

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460973

研究課題名(和文) NASH発癌におけるマクロファージの役割と治療への応用

研究課題名(英文) The role of macrophages in NASH-related HCC and an application for therapy

研究代表者

三浦 光一 (Kouichi, Miura)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：90375238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：TLRシグナルは肝臓での炎症や肝発癌で注目を浴びている。私たちは非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に伴う肝発癌において、マクロファージの役割を検討し、治療応用へ方法を探った。NASH発癌モデルとしては肝細胞でのみPTEN遺伝子が欠損するマウスを用いた。マウスに抗生剤を投与して、腸内を滅菌すると腸内細菌に由来するLPSが減少し、肝癌が抑制された。LPSを認識するTLR4が欠損すると、やはり癌が抑制された。マクロファージのTLR4を人工的に欠如させると腫瘍を増殖させる因子が減少し、その結果、肝癌の成長が抑制された。これらの結果からマクロファージに発現するTLR4が肝癌の成長に重要と結論した。

研究成果の概要(英文)：The role of Toll-like receptor (TLR) signaling has attracted much attention in the development of hepatic inflammation and hepatocellular carcinoma (HCC). We used hepatocyte-specific Pten deficient (Pten^{hep}) mice, which exhibit steatohepatitis followed by liver tumor formation including HCC. We then investigated the role of macrophages. Tlr4 deficiency in the Pten^{hep} mice suppressed tumor growth as well as hepatic inflammation. Gut sterilization by antibiotics reduced the portal LPS levels as well as tumor growth in the Pten^{hep} mice. Tumor growth was also decreased by reconstitution of BM-derived cells to Tlr4^{-/-} BM cells. Hepatic macrophages isolated from the Pten^{hep} mice produced much more IL-6 and TNF α in response to LPS. These proinflammatory cytokines induced proliferation of HCC cells as well as oval cells, putative cancer progenitor cells. TLR4 on macrophages contributes to the development of steatohepatitis-related HCC in mice.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝癌 NASH TLR マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

近年、非アルコール性脂肪性肝炎(以下 NASH)は肝癌に至る疾患として注目されている。C型肝炎ウイルスに起因する肝癌は新薬の開発により減少傾向にある。一方、肥満人口の増加から NASH 関連肝癌は今後増加すると推定されている。NASH は未だ有効な治療薬がなく、NASH および NASH 肝癌の発症メカニズムを解明し、治療法や予防法の開発が必要である。

2. 研究の目的

我々はこれまで NASH の進行には自然免疫の関与が重要であることを報告してきた。自然免疫の中でも Toll 様受容体(TLR)を介した炎症誘導が NASH の進行に重要と考えている。そこで本研究では TLR が NASH 発癌にも関与しているかまず検討し、次にマクロファージに発現する TLR にフォーカスを当て、NASH 発癌のメカニズム解明と予防法および治療応用にむけた基礎的検討を行う。

3. 研究の方法

NASH 発癌モデルとして肝細胞特異的 PTEN 欠損マウス(以下 PTEN KO マウス)を用いた。また TLR に関してはグラム陰性菌成分を認識する TLR4 とグラム陽性菌成分を認識する TLR2 にフォーカスを当てる。

- (1) PTEN KO マウスと TLR4 欠損マウスまたは TLR2 欠損マウスを交配し、PTEN-TLR4 または PTEN-TLR2 double knockout (DKO)マウスを作成した。
- (2) 次に、TLR リガンドの供給源となりうる腸管内を抗生物質で滅菌した。
- (3) マクロファージの TLR を選択的に欠損させるため、骨髄移植によるキメラマウスを作成した。
- (4) 肝癌に対するマクロファージの影響を見るため、マクロファージを死滅させるクロドロネート投与を行った。
- (5) 肝臓からマクロファージを分離して TLR4 リガンドである LPS 刺激を行い、マクロファージの LPS に対する感受性を検討した。
- (6) 肝マクロファージと肝癌幹細胞の組織学的検討を行った。
- (7) マクロファージから産生される炎症性サイトカインが肝癌細胞を増殖させるか検討した。

4. 研究成果

(1) これまでの報告通り、PTEN KO マウスでは脂肪性肝炎が認められ、36 週齢過ぎから肝腫瘍を認めた。DKO マウスの検討では PTEN-TLR4 DKO マウスで肝腫瘍が著明に抑制されたが、PTEN-TLR2 DKO マウスでは腫瘍は抑制されなかった。背景肝を比較しても、PTEN-TLR4 DKO マウスにおいて組織学的評価、血清マーカー、そして遺伝子レベルにおいて炎症や肝線維化が抑制された(図 1)。

