

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15073

研究課題名(和文)肥満誘導性肝がんにおける老化細胞由来のエクソソームの役割の解明

研究課題名(英文)The role of senescent cell-derived exosomes in obesity-induced liver cancer

研究代表者

羅 智文 (LOO, TZE MUN)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞老化プロジェクト・研究員

研究者番号：40816998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、様々な研究や疫学調査の結果から、肥満はがんの発症を促進することが指摘されている。申請者はこれまでに肥満による肝がんの発症機構の一つとして、肝臓の肝星細胞の細胞老化に着目して研究を行い、細胞老化を起こした肝星細胞が肝がんの進展を促進することを報告。しかし、細胞老化を起こした肝星細胞が肝実質細胞を腫瘍化する詳細な分子機構は未だ解明されていない。一方で、最近の研究により細胞から分泌された細胞外分泌小胞が周囲の細胞の腫瘍化を促進することが報告されている。そこで、本研究では細胞老化を起こした肝星細胞より分泌される細胞外分泌小胞に着目し、肝実質細胞の腫瘍化を引き起こす分子メカニズムについて解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から、申請者は肥満誘導性肝がんモデルマウスの腫瘍部において著しい代謝変化が起きていることを明らかにした。更に、申請者脂肪肝を模した条件下で肝星細胞を培養したところ、肝星細胞における細胞外分泌小胞の分泌量が増加することがわかった。また、脂肪肝を模した条件で肝星細胞株と肝臓がん細胞株を共培養したところ、細胞における代謝遺伝子の発現パターンが変化することを明らかにした。このことから、肝腫瘍内にこれらの細胞が細胞外分泌小胞を介して相互作用し、細胞の代謝経路に影響を与えていることが示唆された。そのため、細胞老化を起こした肝星細胞を標的とした新規の肝がん治療法や予防法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recently various studies and epidemiological studies have pointed out that obesity promotes the development of cancer. As one of the mechanisms for developing liver cancer caused by obesity, we were focusing on cellular senescence of hepatic stellate cells and reported that senescent hepatic stellate cells promote the development of liver cancer. However, the molecular mechanisms of senescent hepatic stellate cells to cause the malignant alteration of hepatocyte is still unknown. On the other hand, various studies have reported that extracellular secretory vesicles secreted from cells promote tumorigenesis. Therefore, in this study, we analyzed the extracellular secretory vesicles secreted by senescent hepatic stellate cells that cause the malignant transformation of hepatocyte.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：脂肪肝 代謝 細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近の研究や疫学調査の結果から、肥満は心筋梗塞や糖尿病だけではなく、様々ながんの発症を促進することが指摘されている。そのため、肥満を防止するだけではなく、肥満してもがんを発症しないような取り組みが必要である。

申請者はこれまでに肥満が肝がんの発症を誘発することを明らかにした。そして、この肥満による肝がんの発症には肝臓の間質系細胞である肝星細胞の細胞老化が重要な役割を果たしていることを見出し報告してきた (Yoshimoto S, Loo TM *et al.*, Nature, 2013)。「細胞老化」とは正常細胞にがん遺伝子の活性化や修復不可能なほど大きな DNA 損傷が生じた際に、異常を持った細胞の増殖を防ぐために誘導される不可逆的な増殖停止状態であり、アポトーシスと並ぶ重要ながん抑制機構として知られている。しかし、細胞老化を起こした細胞(老化細胞)は生体内で単に増殖を停止しているだけでなく、炎症性サイトカインやケモカイン、増殖因子など様々な炎症性蛋白質を高発現し細胞外へと分泌する Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) と呼ばれる現象を起こすことが明らかになっている。そして、老化細胞が分泌する SASP 因子が周囲の細胞に腫瘍化を促進することが示唆される。申請者は、肥満誘導性肝がんの発症機構を解明するために研究を進めたところ、腸内細菌が産生する 2 次胆汁酸デオキシコール酸 (Deoxycholic Acid, DCA) が肝星細胞の細胞老化を誘導し、老化した肝星細胞が分泌する IL-1 などの SASP 因子が肝がんの発症に関与することを世界に先駆けて報告した (Yoshimoto S, Loo TM *et al.*, Nature, 2013)。更に、申請者は肥満誘導性肝がんの悪性化機構の一端として、細胞老化を起こした肝星細胞が分泌する SASP 因子やプロスタグランジン E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) が、免疫細胞の抗腫瘍作用を抑制し、肝腫瘍の進展を促進することを明らかにしてきた (Loo TM *et al.*, Cancer Discovery, 2017)。しかし、根本的な疑問として、細胞老化を起こした肝星細胞が一体どのような機構を介して肝実質細胞の腫瘍化を引き起こし発がんに寄与するのかについては全く解明できていない。

