

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08730

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝疾患における肝マクロファージの役割の解析と、その臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of the role of liver macrophages in non-alcoholic fatty liver disease and its clinical application.

研究代表者

雨宮 秀武 (Amemiya, Hidetake)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：70377547

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)：肝細胞癌(HCC)発症と進展におけるM-CSFの関与を検討した。I：M-CSF欠損(op/op)にジエチルニトロサミン(DEN)を投与し肝発癌率を検討した。II：手術標本でM-CSF発現と手術後の生命予後を解析した。III：マウスHCC株皮下移植モデルヒトHCC細胞株ヌードマウス脾臓移植モデル、DEN誘発肝癌モデルを作成しM-CSF受容体拮抗剤GW2580の投与効果を検討した。I：op/opで発癌率がLTと比較し有意に低下した。II：M-CSF高発現群においてDFSが有意に短縮していた。III：GW2580投与は有意に肝発癌増殖を抑制した。【考察】HCC新規治療の可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

十全大補湯によるNAFLDの病態改善と、肝発癌抑制効果を検証し、メタボリック症候群における肝マクロファージの果たす役割を解明することである。NAFLD肝発癌における活性化肝マクロファージの関与は明らかになっていない。一方、十全大補湯の抗炎症作用を応用したNAFLD改善ならびに肝発癌抑制効果の視点からの研究も存在しない。NAFLDの病態と、肝発癌機序における肝マクロファージの関与を証明し、十全大補湯による抗酸化ストレス・抗炎症作用が、脂肪肝・肝線維化から発症する肝発癌を抑制できる可能性が解明でき、臨床治療への応用が十分期待できる独創的で重要な課題であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of M-CSF in the development and progression of hepatocellular carcinoma (HCC). i: Hepatic carcinogenesis rate was examined in M-CSF-deficient (op/op) patients treated with diethylnitrosamine (DEN). ii: M-CSF expression and life outcome after surgery were analyzed in surgical specimens. iii: Mouse HCC line subcutaneous transplant model human I: Carcinogenic rate was significantly decreased in op/op compared with LT; II: DFS was significantly shortened in the M-CSF-high expression group; III: Administration of GW2580 significantly suppressed hepatocarcinogenic growth; IV: M-CSF expression was significantly decreased in the op/op group; and V: M-CSF expression was significantly decreased in the DEN-induced hepatocarcinogenesis model; and V: M-CSF expression was significantly decreased in the DEN-induced hepatocarcinogenesis model. III: GW2580 significantly inhibited hepatocarcinogenesis growth. The results suggest the possibility of new treatment for HCC.

研究分野：炎症免疫機構の解析

キーワード：臓器マクロファージ 肝類洞免疫 中鎖脂肪酸 肝発癌 メタボリックシンドローム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群患者の増加とともに、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) を背景とした肝細胞癌の罹患率が増加しつつあり (Hepatol Int. 2016; 10: 533-534)、その原因・病態を解明することは発癌抑制・新規治療開発につながる重要な研究課題である。肝炎ウイルス感染、アルコール多飲、発癌物質による肝細胞癌発癌機序として肝内酸化ストレスが原因として重要である (Hepatology, 2016; 64:1794-1796)。これまで申請者らは、C型肝炎ウイルス感染を背景とする肝細胞癌発症において活性化肝マクロファージ由来の酸化ストレスが原因として重要である事実を報告 (Kono and Maki et al. Annals of Surgical Oncology 2006; 14:1182-1190) してきたが、NAFLD肝発癌における肝マクロファージの関与は明らかになっていない。漢方薬である十全大補湯が抗炎症性免疫増強作用とマクロファージ由来の抗酸化ストレス作用を有し、肝癌発症を抑制する事実を臨床ならびに基礎研究により明らかにしている。(Kono and Tsuchiya et al. Int. J. Cancer: 2008; 123:2503-2511)。

2. 研究の目的

十全大補湯の高脂肪食摂取による脂肪肝と肝線維化の改善、肝内酸化ストレス軽減による肝発癌抑制、脂肪細胞活性化抑制によるメタボリック症候群改善効果を検証し、NAFLDを背景とした肝細胞癌発症における肝マクロファージ関与の詳細な機序を解明する。これによりNAFLD (メタボリック) 肝細胞癌に対する肝マクロファージを標的とする新規治療体系の確立を目指す。

3. 研究の方法

I. NAFLDの病態における肝マクロファージ機能と動態の検討

-1. NAFLDモデルの作成: C57/BL6マウスと自然発症NAFLD (STAM®) マウスを用い、chow diet、高脂肪食、ならびに1.6%十全大補湯添加高脂肪食を継続的に投与する。

-2. NAFLDの病理組織と肝内酸化ストレスの検討: 経時的に肝臓を摘出し病理組織を検討する。脂質酸化ストレスマーカー (MDA、4-HNE) と酸化的DNA障害マーカー (8-OHdG) を免疫組織染色法で検討する。

肝線維化の検討: 線維化の程度を α -SMA免疫組織染色で検討する。肝線維化マーカー (ヒアルロン酸、M2BPGi) 発現を血液と肝組織タンパクで検討する。

-4. 肝臓と脾臓マクロファージの動態の検討: 臓器マクロファージの動態の変化を免疫組織染色 (CD68、F4/80抗体) で検討する。

II. NAFLD発癌の肝類洞免疫機能と十全大補湯による抑制効果の検討

-1. 発癌モデルの作成: -1と同じモデルを作成する。

-2. 肝癌発生の検討: 各群より経時的に肝癌の発生状態を検討する。

-3. 担癌状態での臓器マクロファージの動態変化の検討: CD68、F4/80陽性Mf分布を腫瘍内、腫瘍近位、腫瘍遠位部で検討する。

-4. 担癌担癌状態での臓器マクロファージの表面抗原発現の検討: マクロファージ表面抗原CD14とCD16発現を腫瘍内、腫瘍近位、腫瘍遠位部で検討する。

III. NAFLDにおける分離臓器マクロファージ機能変化の検討

-1. 臓器マクロファージの分離: NAFLDの各病期、ならびに担癌状態の肝臓と脾臓より臓器マクロファージを分離する。

-2. NAFLD病態進行におけるマクロファージの機能変化の検討: 炎症性サイトカイン産生 (TNF- α 、IL-1 β)、ケモカイン (CXCケモカイン: MIP-2、KC; CCケモカイン: MIP-1 α /-1 β 、MCP-1 発現)、活性酸素産生、蛍光latex beadsの貪食能を検討する。

-3. マクロファージ表面マーカーの検討: 各群・各病態の分離MfのCD14とCD16発現をFACS法

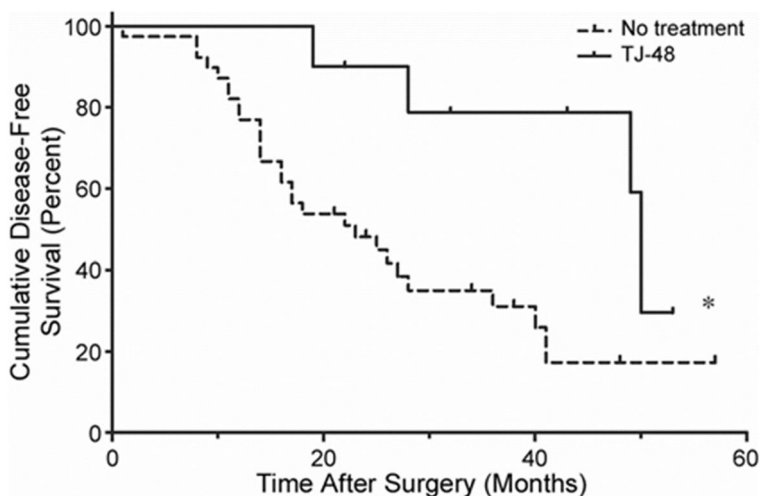
で検討する。

-4. マクロファージsubtypeであるM1/M2-typeの特性の検討：各群・各病態の分離Mfを lipopolysaccharide (LPS; 50 μ g/ml in media) で刺激後に、M1-typeマクロファージ（炎症性）マーカー（CD68）ならびにM2-typeマクロファージ（抗炎症性）マーカー（CD204）と、抗TNF- α 抗体、抗IL-6抗体、抗IL-10抗体、抗LPS受容体Toll-like receptor 4抗体を用いた2重蛍光染色によるFACS法で、マクロファージのsubtypeと、サイトカインならびにToll-like receptor 4発現を比較検討する。

4. 研究成果

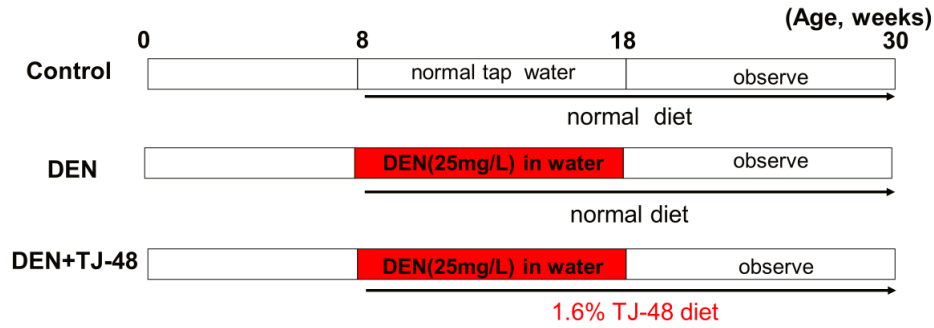
検討 I：DEN 誘発肝細胞癌の発症は TJ48 混餌投与群において非投与群と比較し有意に抑制された。検討 II：KC の TNF- と ROS 産生は、TJ48 の in vitro ならびに in vivo 投与により有意に抑制された。TJ48 投与マウスより分離したリンパ球は IFN- 産生が IL-4 産生より亢進していた。検討 III：HCV 感染陽性 HCC 患者の術後に TJ48 の投与したところ、TJ48 投与群において非投与群と比較し、有意差を持って再発期間を延長していた。また、肝内酸化ストレスを反映する血清 IL-18 値は、健常人と比較し HCV 感染患者では高値となっていたが、TJ48 投与開始後 6 ヶ月以降で正常範囲内となっていた。さらに、投与後の NK 活性も増加した。統計学的解析により TJ48 投与が唯一の独立した再発期間延長因子となっていた。

ヒト肝細胞癌術後における十全大補湯の再発抑制効果



動物モデルでの検討

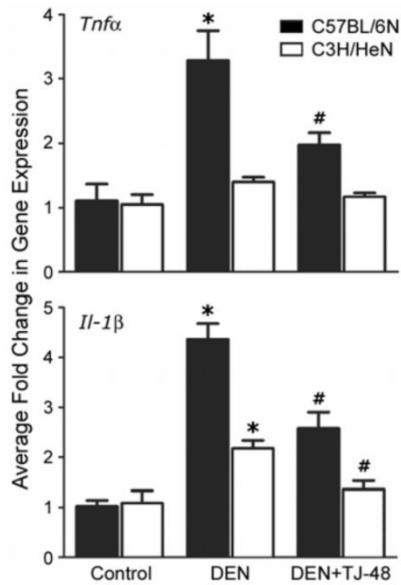
プロトコール



Incidence of hepatic tumor

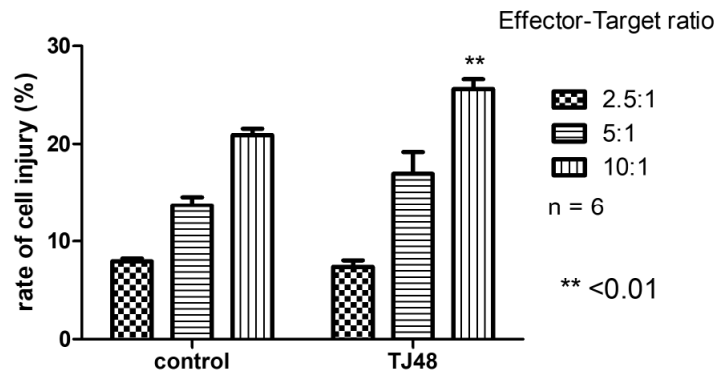
Strain	Treatment	Incidence	p-value
C57BL/6N	DEN	6/27 (22.2%)	p=0.024
	DEN + TJ-48	0/20 (0%)	
C3H/HeN	DEN	12/19 (70%)	p=0.187
	DEN + TJ-48	7/17 (41%)	

肝臓の炎症性サイトカインのmRNA発現



十全大補湯は炎症性サイトカイン発現を抑制した。

NK活性測定



TJ48を1週間投与後に分離したリンパ球

十全大補湯はNK活性を亢進させた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野 寛
2. 発表標題 背景肝に発現するM-CSFの肝細胞癌発症への関与の解明と、肝細胞癌の新規分子標的治療への応用を目指したトランスレーショナル研究
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河野 寛
2. 発表標題 背景肝に発現するM-CSFの肝細胞癌発症への関与の解明と、肝細胞癌の新規分子標的治療への応用を目指したトランスレーショナル研究
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 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
研究分担者	河野 寛 (Kono Hiroshi) (40322127)	山梨大学・大学院総合研究部・特任准教授 (13501)	

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