

令和 3 年 4 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17489

研究課題名(和文) 肝星細胞オートファジーの癌微小環境を通じた肝癌細胞増殖機序の解明

研究課題名(英文) Liver cancer cells manipulate stromal cells involved in fibrosis to promote tumor growth

研究代表者

明神 悠太 (Yuta, Myojin)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20838817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の周囲にがんの増殖に有利ながん微小環境を構築することが知られている。肝星細胞は、肝臓の線維化において中心的な役割を担い、がんの微小環境において、肝がん細胞と相互作用して、がんの進展に関与しているのではないかと考えられていた。本研究では肝がん細胞によって肝星細胞のオートファジーが亢進し、肝星細胞からGDF15が分泌されることによって、肝がん細胞の増殖が促進しました。肝星細胞のGDF15を欠損させた肝がんモデルマウスでは、肝がん進展は抑制されました。ヒト肝がん組織中の肝星細胞でもGDF15の発現を認め、血清GDF15濃度が高い肝細胞がん患者さんは予後が不良であることも明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかでなかった肝星細胞と肝がん細胞の相互作用について今後より研究が発展することが望まれます。今後GDF15に対する中和抗体などGDF15を標的とした治療が、肝がん患者さんに対する新たな治療選択肢の1つとして臨床開発されることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC), frequently seen in patients with liver cirrhosis caused by alcohol abuse or chronic viral hepatitis, is the most common form of liver cancer worldwide. As such, it is the third-most common cause of cancer-related death and has a notoriously poor prognosis. At present, surgery is the most effective treatment for HCC, but is only successful in the 10-20% of cases where cancer cells have not spread beyond the liver. We have found that liver cancer cells induce autophagy in hepatic stellate cells, causing them to produce a growth factor called GDF15 that promotes tumor growth. GDF15 was more highly expressed in tumor tissue than normal liver tissue, and patients with higher levels of GDF15 had a poorer prognosis. New therapies targeting GDF15 may help prevent the development and proliferation of hepatocellular carcinoma.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝細胞癌 肝星細胞 GDF15 単一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎、B型肝炎、並びに近年増加傾向にある非アルコール性脂肪肝炎(NASH)などの慢性肝疾患の患者さんは病気の進行に伴い肝細胞がんを併発することが知られており、その発症は生命予後に大きな影響を与えます。肝がんは、現在国内においてがんによる死亡原因のうち第5位となっている極めて予後不良な疾患です。

肝細胞がんを含む多くのがんでは腫瘍細胞を取り巻く免疫細胞・線維芽細胞・血管内皮細胞といった間質の細胞とがん細胞そのものが相互作用を介して発育進展に関与していると考えられています。このようながんの微小環境において、線維芽細胞は間質の線維の産生のみならず多種の増殖因子を放出していると考えられています。肝臓の類洞に存在する肝星細胞は、肝細胞が炎症を起こした際に活性化して線維芽細胞となつて、細胞外マトリクスタンパク質を放出して肝臓内で線維物質を産生します。ウイルス性肝炎などによって慢性的に肝臓に炎症が生じると、肝星細胞が中心的役割を担って線維化を進展させることが分かっています。この肝星細胞の活性化にオートファジーの亢進が関与するとこれまでいくつかのグループが発表してきました。しかし、線維化の中心的役割を担う肝星細胞が肝がんの微小環境において、どのようにがん細胞と相互作用を有するのかわかっていませんでした。

2. 研究の目的

肝がんの微小環境において肝星細胞と肝がん細胞の相互作用について肝星細胞のオートファジーを操作することによって明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 細胞をもちいた検討

ヒト肝癌細胞の細胞株とヒト肝星細胞株を使用して、共培養実験を行い、共培養後の細胞から mRNA の抽出や蛋白の抽出を行い、遺伝子発現の変化を検討しました。オートファジーの状態の検討にはオートファジーの状態に応じて GFP と RFP の蛍光強度が変化するプローブを肝星細胞に導入して検討をおこないました。また、肝星細胞の Atg7 や GDF15 のノックアウト細胞はレンチウイルスベクターを用いて作成しました。これらの肝星細胞と肝がん細胞を免疫不全マウスに共移植を行い、腫瘍増大速度を検討しました。

(2) マウスをもちいた検討

肝星細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する GFAP-Cre マウスと Atg7, GDF15 をそれぞれ loxp 配列で挟んだ Atg7 floxed マウス、GDF15 floxed マウスを交配して、肝星細胞特異的に Atg7 および GDF15 をそれぞれノックアウトしたマウスを作成しました。これらのマウスに対して、ストレプトゾトシンの注射と高脂肪食により NASH 肝癌を来すモデルを適応して、肝臓の線維化や肝腫瘍の発育進展について検討をおこないました。背景肝は組織染色や遺伝子発現の解析により脂肪化や線維化の程度について検討を行いました。腫瘍部については免疫染色や遺伝子発現の解析で細胞増殖の程度や GDF15 発現を検討しました。

(3) 臨床検体を用いた検討

ヒト肝がん切除検体を用いて、腫瘍部・非腫瘍部の遺伝子発現について検討を行いました。具体的には腫瘍部・非腫瘍部の蛋白発現をウエスタンブロットで定量しました。GDF15 発現細胞の分布を明らかにするために免疫組織化学染色を行いました。腫瘍組織内の肝星細胞の遺伝子発現を検討するために単一細胞解析を行いました。

4. 研究の成果

肝星細胞と肝がん細胞の相互作用について、細胞実験・動物実験・臨床サンプルをもちいた研究で検証を行いました。

(1) 細胞実験

肝星細胞と肝がん細胞を一緒に培養すると、肝星細胞のオートファジーが亢進すること、また、肝がん細胞の増殖が促進することを見出しました。さらに、オートファジーを停止させた肝星細胞を肝がん細胞とともに免疫不全マウスに移植したところ、正常な肝星細胞を移植した場合と比較して、腫瘍増殖が抑えられることが分かりました。次に、肝がん細胞と一緒に培養することで発現が増加し、肝星細胞のオートファジーを抑制することで減少するような肝星細胞分泌タンパクを網羅的に検索し、GDF15 を同定しました。培養細胞を用いた実験では、肝星細胞の GDF15 を抑制すると肝がん細胞の増殖は抑制されました。また、前述の免疫不全マウスに移植したところ、正常な肝星細胞と移植した場合と比較して GDF15 を抑制した肝星細胞と肝がん細胞を移植すると腫瘍の増大が抑制されました。

(2) マウスをもちいた実験

肝がんモデルマウスを用いた実験では、肝星細胞のオートファジーを抑制すると、肝がん細胞増殖・肝がん進展が抑制されることを明らかにしました。このとき、背景の肝臓においては線維化も抑制されました。細胞実験で明らかとなった、オートファジー依存的に変化する GDF15 を肝星細胞特定的にノックアウトすると、肝がんモデルマウスを用いた実験では、肝がんの進展は抑制されました。一方で背景の肝線維化には影響を及ぼしませんでした。

(3) ヒト臨床検体をもちいた検討

肝切除検体を用いたシングルセルシーケンス・免疫染色の結果、ヒト肝細胞癌の腫瘍内にも GDF15 を発現した肝星細胞が存在することを明らかにしました。また肝細胞がん患者の血清 GDF15 の濃度は高く、血清 GDF15 濃度が高い肝細胞がん患者さんは予後が不良でした。これらの結果から、肝がん微小環境における肝星細胞は、オートファジーの亢進を介して GDF15 を分泌し、肝がんを増大させる役割があることを見出し、肝がん細胞と肝星細胞の相互作用機序を明らかにしました。

5. 今後

今回えられた知見をもとに、GDF15 の治療標的やバイオマーカーとしての意義について研究を行うとともに、肝星細胞と肝がん細胞の相互作用について GDF15 以外の遺伝子についても追加検討を行う予定である。

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 1件）

1. 著者名 Myojin Yuta, Hikita Hayato, Sugiyama Masaya, Sasaki Yoichi, Fukumoto Kenji, Sakane Sadatsugu, Makino Yuki, Takemura Nobuyuki, Yamada Ryoko, Shigekawa Minoru, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Kobayashi Shogo, Tatsumi Tomohide, Suemizu Hiroshi, Eguchi Hidetoshi, Kokudo Norihiro, Mizokami Masashi, Takehara Tetsuo	4. 巻 160
2. 論文標題 Hepatic Stellate Cells in Hepatocellular Carcinoma Promote Tumor Growth Via Growth Differentiation Factor 15 Production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1741 ~ 1754.e16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.12.015	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 Myojin Yuta, Kodama Takahiro, Maesaka Kazuki, Motooka Daisuke, Sato Yu, Tanaka Satoshi, Abe Yuichi, Ohkawa Kazuyoshi, Mita Eiji, Hayashi Yoshito, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Taguchi Ayumu, Eguchi Hidetoshi, Takehara Tetsuo	4. 巻 27
2. 論文標題 ST6GAL1 Is a Novel Serum Biomarker for Lenvatinib-Susceptible FGF19-Driven Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1150 ~ 1161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-20-3382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yuta Myojin, Hayato Hikita, Masaya Sugiyama, Takahiro Kodama, Yuki Makino, Ryoko Yamada, Tasuku Nakabori, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Masashi Mizokami, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Hepatic stellate cell autophagy promotes HCC progression via GDF15
3. 学会等名 The Digital International Liver Congress of the European Association for the Study of the Liver (国際学会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 疋田隼人、明神悠太、竹原徹郎
2. 発表標題 肝星細胞のGDF15を介した肝癌増殖促進機構
3. 学会等名 第34回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 明神悠太、疋田隼人、小玉尚宏、牧野祐紀、阪森亮太郎、巽智秀、溝上雅史、江口英利、竹原徹郎
2. 発表標題 肝星細胞がオートファジー依存的に分泌するGDF15は肝細胞癌の進展に寄与する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 明神悠太、疋田隼人、竹原徹郎
2. 発表標題 肝癌微小環境における肝星細胞のオートファジーを介したGDF15の意義
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Yuta Myojin, Hayato Hikita, Masaya Sugiyama, Takahiro Kodama, Yuki Makino, Ryoko Yamada, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Masashi Mizokami, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 GDF15 secreted by hepatic stellate cells accelerates HCC progression in an autophagy-dependent manner
3. 学会等名 The Liver Meeting Digital Experience (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 明神悠太、疋田隼人、竹原徹郎
2. 発表標題 肝癌発育進展における肝星細胞オートファジーの意義
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yuta Myojin, Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Ryoko Yamada, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Autophagy in hepatic stellate cells accelerates HCC progression via GDF15
3. 学会等名 JSH International Liver Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yuta Myojin, Hayato Hikita, Masaya Sugiyama, Takahiro Kodama, Yuki Makino, Ryoko Yamada, Tasuku Nakabori, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Masashi Mizokami, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Hepatic stellate cell autophagy promotes HCC progression via GDF15
3. 学会等名 The 55th International Liver Congress of the EASL (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 明神悠太、疋田隼人、竹原徹郎
2. 発表標題 肝癌微小環境における肝星細胞のオートファジーを介したGDF15の意義
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年～2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------