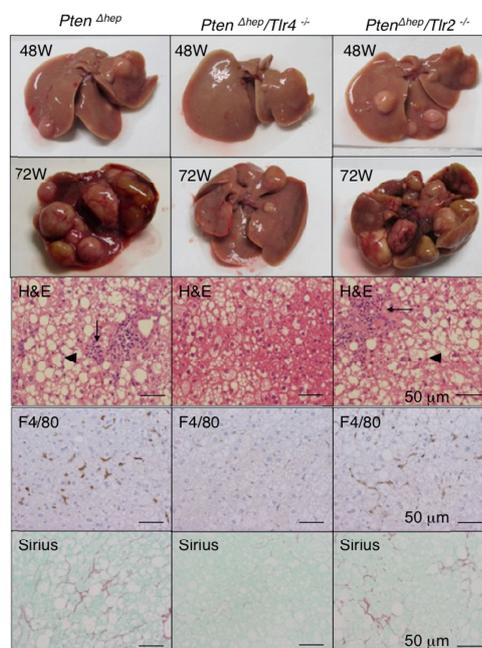


図1. PTEN KOマウス(*Pten*^{Δhep})、PTEN-TLR4 DKOマウス(*Pten*^{Δhep}/*Tlr4*^{-/-})、PTEN-TLR2 DKOマウス(*Pten*^{Δhep}/*Tlr2*^{-/-})での肝腫瘍と脂肪性肝炎の比較(F4/80;マクロファージの浸潤; Sirius; 線維化評価)

次に我々は TLR リガンドの供給源となる腸管を抗生物質で滅菌した。滅菌により腫瘍の増大は抑制され、脂肪性肝炎も改善した。また PTEN KO マウスはコントロールマウスに比べ、門脈中の LPS 濃度が増加していたが、腸管滅菌により LPS 濃度が低下した。

次にどの細胞の TLR4 が腫瘍や脂肪性肝炎に貢献したかをみるために骨髄移植によるキメラマウスを作成した。コントロールの骨髄細胞(PTEN KO マウス由来)を移植した場合と比べ、TLR4 を欠損した骨髄細胞を移植すると脂肪性肝炎が改善し、腫瘍の増殖が抑制された。一方、TLR2 欠損骨髄移植では脂肪性肝炎や腫瘍の抑制は見られなかった。このことは骨髄由来細胞の TLR4 が脂肪性肝炎や腫瘍を促進していることを示している(図 2)。

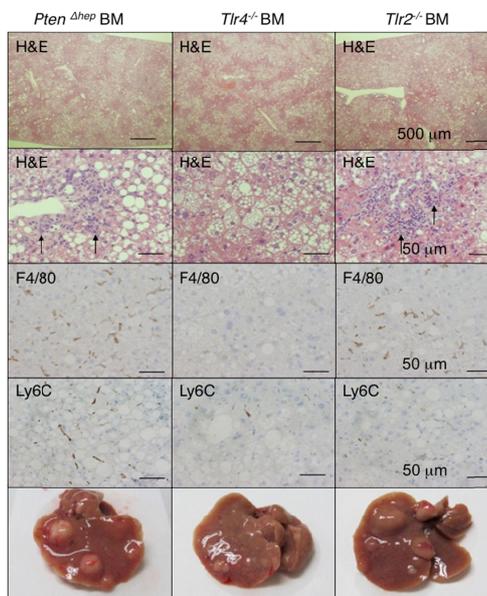


図2 TLR4欠損骨髄移植により脂肪性肝炎が改善し腫瘍増大が抑制

我々はこれまでマクロファージが脂肪性肝炎の進展に関与していること報告してきている。そこで、骨髄細胞の中で TLR4 を発現するマクロファージに注目した。さらに骨髄由来炎症性マクロファージのマーカーである Ly6C 陽性細胞について調べた。正常肝 (*fl/fl*) でこの細胞を発見することは困難であったが、PTEN KO マウス (*hep*) の肝臓ではこの細胞が増加していた。対照的に、抗生剤投与マウス (*hep-AT*) や PTEN-TLR4 DKO マウス (*hep/Tlr4^{-/-}*) の炎症が軽減した群では Ly6C 陽性細胞が減少していた。肝組織での mRNA レベルでも Ly6C 発現は細胞数と平行し、減少していた (図 3A)。実際、PTEN KO マウスでは F4/80 陽性マクロファージのうち、約 70% が Ly6C 陽性細胞であり、分離したマクロファージの Ly6C の mRNA 発現レベルも PTEN KO 由来マクロファージで増加していた (図 3B)。よって、脂肪性肝炎時には炎症性マクロファージが骨髄よりリクルートされていると考えられた。

