

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293177

研究課題名(和文) 星細胞サイトグロビンは慢性肝障害からの発がん過程に関与するか？

研究課題名(英文) Involvement of Cytoglobin expressed in hepatic stellate cells in the development of cancer derived from inflamed liver.

研究代表者

河田 則文 (KAWADA, NORIFUMI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30271191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝星細胞に発現するCygbの生体内機能を解明するためCygbKOを作出した。diethylnitrosamineやコリン欠乏食投与モデルでCygbKOは野生型に比して有意に肝がん発生率が上昇し背景肝ではストレスと線維化反応の増強・星細胞の活性化を確認した。CygbKO由来星細胞は平滑筋アクチンやサイトカイン・ケモカインmRNA発現が増強、p16、p21やH2AX等老化細胞マーカーを発現した。星細胞に発現するCygbは星細胞の恒常性維持に不可欠でその欠損は星細胞をプライミングさせSASP様フェノタイプへ変化させ肝臓における炎症、線維化の増強を介して発がんを促進させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have shown Cygb's anti-oxidative properties. Here, we clarified the role of Cygb in the development of liver fibrosis and cancer with different aetiologies. Model 1; 25ppm DEN treatment for 25 weeks induced liver tumor formation in 100% of Cygb<sup>-/-</sup> mice compared to 44% in WT mice. Background liver developed fibrosis together with the augmented inflammatory reactions and oxidative stress conditions in Cygb<sup>-/-</sup> mice. Model 2; 8-16 weeks of CDAA treatment provoked more steatohepatitis, fibrosis, and accumulated neutrophils in Cygb<sup>-/-</sup> mice than in WT. Interestingly, 100% of Cygb<sup>-/-</sup> mice fed CDAA for 32 weeks developed liver cancer, while no tumor was found in WT. HSCs isolated from Cygb<sup>-/-</sup> mice exhibited the priming condition and the senescence-like phenotype with upregulated chemokine and cytokine mRNA expression and superoxide production. Thus, Cygb deficiency deteriorated liver fibrosis and cancer development caused by different etiologies, indicating the protective role of Cygb in organ insult.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝がん サイトグロビン

1. 研究開始当初の背景

**計画1** : Cygb 欠損マウスを用いた NASH の線維化、発がん過程における Cygb の関与の検討

CDAА 誘導 NASH による線維化過程が野生型に比較して Cygb 欠損マウスでどのように変化するかを検討した。

(a) 野生型あるいは Cygb 欠損マウスに CDAА 食を自由摂取で 32 週間投与してマウスに脂肪性肝炎を誘導させた。コントロールとして CSAA 食投与群を作製し、以下の項目を詳細に検討した。

- (1) サイトカインプロファイル ; (2) 線維化関連遺伝子プロファイル ; (3) 酸化ストレス・抗酸化ストレスプロファイル ;
- (4) 組織学的には、HE 染色に加えて、Sirius-red 染色で線維化、免疫組織染色で浸潤細胞の同定、H0-1 やニトロチロシン、ジヒドロエチジウム (DHE) 染色で酸化ストレス動態を検討 ; (5) 低酸素プローブである 2-nitroimidazole を用いた検討により組織局所の低酸素状態の確認 ; (6) NF B, ERK, c-Jun, AP-1, ASK-1 などの細胞内シグナル伝達経路や p53、 $\beta$ -catenin, mTOR など発がんシグナル伝達経路の活性化を immunoblot など検討

**計画2** : Cygb 欠損による星細胞機能なら

びに肝(がん)細胞との相互作用の変動  
Cygb は肝臓の星細胞から発見され、内臓諸臓器の pericyte としてビタミン A 貯蔵線維芽細胞に発現するユニークなグロビン蛋白である。この分子の欠損が星細胞機能自体に、さらには、近接する肝細胞機能にどう関与するか培養系で検討した。

- (1) 野生型と Cygb 欠損マウス肝臓から星細胞を単離培養し、desmin, CRBP-1, SMA など星細胞や MFB で発現がみられる蛋白を比較検討した。また、線維化や発がんとの関係が強い TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, EGF, VEGF などの産生について両者で比較した。

- (2) 野生型あるいは Cygb 欠損マウスから分離した星細胞を初代培養マウス肝細胞あるいはヒト肝がん細胞株 (HepG2, Huh-7) と共培養して、細胞増殖や増殖シグナル伝達に及ぼす Cygb 欠損の意義を解析した。

- (3) リコンビナント His-Cygb を作製しているため、上記(1)(2)の細胞培養系に添加することで細胞外 Cygb の薬理効果を検討した。

**計画3** : ヒトの肝癌組織を用いた Cygb 発現と Cygb 遺伝子の SNP・メチル化解析

- (1) ヒト肝組織の実質部、グリソン鞘や線維性隔壁部、がん部 (C 型と非 B 非 C 型由来、がんも高分化型、低分化型など分化度を病理医とともに診断) を CRBP-1, Cygb, SMA, FBLN2 に対する抗体を用いて染色し、MFB の存在様式を明確化した。多重の蛍光抗体法を用いて MFB の分類を行った。

