインを含有する Ath+HF を 12, 30 および 60 週間投与する。肝線維化の評価は、アザン(AZAN)染色、シリウスレッド(Sirius Red)染色、 $\alpha$ -Sma 染色、コラーゲン I 染色にて、腫瘍形成は、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色にて行う。IL6, IL1b, CCL2, CCL5, PDGFB, PDGFC, SCD1, PPAR, CPT1, FASN, ATG5, ATG7, ATG16L1 の発現をリアルタイム PCR 法で解析する。pSTAT3, pNfkb, LC3B-1/II, および LAMP2 の発現を、免疫組織染色法及びウエスタンブロッティング法によって評価する。オートファゴソーム形成を電子顕微鏡によって評価した。初代肝細胞を、12 週間 Ath HFD で処置したオスの C57BL /6J 雄性マウスから単離し、初代肝細胞に対するペレチノインの効果をインビトロで評価した。

### 4. 研究成果

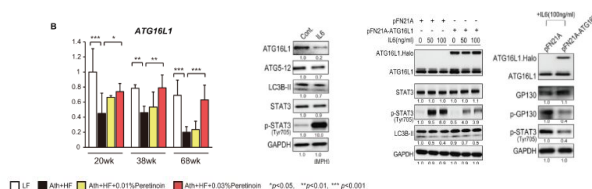
Ath+HF 投与マウスは、12 および 30 週間後に肝脂肪化及び肝線維化病態を形成したが、ペレチノインを含む Ath+HF 投与マウスは肝脂肪化及び肝線維化病態形成を著しく抑制した。ペレチノインを含有する Ath+HF を投与したマウスでは、Ath+HF のみを投与したマウスと比較して、IL6, IL1b, CCL2, CCL5, PDGFB, PDGFC, SCD1, PPAR, FASN の発現を抑制し、CPT1 の発現を顕著に増加させた。Ath+HF 投与したマウスの 60 週間後の肝組織は 34 匹中 25 匹の 73.5% が肝腫瘍を発症した。更にペレチノインを投与したマウスでは、0.01%が 6 匹中 2 匹の 33%、0.03%が 20 匹中 6 匹の 30%の腫瘍形成を顕著に抑制した。オートファジーの活性化マーカーである LC3B-1/II を評価するのにウエスタンブロッティング法、オートファゴソーム形成を評価するのに LC-3B/LAMP2 の二重染色及び電子顕微鏡を用いて検討したところ、NASH の病態進行に伴いオートファゴソーム形成が抑制され、ペレチノインを投与することによってオートファゴソーム形成が顕著に

図1 ペレチノインは、オートファゴソーム形成を亢進する



亢進していることが確認できた(図 1)。オートファジーの基質を調べるために、リアルタイム PCR 法及びウエスタンブロット法にて検討した結果、ATG16L1 を同定した。ATG16L1 は、NASH 病態形成に伴い発現減少し、ペレチノインを投与することによって Atg16L1 の発現が顕著に増加することを確認した。組換え IL6 処理は、免疫染色とウエスタンブロット法を用いてマウス初代肝細胞における ATG16L1 依存性オートファジーを抑制した。ATG16L1 過剰発現 HepG2 細胞

図2 ATG16L1は、Gp130の脱リン酸化させIL6/Stat3経路を抑制する



およびペレチノイン処理した初代マウス肝細胞は、組換え IL6 およびパルミチン酸による pStat3 および pNFkB の発現抑制を示した。ATG16L1 の発現増加は、IL6 の受容体である Gp130 の脱リン酸化することで pSTAT3 の活性化を顕著に抑制した。つまり、ATG16L1 は、Gp130 の脱リン酸化を誘導し IL6/STAT3 経路を抑制することで肝線維化及び肝発がんを抑制することが示された(図 2)。

ペレチノインの Atg16L1 の発現誘導機序は、プロモーター解析及び CHIP 解析から CEBP が関わることを確認できた。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Induction of Selenoprotein P mRNA during Hepatitis C Virus Infection Inhibits RIG-I-Mediated Antiviral Immunity.

Murai K, Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Omura H, Misu H, Kita Y, Takeshita Y, Ishii KA, Takamura T, Urabe T, Shimizu R, Okada H, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. *Cell Host Microbe*. 2019 Apr 10;25(4):588-601.e7. doi: 10.1016/j.chom.2019.02.015. 査読有

Characteristics of impaired dendritic cell function in patients with hepatitis B virus infection.

Yonejima A, Mizukoshi E, Tamai T, Nakagawa H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Iida N, Fushimi K, Okada H, Yamashita T, Sakai Y, Honda M, Kaneko S. *Hepatology*. 2019 Apr 2. doi: 10.1002/hep.30637. 査読有

Notch signaling facilitates hepatitis B virus covalently closed circular DNA transcription via cAMP response element-binding protein with E3 ubiquitin ligase-modulation.

Wang Z, Kawaguchi K, Honda M, Hashimoto S, Shirasaki T, Okada H, Orita N, Shimakami T, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Murakami S, Kaneko S. *Sci Rep*. 2019 Feb 7;9(1):1621. doi: 10.1038/s41598-018-38139-5. 査読有

The osteopontin-CD44 axis in hepatic cancer stem cells regulates IFN signaling and HCV replication.

Shirasaki T, Honda M, Yamashita T, Nio K, Shimakami T, Shimizu R, Nakasyo S, Murai K, Shirasaki N, Okada H, Sakai Y, Sato T, Suzuki T, Yoshioka K, Kaneko S. *Sci Rep*. 2018 Sep 3;8(1):13143. doi: 10.1038/s41598-018-31421-6. 査読有

Prevention of hepatocellular carcinoma by targeting MYCN-positive liver cancer stem cells with acyclic retinoid.

Qin XY, Suzuki H, Honda M, Okada H, Kaneko S, Inoue I, Ebisui E, Hashimoto K, Carninci P, Kanki K, Tatsukawa H, Ishibashi N, Masaki T, Matsuura T, Kagechika H, Toriguchi K, Hatano E, Shirakami Y, Shiota G, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 8;115(19):4969-4974. doi: 10.1073/pnas.1802279115. Epub 2018 Apr 23. 査読有

Peretinoin, an Acyclic Retinoid, Inhibits Hepatitis B Virus Replication by Suppressing Sphingosine Metabolic Pathway In Vitro.

Murai K, Shirasaki T, Honda M, Shimizu R, Shimakami T, Nakasho S, Shirasaki N, Okada H, Sakai Y, Yamashita T, Kaneko S. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 23;19(2). pii: E108. doi: 10.3390/ijms19020108. 査読有

Serum cytokine profiles predict survival benefits in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: a retrospective cohort study.

Hayashi T, Yamashita T, Terashima T, Suda T, Okada H, Asahina Y, Hayashi T, Hara Y, Nio K, Sunagozaka H, Takatori H, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. *BMC Cancer*. 2017 Dec 19;17(1):870. doi: 10.1186/s12885-017-3889-x. 査読有

Peretinoin, an acyclic retinoid, inhibits hepatocarcinogenesis by suppressing sphingosine kinase 1 expression in vitro and in vivo.

Funaki M, Kitabayashi J, Shimakami T, Nagata N, Sakai Y, Takegoshi K, Okada H, Murai K, Shirasaki T, Oyama T, Yamashita T, Ota T, Takuwa Y, Honda M, Kaneko S. *Sci Rep*. 2017 Dec 5;7(1):16978. doi: 10.1038/s41598-017-17285-2. 査読有

Sporadic PCDH18 somatic mutations in EpCAM-positive hepatocellular carcinoma.

Hayashi T, Yamashita T, Okada H, Nio K, Hara Y, Nomura Y, Hayashi T, Asahina Y, Yoshida M, Oishi N, Sunagozaka H, Takatori H, Honda M, Kaneko S. Cancer Cell Int. 2017 Oct 23;17:94. doi: 10.1186/s12935-017-0467-x. eCollection 2017. 査読有

Sorafenib suppresses extrahepatic metastasis de novo in hepatocellular carcinoma through inhibition of mesenchymal cancer stem cells characterized by the expression of CD90.

Yoshida M, Yamashita T, Okada H, Oishi N, Nio K, Hayashi T, Nomura Y, Hayashi T, Asahina Y, Ohwada M, Sunagozaka H, Takatori H, Colombo F, Porretti L, Honda M, Kaneko S.

Sci Rep. 2017 Sep 12;7(1):11292. doi: 10.1038/s41598-017-11848-z. 査読有

A Novel mTOR Inhibitor; Anthracimycin for the Treatment of Human Hepatocellular Carcinoma.

Hayashi T, Yamashita T, Okada H, Oishi N, Sunagozaka H, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Asahina Y, Yoshida M, Hashiba T, Suda T, Shirasaki T, Igarashi Y, Miyanouchi K, Yamashita T, Honda M, Kaneko S.

Anticancer Res. 2017 Jul;37(7):3397-3403. 査読有

Peretinoin, an acyclic retinoid, suppresses steatohepatitis and tumorigenesis by activating autophagy in mice fed an atherogenic high-fat diet.

Okada H, Takabatake R, Honda M, Takegoshi K, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Sakai Y, Shimakami T, Nagata N, Takamura T, Tanaka T, Kaneko S.

Oncotarget. 2017 Jun 20;8(25):39978-39993. doi: 10.18632/oncotarget.18116. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

Levodocarnitine improves liver histology and the development of hepatocellular carcinoma in the atherogenic high-fat diet NASH-HCC mouse model

Hikari Okada, Masao Honda, Hajime Sunakozaka, Shuichi Kaneko

AASLD 2018 第 69 回米国肝臓学会議 poster

Promoted liver fibrosis and malignant phenotype in HCV/PDGF-C transgenic mice are accompanied by abnormal expression of the glycolysis-related gene pyruvate kinase M.

Hikari Okada, Masao Honda, Jean S Campbell, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Kazunori Kawaguchi, Takuji Tanaka, and Shuichi Kaneko

AASLD 2017 第 68 回米国肝臓学会議 poster

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：肝細胞癌株、およびそれを用いた肝細胞癌発症動物モデル

発明者：金子周一、本多政夫、山下太郎、岡田光、村居和寿、院南結香

権利者：同上

種類：特許権

番号：特願 2017-209587

出願年：平成 29 年 10 月 31 日

国内外の別：国内

名称：抗がん剤及び新規医薬のスクリーニング方法

発明者：山下太郎、金子周一、本多政夫、清木元治、岡田光

権利者：同上

種類：特許権

番号：特願 2017-204777

出願年：平成 29 年 10 月 31 日

国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。