近年、直径 40 ~ 100nm の細胞外分泌膜小胞であるエクソソームには、他の細胞の代謝機能を制御する機能があることが示唆されている (Hongyun Zhao *et al.*, eLife, 2016)。また、申請者の所属研究室では、細胞が老化すると炎症性蛋白質だけでなくエクソソームの分泌も亢進し (Takahashi A *et al.*, Nat Commun, 2017)、老化細胞が分泌するエクソソームが周囲の細胞の腫瘍化に働くことを報告している (Takasugi M *et al.*, Nat Commun, 2017)。更に、申請者の使用した肥満誘導性肝がんモデルでは、肝実質細胞の代謝異常がおきていることを見出した。このことから、申請者は肥満誘導性肝がんにおいて老化した肝星細胞がエクソソームを介して肝実質細胞の代謝を制御し、発がんを促進するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究の目的は、細胞老化を起こした肝星細胞より分泌されるエクソソームが肝実質細胞の代謝を攪乱し腫瘍化を引き起こす分子メカニズムを解明し、新たな肝がんの予防法や治療法の開発に繋げることである。

3. 研究の方法

本研究では肥満誘導性肝がんにおいて肝星細胞が分泌するエクソソームによって肝実質細胞が腫瘍化するメカニズムを明らかにすることである。そのため、申請者はまずがん遺伝子 *Hras* に活性化型変異を高頻度に起こす化学発がん物質 DMBA を乳児期のマウスの背中に一回だけ塗

布して、全身に発がんストレスを加えた後、高脂肪食または普通食を摂取させ 30 週間飼育し、肝がんの形成を誘導した。その後、肝臓の非腫瘍部と腫瘍部における代謝状態を調べた。更に、申請者はヒト肝星細胞株やヒト肝がん細胞株を用いて脂肪肝を模した環境下で培養し、エクソソームの分泌や代謝状態の変化を調べた。

4. 研究成果

● 肥満誘導性肝がんモデルマウスにおける糖代謝状態の変化

申請者はがん遺伝子 *Hras* に活性化型変異を高頻度を起こす化学発がん物質 DMBA を乳児期のマウスの背中に一回だけ塗布して、全身に発がんストレスを加えた後、高脂肪食または普通食を摂取させ 30 週間飼育し、肝がんの形成を誘導した。これまでに申請者はこの肥満による肝がんの発症には肝臓の間質系細胞である肝星細胞の細胞老化が重要な役割を果たしていることを見出し報告した。しかし、細胞老化を起こした肝星細胞が一体どのような機構を介して肝実質細胞の腫瘍化を引き起こし発がんに寄与するのかについては全く解明できていない。申請者は肥満誘導性肝がんモデルマウスに形成した腫瘍を解析しているうちに、肝臓の腫瘍部において非腫瘍部に比べて著し代謝の変化を起きていること確認した。申請者は腫瘍部において糖代謝に関わる代謝遺伝子の発現が低下しているにも関わらず、その代謝産物が多く蓄積していることを見出した（図 1）。

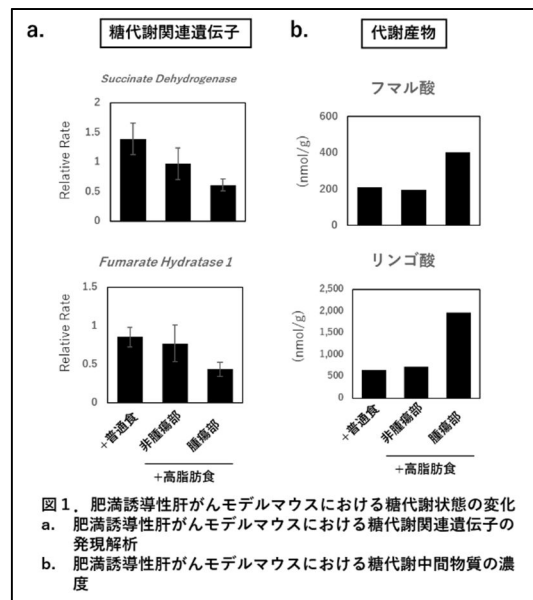


図 1. 肥満誘導性肝がんモデルマウスにおける糖代謝状態の変化
a. 肥満誘導性肝がんモデルマウスにおける糖代謝関連遺伝子の発現解析
b. 肥満誘導性肝がんモデルマウスにおける糖代謝中間物質の濃度

● 細胞老化を起こした肝星細胞が多くのエクソソームを分泌する

先に述べたように、肥満誘導性肝がんモデルマウスの腫瘍部において糖代謝関連遺伝子の発現が低下しているに対して、その代謝産物が多く蓄積されている。そのため、申請者はこの蓄積されている代謝産物が肝実質細胞から産生されたものではなく、他の細胞から供用したのではないかと考えた。実際、近年の研究からがん関連線維細胞(CAF)由来の代謝産物が周囲の腫瘍細胞に取り込まれ、腫瘍細胞の悪性を促すことが報告されている。また、その輸送が細胞外分泌膜小胞であるエクソソームを介していることが示唆されている。そのため、申請者はヒト肝星細胞株を用いて脂肪肝を模した環境下で培養したところ、エクソソームの分泌量が増加することが分かった。さらに、申請者は老化誘導した肝星細胞における代謝関連遺伝子の発現を調べたところ、脂肪肝を模した環境下で培養することで代謝関連遺伝子の発現が上昇していることが分かった。このことから、肥満誘導性肝がんにおいて肝星細胞がエクソソームを介して肝実質細胞に代謝物を提供していることが示唆された。

