

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18478

研究課題名(和文) P. gingivalis感染によるNASH関連肝癌促進メカニズムの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the mechanism of P. gingivalis-promoted NASH-related HCC

研究代表者

坂本 真一 (SAKAMOTO, Shinnichi)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：60848084

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)：マウスに高脂肪食を投与し、P.g.を60週歯性感染させたHFD-P.g.(+)群とHFD-P.g.(-)群の非腫瘍部肝組織にてトランスクリプトーム解析を行った結果、マクロファージマーカー(Lyz2)の上昇がみられた。HFD-P.g.(+)群では、免疫組織化学的に酸化的DNA傷害マーカー(8-OHdG)の上昇が認められた。これまでに、HFD-P.g.(+)群ではROS産生能を有するTNF- $\alpha$ に陽性のhCLSsが増加することを確認しており、P.g.歯性感染がhCLSsからのTNF- $\alpha$ 産生を促し、酸化的DNA傷害を惹起し、NASH関連肝癌マウスモデルの発癌過程に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌は世界で5番目に多い癌であり、癌関連死の2番目を占める。治療法の進歩により減少傾向にあるHCVやHBVによるウイルス発癌と比較し、肥満を契機として生じるNASH関連肝癌は急速に増加している。NASH関連肝癌の発症・進行メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、P.g.歯性感染によりNASH関連肝癌マウスモデルの発癌過程が促進される機序として、hCLSsから産生されるTNF- $\alpha$ による肝細胞の酸化的DNA傷害の関与が示唆された。歯科的介入による歯周病原細菌のコントロールが、NASH関連肝癌発生予防に有用となる可能性が示唆された点で、本研究の学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis of non-neoplastic liver tissues from HFD-P.g.(+) and HFD-P.g.(-) groups, in which mice were fed a high-fat diet and P.g. was infected odontogenically for 60 weeks, was conducted. In HFD-P.g.(+) group, macrophage marker (Lyz2) was elevated. Immunohistochemically, HFD-P.g.(+) group showed a significant increase in 8-OHdG, an oxidative DNA damage marker. Previously, we confirmed the increase of hCLSs positive for TNF- $\alpha$  (an inducer of ROS) in HFD-P.g.(+) group. These results suggest that upregulated TNF- $\alpha$  production via hCLSs induced by P.g. infection causes increased oxidative DNA damage, which plays an important role in promoting the process of hepatocarcinogenesis of NASH-related HCC mouse model.

研究分野：歯周病と全身疾患

キーワード：Porphyromonas gingivalis NASH関連肝癌 酸化ストレス hCLSs TNF- $\alpha$  8-OHdG

## 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炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)は、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型の1つである。NASHの総患者数は、世界の総人口の3~5% (3.5億人)にも及ぶとされており、肥満の増加に伴い世界的に増加することが予測される(Vernon G *et al.* 2011)。NASHは進行性病変で、アルコール性脂肪性肝炎と同様に線維化が生じ、それが進行し肝硬変、さらには肝細胞癌(NASH関連肝癌)に移行する可能性があることから深刻な健康問題であるといえる。肝細胞癌は、6番目に多い癌で、世界の癌関連死の2番目を占める。主な肝細胞癌の原因はC型肝炎ウイルス(HCV)やB型肝炎ウイルス(HBV)によるウイルス発癌であるが、それぞれ、直接作用型抗ウイルス薬や核酸アナログ製剤の開発によりHCVやHBVが原因となる肝癌は減少しつつある。一方で、NASH関連肝癌を含む非B非C肝癌の割合が増えてきている。NASH関連肝癌の発症・進行メカニズムは不明な点が多い。近年、肥満に伴う腸内細菌叢変化や、腸管壁透過性の亢進により腸内細菌やlipopolysaccharideなどの腸内細菌由来産物が門脈経路で肝臓に到達し、肝癌の発生に関与するという報告がなされているが、歯周病原細菌との関係は未だ報告がない。

### 2. 研究の目的

これまでに、高脂肪食(HFD)で長期間飼育したNASH関連肝癌マウスモデルを用いて、*P.g.* 歯性感染が、肝腫瘍の形成を促進する事を明らかにした(日本時間2023年6月6日時点でScientific Reportsにアクセプト)。その際、HFD-*P.g.*(+)群では、肝癌細胞での過剰発現が報告されているAKTの発現がHFD-*P.g.*(-)群に比べ、非腫瘍部肝組織ですでに有意に上昇していた。本研究では、AKTを基盤とした発癌経路解析のため、マウス肝組織のトランスクリプトーム解析を行い、*P.g.*によるNASH関連肝癌発生過程促進メカニズムを解明するとともに、NASH関連肝癌患者の肝組織パラフィンブロックを用い*P.g.*感染の有無によるAKTや関連タンパクの発現状況を比較し、NASH関連肝癌発生過程促進における*P.g.*感染によるAKT経路活性化の重要性を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### **(1) NASH 関連肝癌マウスモデル非腫瘍部凍結肝組織を用いたパスウェイ解析**

生後5週齢マウスにHFDを8週間投与し、*P.g.*を60週歯性感染させたHFD-*P.g.*(+)群とHFD-*P.g.*(-)群に加え、通常食(CD)で飼育したCD-*P.g.*(+)群とCD-*P.g.*(-)群の非腫瘍部凍結肝組織を使用し、次世代シーケンスを用いたトランスクリプトーム解析(mRNA発現解析)を行った。

#### **(2) 酸化ストレスマーカーの免疫組織化学的検討**

HFD-*P.g.*(+)群とHFD-*P.g.*(-)群の非腫瘍部における8-OHdG(酸化ストレスマーカー)発現状況の確認のため、免疫組織化学的染色を行い、比較検討した。

#### **(3) 非B非C肝癌患者、HCV陽性肝癌患者の手術材料を用いた*P.g.*感染状況の免疫組織化学的検討**

非B非C肝癌患者とHCV陽性肝癌患者の手術材料を用い、*P.g.*感染状況の確認のため、免疫組織化学的染色を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) NASH 関連肝癌マウスモデル非腫瘍部凍結肝組織を用いたパスウェイ解析

mRNA 発現解析の結果、HFD-*P.g.*(+)群非腫瘍部肝組織において、マクロファージ(M )マーカーである *Lyz2* や、補体成分である *C1qa*, *C1qb*, *C1qc* が Differentially Expressed Gene(DEG)として検出された(図1)。

##### (2) 酸化ストレスマーカーの免疫組織化学的検討

これまでの研究により、M 数や、TNF- 陽性の hepatic crown-like structures (hCLSs ; 脂肪変性に陥った肝細胞を M が取り囲む構造)が HFD-*P.g.*(+)群で有意に増加することが明らかとなっており(日本時間 2023 年 6 月 6 日時点で Scientific Reports にアクセプト) 今回のパスウェイ解析の結果で M マーカーが DEG として検出された結果は、これまでの結果を反映していた。AKT はサイトカイン産生に関与し、またサイトカインシグナル系の主要なメディエーターとして知られているため、HFD-*P.g.*(+)群における AKT 発現上昇は、*P.g.*感染による TNF- などの液性因子を介した NASH 増悪に伴う変化であると予測された。TNF- は ROS の産生を介し、酸化的 DNA 傷害を惹起すると報告されている。酸化的 DNA 傷害マーカーである 8-OHdG は、それ自体が G: C T: A 変異を惹起することも知られているため、NASH 関連肝癌発癌/進行の重要な因子であると予測し、HFD-*P.g.*(+)群と HFD-*P.g.*(-)群における 8-OHdG 発現を免疫組織化学的に比較検討した。8-OHdG は、HFD-*P.g.*群で有意に発現が増加し、核と細胞質の両方に発現を認めた (\*\**P*<0.01 ; 図 2a, b)。これらの結果から、NASH 関連肝癌マウスモデルでは、*P.g.*菌性感染が hCLSs からの TNF- 産生を誘導し、変異原性を有する 8-OHdG 発現上昇を介して HCC 発癌過程を促進する可能性が示唆された。その他、NASH 関連肝癌発癌への関与が報告されているサイトカインを検討した結果、HFD-*P.g.*群では、IL-6 の発現上昇も認められた(図 2c, d)。肝細胞癌の発癌メカニズムとしては、*CTNMB1*, *TERT*, *TP53* などの遺伝子異常に加え、IL-6/JAK/STAT 経路の活性化などが報告されている。今回の研究では、HFD-*P.g.*(+)群において、酸化的 DNA 傷害が生じていること(8OH-dG 発現上昇)や、IL-6 の産生が亢進していることが明らかとなり、発癌過程に重要な影響を及ぼしている可能性が示唆されたが、HFD-*P.g.*(+)群と HFD-*P.g.*(-)群に形成された腫瘍間における遺伝子異常の違いに関しては、検討することができなかった。今後、パラフィンブロックや凍結腫瘍組織を用いた免疫組織化学的検討や、遺伝子解析を行う予定である。

##### (3) 非 B 非 C 肝癌患者、HCV 陽性肝癌患者手術材料を用いた *P.g.*感染状況の免疫組織化学的検討

非 B 非 C 肝癌患者と HCV 陽性肝癌患者の手術材料を用い、*P.g.*感染状況の確認のため、免疫組織化学的染色を行った。図 3 は、非 B 非 C 肝癌患者の癌細胞中に検出された *P.g.*(緑色に染色)を示す。現在 *P.g.*感染の割合や腫瘍のプロファイルとの関係について検討中である。また、M 数、hCLSs 数、酸化ストレスマーカー、TNF- や IL-6 などの発癌に関与する因子に関しては、ヒトの癌組織、非腫瘍部組織においても、今後、免疫組織化学的に検討する予定である。

以上の結果から、NASH 関連肝癌マウスモデルでは、*P.g.*菌性感染が、hCLSs からの TNF- 産生を促し、酸化的 DNA 傷害を惹起し、肝癌発癌過程に重要な役割を果たす可能性が示唆された。非 B 非 C 肝癌患者の癌組織においても免疫組織化学的に *P.g.*が検出されていることから、同様に hCLSs から産生される TNF- を介した酸化的 DNA 傷害の有無について検討する必要がある。

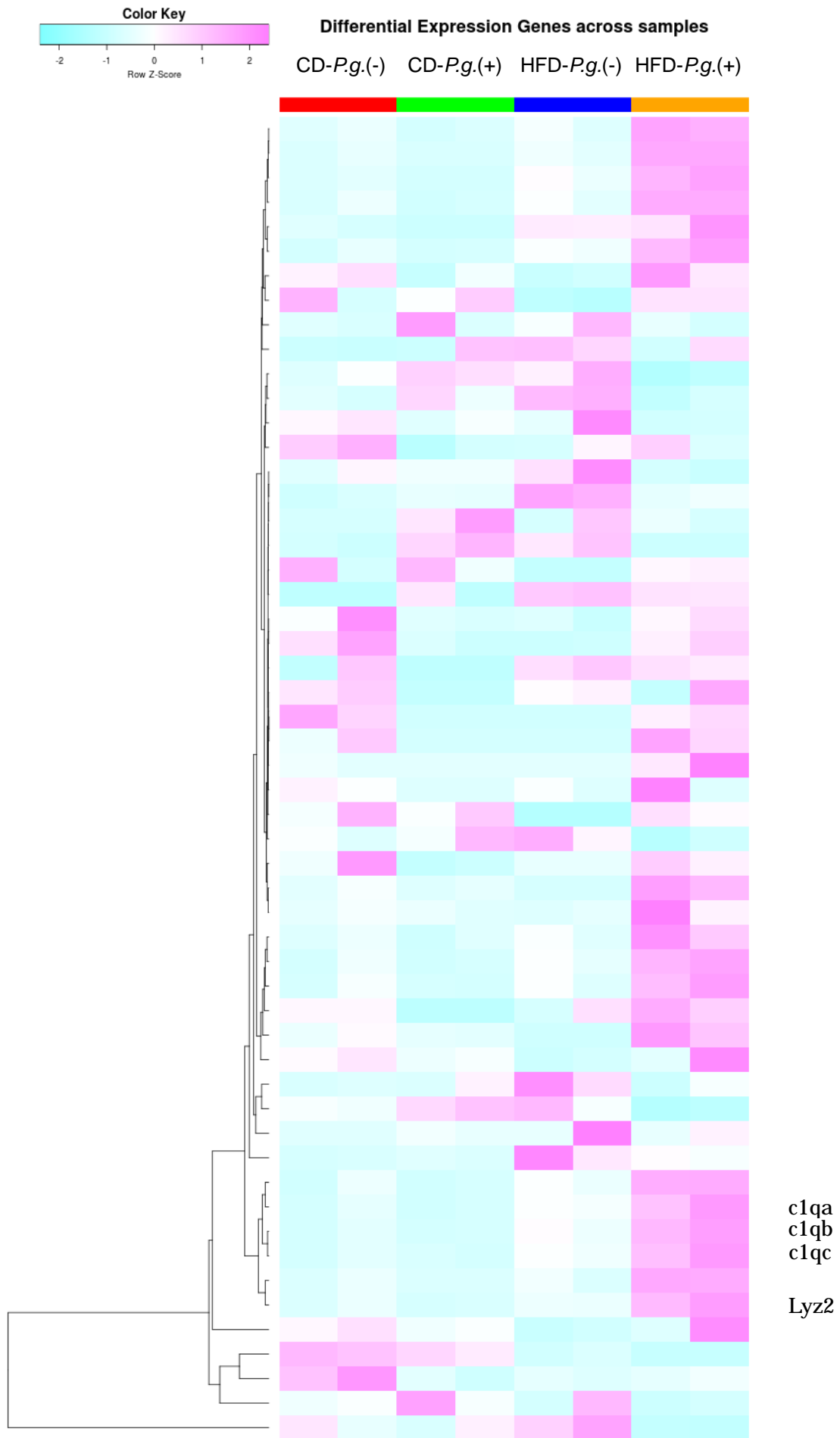


図 1 長期的な *P.g.* 菌性感染及び高脂肪食投与がマウス非癌部肝組織の mRNA 発現に及ぼす影響

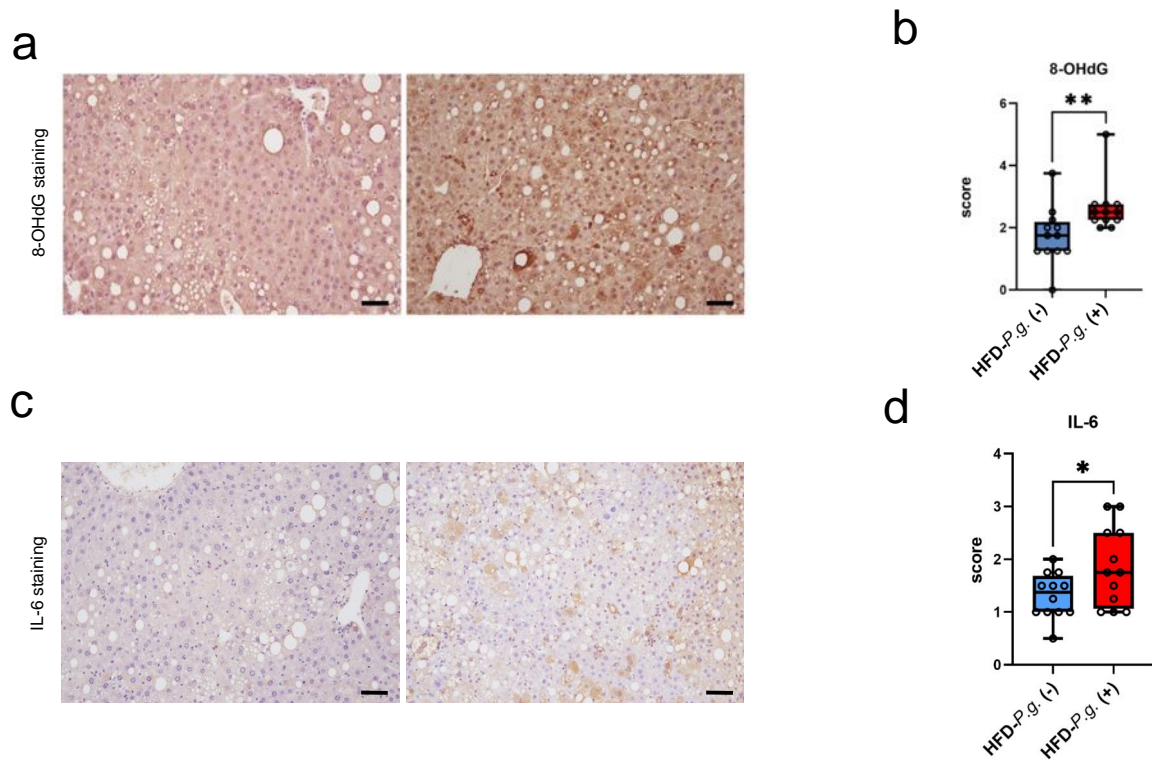


図2 *P.g.* 菌性感染がマウス非癌部肝組織の 8-OHdG や IL-6 発現に及ぼす影響

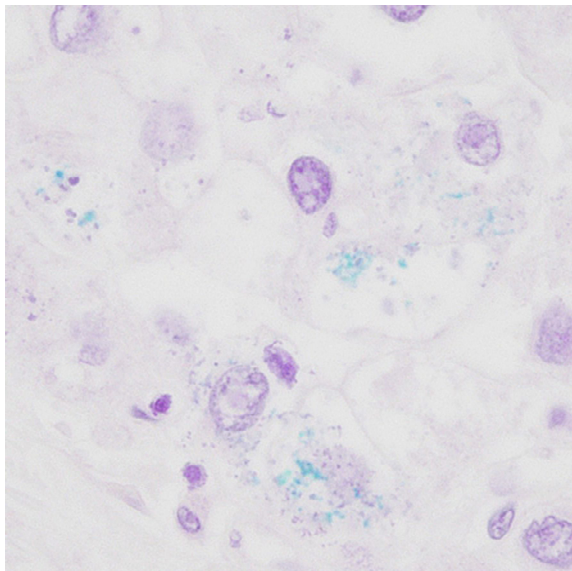


図3 非B非C肝癌患者癌部組織における *P.g.* 感染状況

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

データの一部は日本時間2023年6月6日にScientific Reportsにアクセプトされた。

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
---------	---------