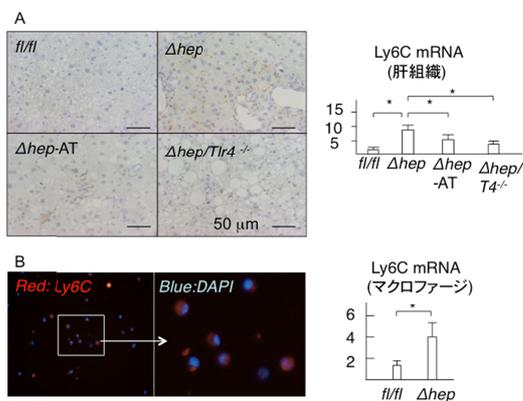


図3 肝組織および肝マクロファージのLy6C発現

次に我々はクロドロネートによるマクロファージの除去を行い、脂肪性肝炎や腫瘍に対する効果をみた。クロドロネート投与により、F4/80 や骨髄由来炎症性マクロファージである Ly6C 陽性マクロファージが減少した。それに伴い、炎症や肝線維化が改善し、腫瘍も抑制された (図 4)。

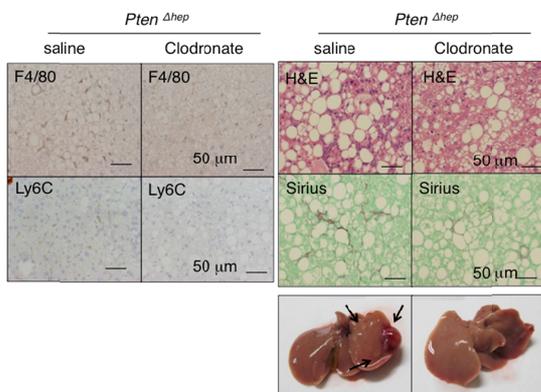


図4 マクロファージ除去(Clodronate)により脂肪性肝炎および肝癌が抑制

マクロファージの TLR4 が脂肪性肝炎や腫瘍の進展に重要であることから、肝臓よりマクロファージを分離して LPS 刺激を行った。PTEN KO マウスから分離したマクロファージでは LPS に敏感に反応し、コントロールマクロファージに比べ、IL-6 や TNF α の産生能が高かった (図 5A)。また LPS に感受性が高まるようにあらかじめマウスを処置した状態で、LPS を投与すると、IL-6 や TNF α 産生能は PTEN KO マウスでより顕著であった。血液中の GPT 値上昇も PTEN KO マウスでより高値を示した (図 5B)。これらの所見から脂肪性肝炎では肝マクロファージが LPS に対して過剰に反応していることが分かった

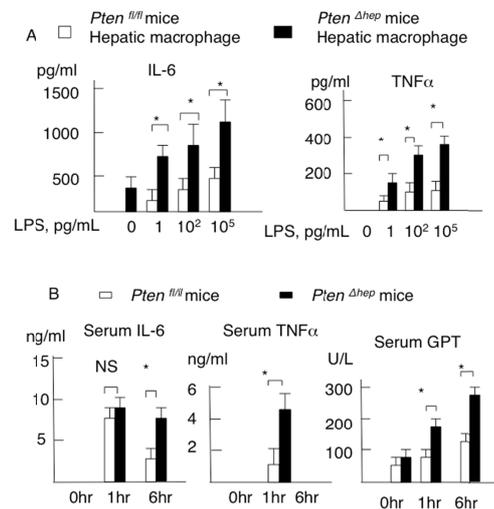


図5 LPS刺激による炎症性サイトカインの変化

炎症が腫瘍の増大を促進した原因として、マクロファージが肝癌幹細胞の増殖を早めたのではと考えた。そこで、肝組織内のマクロファージと肝癌幹細胞のマーカーEpCAM 陽性細胞の数や分布を調べた。PTEN KO マウスの非癌部では F4/80 陽性マクロファージの増加に伴い、EpCAM 陽性細胞が増加した。また前癌病変とされる adenoma 内においても、F4/80 陽性細胞と EpCAM 陽性細胞はパラレルに増加した。一方、PTEN-TLR4 KO マウスでは F4/80 陽性細胞と ECAM 陽性細胞の増加は非癌部および adenoma 内ともに PTEN KO マウスに比べ鈍かった。

