

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16309

研究課題名（和文）mRNA分解制御に着目した肥満誘導性肝がん新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Search for new therapeutic targets for obesity-induced liver cancer focusing on mRNA degradation regulation

研究代表者

山岸 良多（Yamagishi, Ryota）

大阪公立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30793145

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、脂肪肝を素地とする肥満誘導性肝がんは著しい増加傾向にあり、その発症・進展の予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。本研究では、肥満誘導性肝がんの発症に関連するSASP因子について解析した結果、サイトカインIL-33が、肝がん腫瘍部内の肝星細胞で特に高発現しているSASP因子であることを見出した。さらにSASP因子の細胞外放出機構として、SASP因子のIL-33はパイロトーシス実行因子ガスダーミンDが細胞膜上に形成する小孔を通じて細胞外へと放出され、その後、受容体であるST2を発現するTregを介して抗腫瘍免疫を抑制するという一連の機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝がんは、5年生存率が35.8%程度（がん腫別統計2021）と低い。そのため、肝がんの原因遺伝子を探るためのゲノム解析が、世界的に進められているが、発症に結びつく特定の原因遺伝子変異は見つかっていない。その中で、これまで肝がんの半数以上を占めてきたウイルス性肝がんは有効な抗ウイルス薬の開発により減少傾向となっている。一方で、脂肪肝を背景とする肥満誘導性肝がんは著しい増加傾向にあり、その予防法・治療法の開発は喫緊の課題となっている。そのため、肝がん微小環境に着目した本研究の成果は、肥満誘導性肝がんの治療法開発に繋がる有用な成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the number of patients with obesity-induced hepatocellular carcinoma (HCC) based on fatty liver has been increasing steadily, and the development of preventive and treatment methods is urgently needed. In this study, as a result of analyzing the SASP factors related to the development of obesity-induced liver cancer, we found that the cytokine IL-33 is a SASP factor that is particularly highly expressed in hepatic stellate cells (HSCs) in the obesity-induced liver tumor. Furthermore, as a mechanism for the extracellular release of SASP factors, the SASP factor IL-33 is released outside the HSCs through pores formed on the cell membrane by the pyroptosis-executing factor gasdermin D. The released IL-33 promoted HCC development through activating ST2-positive Treg cells. Our findings could lead to new insights for understanding obesity-induced HCC progression.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肥満誘導性肝がん SASP 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

疫学研究の結果、肥満は肝がんのリスクファクターとなることが示されており、実際に、脂肪性肝炎を背景とする肥満誘導性肝がんは年々増加している。そのため、肥満が肝がん発症を促進するメカニズムの解明や、治療における適切な分子標的の同定は重要な課題となっている。そこで、所属研究室では、これまでに肥満誘導性肝がんマウスモデル系を確立し、発症メカニズムの一端を見出している。その中で、肥満時に増加する腸内細菌代謝産物デオキシコール酸 (deoxycholic acid, DCA) が腸肝循環によって肝臓に達し、間質に存在する肝星細胞の細胞老化を誘導すること、さらにこの細胞老化を起こした肝星細胞が SASP (senescence-associated secretory phenotype) 因子と呼ばれる様々な炎症性サイトカイン、プロテアーゼ、増殖因子等、多数の因子を同時に産生し、肝がん促進的な微小環境を形成することを明らかにした (Yoshimoto et al. Nature 2013)。しかし、この多種多様な SASP 因子が肝星細胞内においてどのようなメカニズムで同時に発現誘導がなされるか、また多種多様な SASP 因子の中でも、どの因子が肝がん進行の鍵となるのか、明らかにされていない。そのため SASP 因子は、肝がん発症に重要な要素でありながらも、治療標的として検証を進めるのは困難となっている。

2. 研究の目的

本研究では、肥満誘導性肝がんの発症において重要な SASP 因子の発現制御機構並びに肝がん進展において特に重要となる SASP 因子を明らかにする。また SASP は、分泌現象と呼ばれながらも SASP 因子の細胞外放出機構はこれまで明らかとなっていなかった。そこで、本研究では、SASP 因子の産生から分泌に至る制御機構を明らかにし、肝がんの発症機構の解明及び治療標的の探索に発展させることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、肝がん微小環境内の細胞老化を起こした肝星細胞における SASP 因子の発現制御および細胞外放出機構について解析を行うため、脂肪が蓄積した肝がん組織から高純度の肝星細胞を単離する必要が考えられた。そこで、まず我々は独自に細胞単離法の検討を行い、6 の低温条件下で酵素処理法を行うことで、高純度かつ生存率の高い細胞を取得する細胞単離法の確立 (Cheng, et al. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2022) し、これにより得られた肝星細胞を用いて解析を実施していった。また in vivo 系においてはこれまで、所属研究室内で独自に開発された高脂肪食給餌による肥満誘導性肝がんマウスモデル系を用い、SASP 因子の発現および腫瘍形成について評価を行なった。