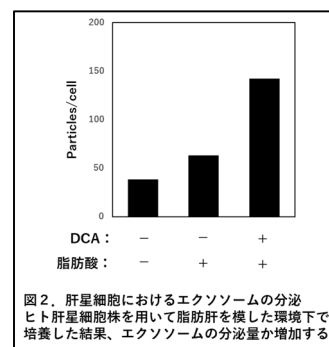


図 2. 肝星細胞におけるエクソソームの分泌
ヒト肝星細胞株を用いて脂肪肝を模した環境下で培養した結果、エクソソームの分泌量が増加する

- **細胞老化を起こした肝星細胞による肝実質細胞の脂質代謝状態の変化**

次に、申請者は肝星細胞がエクソソームを介して肝実質細胞の代謝に影響を及ぼすのかを検証するため、老化誘導した肝星細胞由来の培養上清を肝実質細胞に添加した。その結果、老化誘導した肝星細胞由来の培養上清で培養した肝実質細胞に脂質が蓄積される傾向が観察された。更に、老化誘導した肝星細胞由来の培養上清で培養した肝実質細胞において脂質酸化に関わる遺伝子の発現が低下していることも確認された。

また、老化誘導した肝星細胞と肝実質細胞株を共培養したところ、同じように脂質酸化に関わる遺伝子の発現が低下することも分かった（図 2a）。次に、申請者がこの蓄積された脂質が肝腫瘍の形成に関わるのかを調べるため、脂質の酸化を促進できる化合物、カルニチンをマウスに投与した。その結果、カルニチンを摂取したマウスにおいて肝腫瘍の形成が有意義に低下していることが分かった（図 2b）。これらの結果から、細胞老化を起こした肝星細胞が肝実質細胞の脂質代謝を調節し、肝腫瘍の形成を促進することが示唆される。

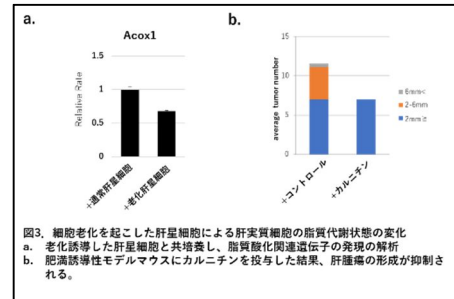


図3. 細胞老化を起こした肝星細胞による肝実質細胞の脂質代謝状態の変化
a. 老化誘導した肝星細胞と共培養し、脂質酸化関連遺伝子の発現の解析
b. 肥満誘導性モデルマウスにカルニチンを投与した結果、肝腫瘍の形成が抑制される。

これまでの肥満誘導性肝がんに関する研究の多くは、四塩化炭素や DEN などを用いたマウスモデルであり、マクロファージなどの免疫細胞による炎症反応に着目した研究が主であった。しかし、がん微小環境内における細胞間の相互作用による影響は十分に解明されていない。今回の研究から、申請者が肥満誘導性肝がんにおいて細胞老化を起こした肝星細胞が肝実質細胞の代謝系を調節し、肝腫瘍の形成に影響を及ぼすことを見出した。このため、老化した肝星細胞を治療の標的になる可能性が示された。今後、老化した肝星細胞におけるエクソソームの分泌を阻害し、原因因子を同定することで、肥満誘導性肝がんの新たな肝がんの予防法や治療法の開発に繋げようとか実験を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hitomi Kazuhiro, Okada Ryo, Loo Tze Mun, Miyata Kenichi, Nakamura Asako J., Takahashi Akiko	4. 巻 21
2. 論文標題 DNA Damage Regulates Senescence-Associated Extracellular Vesicle Release via the Ceramide Pathway to Prevent Excessive Inflammatory Responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3720 ~ 3720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21103720	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 -

1. 著者名 Loo Tze Mun, Miyata Kenichi, Tanaka Yoko, Takahashi Akiko	4. 巻 111
2. 論文標題 Cellular senescence and senescence associated secretory phenotype via the cGAS STING signaling pathway in cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 304 ~ 311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14266	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Loo Tze Mun
2. 発表標題 Gut microbiota-derived metabolite and cell wall component promote obesity-associated liver cancer through PGE2-mediated suppression of antitumor immunity
3. 学会等名 Keystone Symposia -Tumor Metabolism-（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----