そこで、マクロファージから産生される IL-6 や TNF α が肝癌幹細胞や肝癌細胞を増殖させるか検討を行った。細胞としては肝癌幹細胞を含んだ集団とされる oval cell や Huh7 細胞より EpCAM 陽性細胞を分離した。In vitro の結果から、IL-6 には癌幹細胞や癌細胞を増殖させる作用を有し、また TNF α も EpCAM 陽性 Huh7 に対して増殖を示した (図 6A)。このことから in vivo では炎症性サイトカインが癌幹細胞や癌細胞を増殖させている可能性がある。最後に PTEN KO と PTEN-TLR4DKO マウスの腫瘍の組織型を比較

した。どの群も早期には前癌病変とされる adenoma が出現し、後に肝細胞癌(HCC)や胆肝細胞癌(CCC)が出現した。PTEN-TLR4 DKO マウスでは肝細胞癌の出現が遅く、TLR4 が肝癌の進行に寄与していることが判明した(図 6B)。

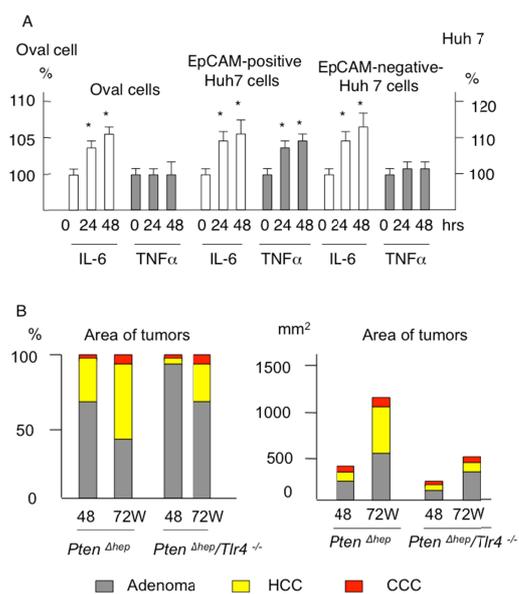


図6 肝癌幹細胞の増殖と肝細胞癌の進展

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 4 件)

1. Miura K, Ishioka M, Minami S, Horie Y, Ohshima S, Goto T, Ohnishi H. Toll-like Receptor 4 on Macrophage Promotes the Development of Steatohepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma in Mice. *J Biol Chem*. 査読有り, 2016, in press
2. 三浦光一, 石岡充彬, 大西英洋, 腸内細菌と線維化合併肝細胞癌. 査読無し, 2015; 70:883-888
3. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J*

Gastroenterol. 査読有り

2014;20:7381-91.

4. 三浦光一, 大西英洋, 腸内細菌と肝癌. *医学のあゆみ*. 査読無し, 2014; 251:63-68

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 三浦光一, 石岡充彬, 大西英洋. NASH 発癌における腸内細菌の解析と病的意義(ワークショップ). 2015 年 10 月 8 日, 第 19 回日本肝臓学会大会, 東京
2. Miura K, Ishioka M, Ohnishi H. TLR4 signaling on macrophages promotes the progression of steatohepatitis and liver tumors in hepatocyte-specific PTEN deficient mice (Oral presentation). 2015 年 5 月 17 日, DDW, Washington DC, USA
3. 三浦光一, 石岡充彬, 大西英洋. NASH 発癌モデルにおける腸内細菌叢の変化-次世代シーケンサを用いた解析-(シンポジウム). 2014 年 11 月 27 日, 第 40 回日本肝臓学会東部会, 東京
4. 三浦光一, 大嶋重敏, 大西英洋. 腸内細菌由来 LPS は炎症を誘導し、NASH 肝癌を促進する. 2014 年 10 月 23 日, 第 18 回日本肝臓学会大会, 神戸
5. 三浦光一, 大嶋重敏, 大西英洋. NASH および NASH 発癌における腸内細菌と TLR の解析(ワークショップ). 2014 年 5 月 30 日, 第 50 回日本肝臓学会総会, 東京
6. 三浦光一, 大嶋重敏, 大西英洋. NASH および NASH 発癌における腸内細菌の役割(ワークショップ). 2014 年 4 月 24 日, 第 100 回日本消化器病学会総会, 東京
7. 三浦光一, 大嶋重敏, 大西英洋. NASH 発癌における TLR と macrophages の役割(シンポジウム). 2013 年 10 月, 第 17 回日本肝臓学会大会, 東京

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 光一 (MIURA KOICHI)

秋田大学 医学部 講師

研究者番号：90375238

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：