4. 研究成果

1) 肝星細胞内では SASP mRNA が安定化する。

肝がん腫瘍部および正常肝臓組織から単離した肝星細胞に対して、リアルタイム PCR により SASP mRNA の発現解析を行ったところ、正常肝由来の肝星細胞に比べ、腫瘍部由来の肝星細胞は SASP 因子が高発現していることが確認された (図 1)。さらに転写阻害剤であるアクチノマイシンで肝星細胞を処理したところ、腫瘍部由来の肝星細胞では、Cxcl1 等の SASP 因子の mRNA 半減期が長くなっていることが認められ、腫瘍部由来の肝星細胞では、SASP mRNA が安定化することで、発現量が増加する可能性が示された。

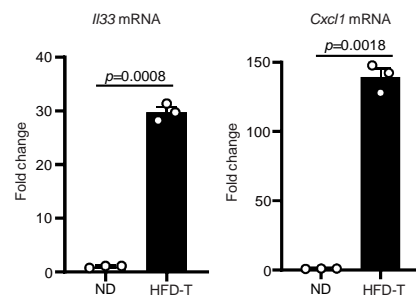


図 1. 通常食を給餌した正常肝 (ND) および高脂肪食を給餌した肝がん組織腫瘍部領域 (HFD) 由来の肝星細胞内の SASP 因子 mRNA を定量 PCR により解析した。

2) SASP 因子 IL-33 は肥満誘導性肝がんを進展させる。

肝がん進展に重要な SASP 因子を明らかにするため、まず肝がん組織におけるサイトカインの網羅的な発現解析を行ったところ、IL-33 が非腫瘍部と比べて腫瘍部で最も高く発現するサイトカインであることを見出した。また、IL-33 は腫瘍部内の老化肝星細胞で高発現していることを確認した。さらに、IL-33 ノックアウトマウスでは肝腫瘍形成が抑制され、逆に野生型マウスに IL-33 を投与すると肝腫瘍形成が促進することが確認され、IL-33 が肝がん進展に重要な SASP 因子であることが明らかとなった (図 2)。

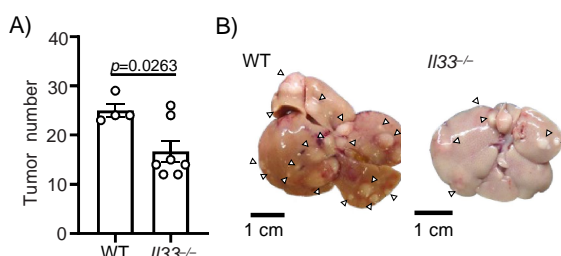


図 2. IL-33 ノックアウトマウス (Il33^{-/-}) では野生型 (WT) に比べ肥満誘導性肝がんの腫瘍形成が抑制される。A) 腫瘍形成数、B) 肝臓組織画像

3) IL-33 は GSDMD-N を介して細胞外へ放出される。

次に IL-33 の細胞外放出機構について解析を行った。IL-33 の細胞外放出機構については、これまでアレルギーの分野で解析が行われており、IL-33 は上皮細胞にコピキタスに発現し、感染による細胞損傷時、ネクローシスによって細胞外へと放出されるアラミンとして知られていた(Faget et al. Immunology 2016)。しかし、肝がん微小環境内の肝星細胞は SASP を持続したまま肝臓内で生存し続けており、IL-33 がネクローシスによる細胞死によって細胞外へ放出されるとは考えづらかった。本研究では、肝がんモデルマウスは、腸管バリアが脆弱化し、肝臓内ではグラム陽性腸内細菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸 (Lipoteichoic acid, LTA) が多く蓄積することを確認していた(図 3)。そこで、単離直後のフレッシュな肝星細胞に対しリポタイコ酸添加条件下で培養を行なった。その結果、IL-33 や IL-1 といった SASP 因子の細胞外放出が確認された(図 4)。さらにこの時、腫瘍部由来の肝星細胞内では、ガスダーミン D というタンパク質の切断型 N 末端 (GSDMD-N) が形成されることが確認された(図 4)。この GSDMD-N は、細胞膜上で小孔を形成することが知られており、マクロファージなどの細胞では、この小孔を通じてサイトカインが細胞外へ放出されることが報告されていた(Evavold et al. Immunity 2018)。そこで、ガスダーミン D をノックダウンしたところ、IL-33 や IL-1 の細胞外放出が抑制されることが確認された。さらに GSDMD-N の阻害剤として報告されているジスルフィラム(Hu et al. Nature Immunology 2020)を添加することでも肝星細胞からの SASP 因子の放出が抑制され、また肝がんモデルマウスにジスルフィラムを投与することで腫瘍形成が有意に抑制されることが確認された。これらの結果から、SASP 因子 IL-33 や IL-1 は GSDMD-N を介して細胞外へと放出され、肝がんを進展させることが明らかとなった。

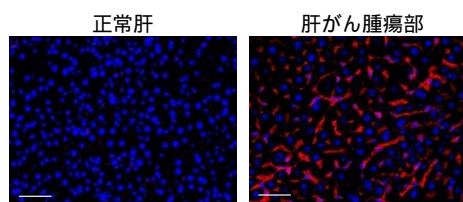


図 3.高脂肪食を給餌した肝がんモデルマウス肝臓内では LTA が蓄積する。LTA,赤、核染色(DAPI),青

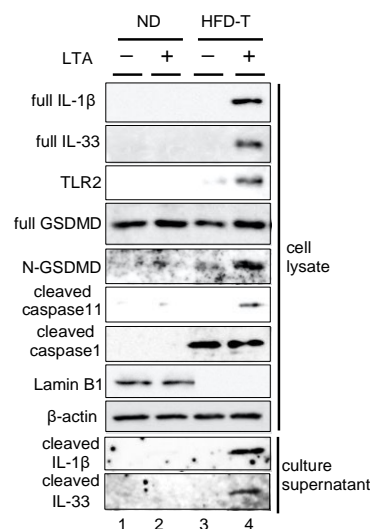


図 4. 肝がん腫瘍部由来の肝星細胞を LTA 添加条件下で培養したところ、IL-1、IL-33 の産生・放出及び切断型 N 末 GSDMD の形成が確認された。

4) IL-33 は ST2 を介して Treg を活性化させる。

細胞外へと放出された IL-33 による腫瘍形成促進機構を解明する上で、IL-33 の標的細胞を探索するため、IL-33 の受容体である Suppression of Tumorigenicity 2 (ST2) の発現細胞に着目した。そこで、フローサイトメトリーを用いて ST2 の発現解析を行なったところ、肝がんモデルマウスの肝臓内では、ST2 を高発現している Treg 細胞が増加していることが確認された。そこで、Treg 細胞で ST2 を特異的に欠失させたコンディショナルノックアウトマウスにおいて、肝がん形成が有意に抑制されることを確認し、ST2 を発現する Treg 細胞に IL-33 が作用し、抗腫瘍免疫を抑制することで肝がんを進展させることが明らかになった。

以上の結果から、本研究により、肝がん進展に特に重要な SASP 因子として IL-33 が見出され、また、これまで未解明であった SASP 因子の細胞外放出機構を明らかとなった(Yamagishi et al Science Immunology 2022)。今後、本研究に明らかとなった SASP 因子の発現制御機構および GSDMD を含め SASP 因子の放出制御機構が、肝がんの新たな予防・治療法の開発につながることを期待される。

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamagishi R, Kamachi F, Nakamura M, Yamazaki S, Kamiya T, Takasugi M, Cheng Y, Nonaka Y, Yukawa-Muto Y, Thuy LTT, Harada Y, Arai T, Loo T-M, Yoshimoto S, Ando T, Nakajima M, Taguchi H, Ishikawa T, Akiba H, Miyake S, Kubo M, Iwakura Y, Fukuda S, Chen W-Y, Kawada N, Rudensky A, Nakae S, Hara E, Ohtani N	4. 巻 7
2. 論文標題 Gasdermin D-mediated release of IL-33 from senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abl7209	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 該当する