- (2) Cygb SNPs の解析 ; Cygb に関する SNPs について JSNP DATABASE 上にはこれまでに Intron 領域に C が付加される SNP (IMS-JST079593) と 3' UTR 領域の C/T あるいは A/G 変異の SNP (IMS-JST095356) が報告されている。実際には SNP (IMS-JST079593 or rs3217541) はアレルの forward シークエンスにおける -/C deletion/insertion 多型であることが報告されているのでこれを肝がん部、非がん部で検討した。

- (3) Cygb 遺伝子のメチル化についても検討を行なった。

2. 研究の目的

我々はこれまでに Cygb がミオグロビンと同様、酸素などのガス分子と結合し得ることを明らかにした一方で、Cygb 欠損マウスが diethylnitrosamine (DEN) 投与で高度に線維化を生じて易発がん性を示すことを見出した。これらの事実は、ガス結合性 Cygb が肝の線維化と発がんを抑制する分子として機能することを示唆する。

本研究では、1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態形成、特に線維化と発がん、への Cygb の関与をマウスモデルで明らかにする、2) 星細胞における Cygb 発現の意義を肝細胞との相互作用やがん増殖の観点から培養系で検証する、3) ヒト肝発がんへの Cygb の関与を臨床検体で検証することを目的とする。以上より、星細胞に発現する Cygb の NASH 由来肝発がんへの意義について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 計画 1 : Cygb 欠損マウスを用いた NASH の線維化、発がん過程における Cygb の関与の検討

CDAА 誘導 NASH による線維化過程が野生型に比較して Cygb 欠損マウスでどのように変化するかを検討した。

(a) 野生型あるいは Cygb 欠損マウスに CDAА 食を自由摂取で 32 週間投与してマウスに脂肪性肝炎を誘導させた。コントロールとして CSAA 食投与群を作製し、以下の項目を詳細に検討した。

(1) サイトカインプロファイル ; (2) 線維化関連遺伝子プロファイル ; (3) 酸化ストレス・抗酸化ストレスプロファイル ; (4) 組織学的には、HE 染色に加えて、Sirius-red 染色で線維化、免疫組織染色で浸潤細胞の同定、H0-1 やニトロチロシン、ジヒドロエチジウム (DHE) 染色で酸化ストレス動態を検討 ; (5) 低酸素ブロープである 2-nitroimidazole を用いた検討により組織局所の低酸素状態の確認 ; (6) NF B, ERK, c-Jun, AP-1, ASK-1 などの細胞内シグナル伝達経路や p53, -catenin, mTOR など発がんシグナル伝達経路の活性化を immunoblot など検討

#### 計画 2 : Cygb 欠損による星細胞機能ならびに肝 (がん) 細胞との相互作用の変動

Cygb は肝臓の星細胞から発見され、内臓諸臓器の pericyte としてビタミン A 貯蔵線維芽細胞に発現するユニークなグロビン蛋白である。この分子の欠損が星細胞機能自体に、さらには、近接する肝細胞機能にどう関与するか培養系で検討した。(1) 野生型と Cygb<sup>-/-</sup> マウス肝臓から星細胞を単離培養し、desmin, CRBP-1, SMA など星細胞や MFB で発現がみられる蛋白を比較検討した。また、線維化や発がんとの関係が強い TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, EGF, VEGF などの産生について両者で比較した。(2) 野生型あるいは Cygb<sup>-/-</sup> マウスから分離した星細胞を初代培養マウス肝細胞あるいはヒト肝がん細胞株 (HepG2, Huh-7) と共培養して、細胞増殖や増殖シグナル伝達に及ぼす Cygb 欠損の意義を解析した。(3) リコンビナント His-Cygb を作製しているのので、上記(1)(2)の細胞培養系に添加することで細胞外 Cygb の薬理効果を検討した。

#### 計画 3 : ヒトの肝癌組織を用いた Cygb 発現と Cygb 遺伝子の SNP・メチル化解析

(1) ヒト肝組織の実質部、グリソン鞘や線維性隔壁部、がん部 (C 型と非 B 非 C 型由来、がんも高分化型、低分化型など分化度を病理医とともに診断) を CRBP-1、Cygb、SMA、FBLN2 に対する抗体を用いて染色し、MFB の存在様式を明確化した。多重の蛍光抗体法を用いて MFB の分類を行った。

