

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：83301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07905

研究課題名（和文）新規血管内皮細胞マーカーが肝線維化および肝発がんに関わるメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms by which novel vascular endothelial cell markers are involved in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis

研究代表者

西川 昌志（Nishikawa, Masashi）

独立行政法人国立病院機構（金沢医療センター臨床研究部）・その他部局等・研究員

研究者番号：90794511

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）：本研究により、TMEM164はNASHからの肝発がんに対して抑制的に働くことが明らかになった。NAFLD/NASHモデルマウスの肝組織の検体を用いた発現解析、免疫組織染色において、TMEM164がNASH病態進行を抑制に働く機能がある細胞は肝内皮細胞、特に肝線維化に伴い骨髄細胞由来の肝浸潤血管内皮細胞に存在していた。その血管内皮細胞は炎症性細胞であるマクロファージやCD8 T細胞を呼び寄せることで肝発がんを起し、TMEM164がそれらを抑制する可能性を示せた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの結果から、TMEM164は、世界で未だ報告がなく、申請者だけが初めて報告した独自のNASH-HCC病態における標的遺伝子になり得ることが明らかになった。TMEM164のあらたな生理機能の発見は、未だ治療薬がない肝線維化に対する薬剤の開発に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that TMEM164 has an inhibitory effect on NASH-induced liver carcinogenesis.

Expression analysis and immunohistochemistry using liver tissue samples from NAFLD/NASH model mice revealed that the cells in which TMEM164 functions to suppress the progression of NASH pathology are liver endothelial cells, specifically liver infiltrating vascular endothelial cells derived from bone marrow cells in the context of liver fibrosis. The endothelial cells may attract inflammatory cells such as macrophages and CD8 T cells that cause hepatocarcinogenesis, and TMEM164 may suppress these cells.

研究分野：肝発がん

キーワード：新規血管内皮細胞マーカー

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性肝炎を惹起し、肝硬変・肝癌の誘因となる。C型慢性肝炎に対する治療法が格段に進歩し、治療によりHCV排除を示すSustained viral response (SVR)状態になると、HCVによる肝臓への慢性炎症が除去され肝癌発症は有意に抑制される。SVR症例が増え、肝癌発症例は将来減少すると予測されたが、SVR状態にも関わらず肝癌を発症する例が存在する。HCV-SVRになる過程でゲノムDNAに修飾・変異するEpigenomeによって発癌過程に移行したと考えた。申請者は、HCVにおけるペグインターフェロン+リバビリンの2剤(PEG-IFN+RBV)によるSVR達成前後及びnon-SVRの背景肝と肝癌の臨床検体を用いて、Epigenomeの一つであるDNAメチル化修飾の評価を行った。その結果、SVR後の肝細胞癌(HCC)において、発現プロモーター領域のCpG islandに脱メチル化がおき、発現誘導される新規因子TMEM164を発見した。更に、正常肝とSVR後の肝癌手術標本の背景肝、腫瘍部でTMEM164の発現量が各群間で有意に上昇した。つまり、HCV SVR過程でTMEM164の発現プロモーター上のCpG island領域のメチル化が外れたことで、TMEM164の発現が亢進されたことから肝発がんすることが明らかになった。しかしながら、直接抗ウイルス剤(DAA)によるSVR達成前後では、TMEM164の発現増加及びCpGメチル化頻度に変化が見られなかった。HCV-SVRによるTMEM164の発現増加は、肝血管内皮細胞で観察された。肝血管内皮細胞内TMEM164の発現増加は、ATF6発現依存的に小胞体(ER)ストレスを誘引させ、炎症反応を制御する転写因子Stat3を活性化させたことからIL6を過剰分泌がおき肝発がんさせることを明らかにし、Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2023;16:263-286に筆頭著者として報告した(Fig1)。この報告によって申請者が発見したX染色体上に存在する膜タンパク質でTMEM164が、正常生体内及び肝疾患病態進行による生理的役割があることを世界で初めて示せた。近年増加傾向である脂肪肝(NAFLD)及び非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の118例のヒト連続肝生検のRNA-seq解析から、TMEM164の発現増加が肝線維化を伴うNASH病態形成と有意に相関することが確認できた。しかしながら、TMEM164がNAFLD/NASHに伴う肝線維化形成にどのように生理的に寄与しているかわからない。

2. 研究の目的

本研究は、①TMEM164陽性血管内皮細胞が炎症性細胞の浸潤抑制機序の解明、②肝線維化形成する際にTMEM164KO骨髄細胞由来の血管内皮細胞が線維化促進に寄与する機序の解明(Fig4)、の2点を明らかにすることを目的とする。この同定したTMEM164は申請者独自の因子であり、NASHによる肝線維化形成や肝発がんを抑制する新しい治療標的になり得る可能性をもつ。特に、TMEM164を治療標的とした報告は世界でも申請者だけである。TMEM164は、肝がんの血管新生抑制因子に働き免疫細胞の肝浸潤を促進させる働きがあることをin vivoの実験から確認できている。このTMEM164陽性血管内皮細胞集団を治療標的とした研究基盤は、今後の肝線維化、肝発がん及び再発に対する治療薬の発展に貢献する。

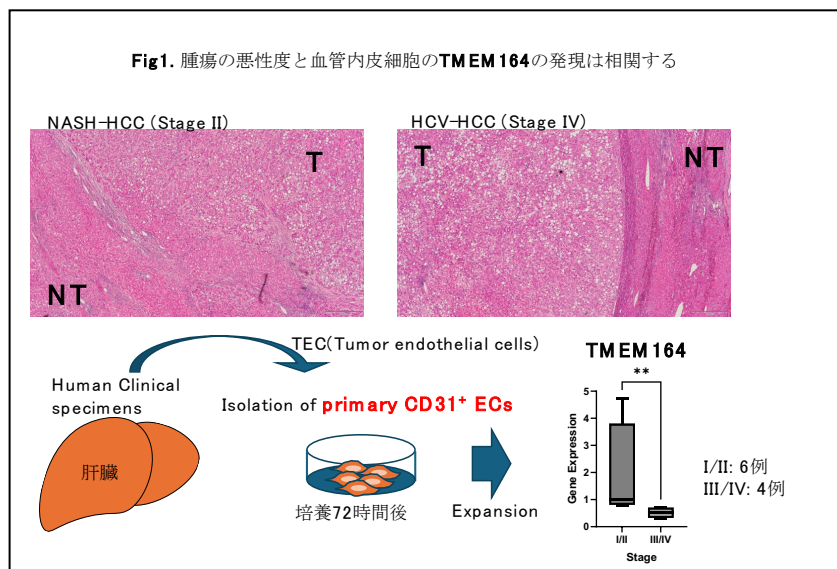
3. 研究の方法

①ヒト肝がん手術肝組織検体におけるTMEM164の発現解析

ヒト手術肝組織検体(背景と腫瘍部)からTMEM164陽性と陰性の血管内皮細胞をソーティングにて抽出し、Flow cytometry法及び発現解析を行う。

②門脈周囲のTMEM164陽性血管内皮細胞の出現が肝線維化病態形成及び発癌に対する生理的役割を解明する

TMEM164遺伝子 knock-out (KO) マウスは、X染色体上に存在するため、雄性は- $\gamma$ (Y染色体)(ヘテロ)、雌性は-/- (ホモ)のGenotypeで実験を行う。脂肪肝モデルとして60%高脂肪負荷と脂肪肝炎及び肝線維化モデルであるコリン欠乏メチオニン減量高脂肪(CDAA)負荷をTMEM164KOマウスで実施する。CDAA投与後の肝線維化形成さ



れた肝組織を用いて RNA-sequence 解析及び発現解析する。この結果から、線維化に関わる血管内皮細胞の *TMEM164* の新規シグナル伝達経路を解明する。*TMEM164* KO マウスに肝線維化から肝発がんを促す DEN+HFD モデルで肝臓の発がん率を評価する。

#### 4. 研究成果

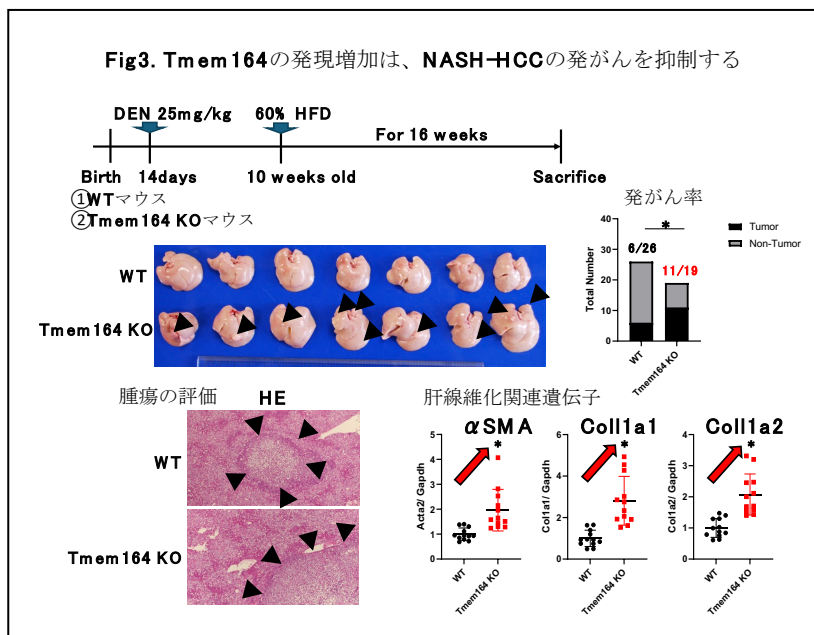
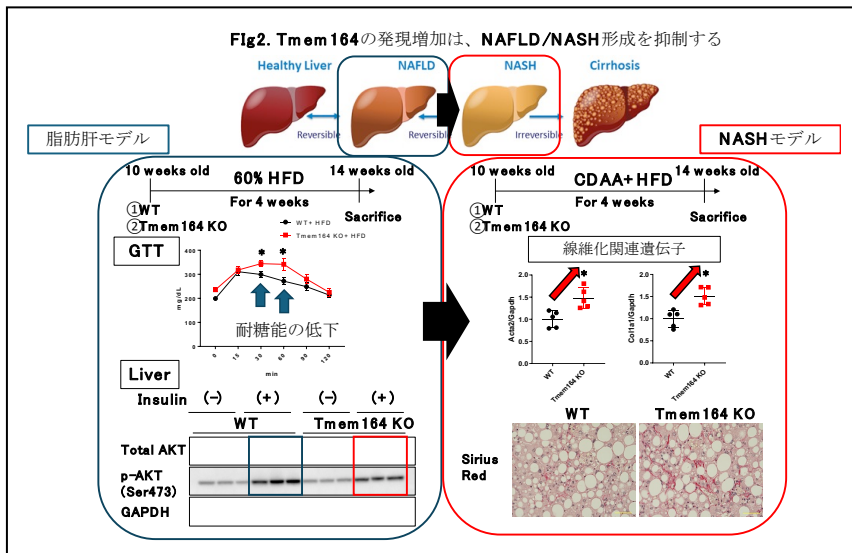
臨床検体から、腫瘍部を切り出し、ホモジナイズしてから CD31 で抽出した。3日間培養したあとに、RNA を抽出し *TMEM164* の発現を評価した。腫瘍の悪性度が高いほど、血管内皮の *TMEM164* の発現が低値になることが確認できた(Fig1)。

しかしながら、*TMEM164* が NAFLD/NASH に伴う肝線維化形成にどのように生理的に寄与しているかわからない。

*TMEM164* KO マウスに脂肪肝モデルである 60%高脂肪食(HFD)を負荷させたところ、野生型マウスと比較して、体重は全く変わらないのに

耐糖能が有意に増悪し、インスリンの感受性も低下していた(Fig2)。肝線維化形成を伴う NAFLD/ NASH モデルであるコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食(CDAA+HFD)を処置した *TMEM164* KO マウスは、野生型マウスと比較して顕著に肝線維化を増悪させることが観察された(Fig2)。これらの現象は、肝組織のみであり他の臓器では変化がみられなかった。NASH による肝発がんを評価するため、ジエチルニトロソアミン(DEN)+ HFD モデルを *TMEM164* KO マウスで実施したところ、野生型と比較して肝発がんを有意に引き起こした(Fig3)。これらの結果から、*TMEM164* は NASH からの肝発がんに対して抑制的に働くことが明らかになった。上記の NAFLD/ NASH モデルマウスの肝組織の検体を用いた発現解析、免疫組織染色において、*TMEM164* が NASH 病態進行を抑制に働く機能がある細胞は肝内皮細胞にあることが分かった。特に、肝線維化に伴い骨髄細胞由来の肝浸潤血管内皮細胞にあり、更には、その血管内皮細胞は炎症性細胞であるマクロファージや CD8 T 細胞を呼び寄せることから発がんを起こし、*TMEM164* がそれらを抑制する可能性を示せた。

これらの結果から、*TMEM164* は、世界で未だ報告がなく、申請者だけが初めて報告した独自の NASH-HCC 病態における標的遺伝子になり得ることが明らかになった。*TMEM164* のあらかな生理機能の発見は、未だ治療薬がない肝線維化に対する薬剤の開発に貢献できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishikawa Masashi, Okada Hikari, Kawaguchi Kazunori, Shimakami Tetsuro, Nio Kouki, Arai Kuniaki, Yamashita Tatsuya, Sasaki Motoko, Kaneko Shuichi, Yamashita Taro, Honda Masao	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of a Transmembrane Protein Involved in Shear Stress Signaling and Hepatocarcinogenesis After a Sustained Virological Response to Hepatitis C Virus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2023.04.006	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川昌志、岡田光、本多政夫
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス排除後の肝発癌と肝癌進展に寄与する機能未知膜貫通蛋白の同定
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023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
研究分担者	岡田 光  (Okada Hikari)  (50788916)	金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授    (13301)	

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