1. 著者名 Cheng Y, Yamagishi R, Nonaka Y, Sato-Matsubara M, Kawada N, Ohtani N	4. 巻 14
2. 論文標題 Non-heat-stressed method to isolate hepatic stellate cells from highly steatotic tumor-bearing liver using CD49a	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 964-966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.07.006	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19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Ryota Yamagishi, Fumitaka Kamachi, Tomonori Kamiya, Yoshiki Nonaka, Yoshimi Muto-Yukawa, Norifumi Kawada, Susumu Nakae, Eiji Hara, Naoko Ohtani
2. 発表標題 Gut-liver Axis-mediated Mechanism of NASH-associated Hepatocellular Carcinoma Progression
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference 2021 Osaka (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yi Cheng, Ryota Yamagishi, Yoshiki Nonaka, Huyen T. Vu, Yoshimi Yukawa-Muto, Misako Sato-Matsubara, Norifumi Kawada, Naoko Ohtani
2. 発表標題 A Novel Isolation Method of Hepatic Stellate Cells from Tumor Tissue of Obesity-associated Hepatocellular Carcinoma
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference 2021 Osaka (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 程 イ、大谷 直子、山岸 良多、蒲池 史卓
2. 発表標題 肥満関連肝癌腫瘍組織からの肝星細胞の分離法
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野中 允幾、山岸 良多、大谷 直子
2. 発表標題 シングルセル解析を利用した肥満誘導性肝がん微小環境における肝星細胞の系譜・性質解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryota Yamagishi, Fumitaka Kamachi, Tomonori Kamiya, Yoshiki Nonaka, Yoshimi Muto-Yukawa, Norifumi Kawada, Susumu Nakae, Eiji Hara, Naoko Ohtani
2. 発表標題 Gut-liver axis-mediated mechanism of NASH-associated hepatocellular carcinoma progression
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yi Cheng, Ryota Yamagishi, Yoshiki Nonaka, Naoko Ohtani
2. 発表標題 senescence phenotype in freshly isolated hepatic stellate cells (HSCs) by non-heat-stressed method from obesity-associated steatotic hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸 良多, 蒲池 史卓, 程 イ, 原 英二, 大谷 直子
2. 発表標題 肥満誘導性肝がん微小環境におけるSASP制御機構
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷 直子, 神谷 知憲, 蒲池 史卓, 山岸 良多
2. 発表標題 がんと代謝(免疫代謝を含む) 腸内細菌代謝物と肥満関連肝がん
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 浩也, 山岸 良多, 向井 智美, 田部 陽子, 三井田 孝, 関戸 好孝, 村上 優子
2. 発表標題 LATS2変異を有した悪性中皮腫におけるSMG6発現抑制による合成致死誘導機構の検討
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 浩也, 山岸 良多, 向井 智美, 田部 陽子, 三井田 孝, 村上 浩士, 関戸 好孝, 村上 優子[渡並]
2. 発表標題 LATS2変異を有した悪性中皮腫に対する合成致死誘導機構の検討
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸良多、武藤芳美、河田則文、大谷直子
2. 発表標題 IL-33によるNASH関連肝がん促進機構
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Yamagishi, Fumitaka Kamachi, Tomonori Kamiya, Yi Cheng, Yoshiki Nonaka, Norifumi Kawada, Susumu Nakae, Eiji Hara, Naoko Ohtani
2. 発表標題 IL-33 released from senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 APASL Oncology 2022 Single Topic conference in Takamatsu (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Yamagishi, Fumitaka Kamachi, Yi Cheng, Norifumi Kawada, Eiji Hara, Naoko Ohtani
2. 発表標題 IL-33 released from senescent hepatic stellate cell promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸良多、蒲池史卓、神谷知憲、高杉征樹、程イ、野中允幾、河田則文、中江進、原英二、大谷直子
2. 発表標題 がん微小環境における細胞老化とSASPの役割: ガスダーミンDを介するSASP因子の放出が肥満関連肝がんを促進させる
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Vu Thuong Huyen, Ryota Yamagishi, Naoko Ohtani
2. 発表標題 Regular exercise suppresses obesity associated liver cancer through activating Pgc-1 -Kynurenine degrading pathway
3. 学会等名 APASL Oncology 2022 Single Topic conference in Takamatsu (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Vu Thuong Huyen, Ryota Yamagishi, Naoko Ohtani
2. 発表標題 Regular exercise suppresses obesity associated liver cancer through activating Pgc-1 -Kynurenine degrading pathway
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野中允幾、山岸良多、程イ、大谷直子
2. 発表標題 肥満誘導性肝がん微小環境における腫瘍促進ネットワークの複合バイオインフォマティクス解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Nonaka, Ryota Yamagishi, Yi Cheng, Naoko Ohtani
2. 発表標題 Combined Bioinformatics on the Tumor Promoting Inter-cellular Network in Obesity-associated Liver Tumor Microenvironment
3. 学会等名 APASL Oncology 2022 Single Topic conference in Takamatsu (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野中允幾、山岸良多、程イ、小玉尚宏、大谷直子
2. 発表標題 肥満誘導性肝がん微小環境における腫瘍促進ネットワークの複合解析
3. 学会等名 NGS EXPO 2022
4. 発表年 2022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
---------	---------