(2) Cygb SNPs の解析 ; Cygb に関する SNPs について JSNP DATABASE 上にはこれまでに Intron 領域に C が付加される SNP (IMS-JST079593) と 3' UTR 領域の C/T あるいは A/G 変異の SNP (IMS-JST095356) が報告されている。実際には SNP (IMS-JST079593 or rs3217541) はアレルの forward シークエンスにおける -/C deletion/insertion 多型であることが報告されているのでこれを肝がん部、非がん部で検討した。

(3) Cygb 遺伝子のメチル化についても検討を行なった。

#### 4. 研究成果

我々は肝臓では星細胞のみに発現する哺乳類第4番目のグロビンであるサイトグロビン (Cytoglobin, Cygb) の生体内機能を明らかにする目的で Cygb ノックアウトマウス (Cygb KO) を作出した。ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN) 25 ppm を投与するモデル実験で Cygb KO は野生型に比較して有意に肝がん発生率が上昇し、背景肝においては酸化ストレスの亢進、線維化反応の増強、星細胞の活性化を確認した。次に、ヒトの脂肪性肝炎の病態に近いモデルとしてコリン欠乏食 (CDAA 食) を投与して検討した結果、野生型マウスでは肝臓に脂肪沈着と線維化が生じる条件において Cygb KO では雄雌マウスの両方で 100%の確率で肝がんが生じた。背景肝ではマクロファージや好中球の浸潤が高度であり、また、線維化反応の増強が見られた。それに一致するようにケモカイン、transforming growth factor- $\alpha$ 、myeloperoxidase の発現増強が見られた。この発がん反応は N-acetylcysteine の投与により有意に抑制されたため、活性酸素の過剰反応が原因と推測された。Cygb KO から分離培養した星細胞はプライミングを受けており、平滑筋アクチンの発現やサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現も増強していた。さらに解析した結果、Cygb KO から分離した星細胞は p16, p21 や H2AX のような老化細胞マーカーを発現していた。以上から Cygb 欠損星細胞は senescent-associated secretory phenotype (SASP) を呈することが明らかとなった。また、この SASP の誘導に一酸化窒素 (NO) が関与している可能性があり、その解析を進行中である。以上の結果から、星細胞に発現する Cygb は星

細胞の恒常性の維持に極めて重要であり、その欠損は星細胞をプライミングさせ、SASP を呈するフェノタイプ変化させることが誘因の1つとなり、肝臓の臓器全体における炎症、線維化の増強を介して発がんを促進させる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Pathophysiological role of cytoglobin, the fourth globin in mammals, in liver diseases.

Thuy Le TT, Hai NT, Hai H, Kawada N. *Histol Histopathol.* 2016

Mar;31(3):257-67. doi:

10.14670/HH-11-694. 査読無

Cytoglobin as a Marker of Hepatic Stellate Cell-derived Myofibroblasts.

Kawada N. *Front Physiol.* 2015 Nov

13;6:329. doi: 10.3389/fphys.2015.00329.

eCollection 2015. 査読無

Involvement of hepatic stellate cell cytoglobin in acute hepatocyte damage through the regulation of

CYP2E1-mediated xenobiotic metabolism

Teranishi Y, Matsubara T, Krausz KW, Le TT, Gonzalez FJ, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N1.

LABORATORY INVESTIGATION : 95 : 5:

515-524 発行: MAY 2015. 査読無

Cytoglobin deficiency promotes liver cancer development from hepatosteatosis through activation of the oxidative stress pathway.

Thuy le TT, Matsumoto Y, Thuy TT, Hai H, Suoh M, Urahara Y, Motoyama H, Fujii

H, Tamori A, Kubo S, Takemura S, Morita T, Yoshizato K, Kawada N.

Am J Pathol. 2015 Apr;185(4):1045-60.

doi: 10.1016/j.ajpath.2014.12.017.

査読無

Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver.

Motoyama H, Komiya T, Thuy le TT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai

S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y,

Yoshizato K, Kawada N.

Lab Invest. 2014 Feb;94(2):192-207.

doi: 10.1038/labinvest.2013.135.

Epub 2013 Dec 2. 査読無

〔学会発表〕(計2件)

APASL 2015, Istanbul

Evolution of hepatic fibrosis research  
Kawada, N. 2015年3月13日、イスタンブール(トルコ)

AASLD 2015, San Francisco

Loss of Cytoglobin Exacerbates Liver Fibrosis and Cancer Development in Steatohepatitis by Activating the Oxidative Stress Pathway

Le, TT, Matsumoto, Y, Thuy, TTV, Hai, H, Yoshizato, K, Kawada, N. 2015年11月15日、サンフランシスコ(アメリカ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/liver/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 則文 (Kawada, Norifumi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 30271191

(2) 研究分担者

レイ トウイ (Le, Thuy)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号: 10572175

榎本 大 (Enomoto, Masaru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 20423874

田守 昭博 (Tamori, Akihiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 30291595

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: