

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461333

研究課題名(和文) 肥満・糖尿病が肝がんの発症と腫瘍関連マクロファージの極性に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Effect of obesity and diabetes on liver cancer and tumor-associated macrophage polarization

研究代表者

薄井 勲 (USUI, Isao)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：50377272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、高脂肪食負荷(HFD)による肥満や糖尿病が肝がんと腫瘍関連マクロファージ(TAM)の極性に与える影響について検討した。マウスに発がん物質DENを投与し、肝がんモデルを作成した。HFDマウスでは通常食マウスと比較して肝がんの数とサイズ、およびTAMの数が増加していた。マクロファージ特異的HIF-1a欠損マウス(KO)をHFDで飼育したところ、肝臓のTAMの活性化M1/M2マーカーが低下していた。KOマウスでは肝がんの数が増加したが、腫瘍のサイズに変化がなかった。以上より、肥満マウスの肝臓ではHIF-1a依存性にTAMが活性化され、肝がんの発症を促進していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effect of high fat diet (HFD)-induced obesity and/or diabetes mellitus on liver cancer and tumor-associated macrophages (TAMs) was examined. Model mice for liver cancer were generated by intraperitoneally injecting dimethylnitrosamine (DEN), a chemical carcinogen. HFD treatment increased the number and the size of DEN-induced liver cancers, as well as the number of macrophages inside or outside of the cancers. In macrophage-specific HIF-1a knockout mice (KO), the expression levels of both M1 and M2 activation markers were decreased in macrophages separated from the liver. Interestingly, the number of liver cancers was decreased in the KO mice, although their size was not affected, compared with the wild type mice. These results suggest that TAMs, which were activated in HIF-1a-dependent manner, may promote carcinogenesis in the liver of HFD-fed mice.

研究分野：内科学

キーワード：肝がん 肥満 糖尿病 マクロファージ HIF-1a 低酸素

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは極めて多様な表現型を持つ。そのため個々のマクロファージは、炎症性の特徴を持つ「M1 マクロファージ」と、抗炎症性の特徴を持つ「M2 マクロファージ」というふたつの極性のどちらよりの特徴を持つか、という表現をされることが多い。申請者は近年、肥満インスリン抵抗性の病態における脂肪組織マクロファージ (adipose tissue macrophage; ATM) の役割を中心に研究を進めてきた。そのなかで、肥満マウスの内臓脂肪で増加する ATM は M1 極性を持つこと、その極性誘導には肥満脂肪組織に認められる低酸素とそれによる HIF-1 α の活性化が重要な働きをすることなどを報告してきた。

肥満や糖尿病患者では、がんの発症率が高い。そのメカニズムとしてこれまでに、インスリン抵抗性に伴う高インスリン血症や、高血糖や肥満に伴う酸化ストレス・ER ストレス、慢性炎症など多くの因子の関与が報告されてきた。これらはすべて、腫瘍細胞自身に働きかけるものであった。

一方、がんの局所には多くの炎症・免疫細胞が浸潤している。このなかでも腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) は、腫瘍の局所でその機能を変化させ、腫瘍の悪性化、増殖、浸潤、転移などを促進させることが知られる。しかし、肥満症や糖尿病などの病態が TAM の極性や機能に与える影響については、これまでにほとんど報告がなかった。そこで本研究課題で申請者は、「肥満症や糖尿病が TAM の腫瘍促進作用に影響し、悪性腫瘍の発症・増殖を促進させるのではないか」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究計画では、これまで申請者が行ってきた脂肪組織マクロファージ (ATM) の

解析の経験を応用し、次の2つの課題の解明を目的とした。

(1) 課題1. 食餌性肥満が肝がんの発症とマクロファージの極性に与える影響

肝がんモデルマウスを高脂肪食にて飼育し、肝がんの発症とマクロファージの極性に与える影響について明らかにする。

(2) 課題2. マクロファージの極性変化が肝がんの発症に与える影響

マクロファージの M1 極性に影響を与えることが知られる HIF-1 α 欠損マウスを使って、肝がんの発症に与える影響とその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 課題1.

野生型 C57BL/6 マウスに化学発がん物質 dimethylnitrosamine (DEN) を投与し、通常食および高脂肪食にて飼育する。異なる週齢で肝臓を取り出し、肝臓のがんの数とサイズを肉眼的に評価する。肝臓に浸潤するマクロファージを MACS や FACS にて採取し、極性を RT-PCR などの方法で評価する。また、肝臓の組織標本作製し、肝腫瘍とマクロファージの形態的な関連について調べる。

(2) 課題2.

マクロファージ特定の HIF-1 α 欠損マウスを用い、課題1と同様の方法で DEN 誘導性肝がんモデルマウスを作成、通常食および高脂肪食にて飼育する。HIF-1 α の欠損が、肝腫瘍の発症に与える影響について経時的に評価する。またその時の肝臓に浸潤するマクロファージの極性を、課題1に準

じて評価する。

4. 研究成果

(1) 課題 1.

野生型 C57BL/6 マウスに DEN を投与し、肝がんの発現を誘導した。

高脂肪食によって肥満・糖尿病を誘導したマウスでは通常食にて飼育した非肥満・正常耐糖能マウスと比較して、早い週齢より腫瘍が発症した。30 週齢時に評価すると、高脂肪食負荷群で肝がんの数が増えており、サイズも大型化していた。

組織学的な検討では、高脂肪食負荷マウスの肝臓で、腫瘍の内外に浸潤するマクロファージの数が増加していた。腫瘍サイズの大きいものほど腫瘍内の浸潤数が多かった。

肝臓より採取したマクロファージの極性を調べたところ、腫瘍の発現に伴い数が増加するのは主に M1 極性のものであった。一方、M2 マーカーの発現も増加する傾向にあった。

(2) 課題 2.

ATM の検討から申請者は、マクロファージに発現する HIF-1 α が M1 極性の誘導に関与することを報告している。マクロファージの炎症性 M1 極性を低下させることを目的に、まずマクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損マウス (KO) を用いた実験を行った。

高脂肪食条件にて飼育後野生型マウスと比較したところ、KO マウスでは若い週齢より肝腫瘍の数が減少する傾向が

あり、30 週齢前後で有意差を認めた。興味深いことに、腫瘍のサイズには有意な変化を認めなかった。このことから、マクロファージの HIF-1 α シグナルは腫瘍の発症を促進するものの、増殖には影響を与えないものと考えられた。

KO マウスの肝臓から採取したマクロファージでは、炎症性 M1 マーカーと非炎症性の M2 マーカーの両者が低下していた。このことから、HIF-1 α シグナルは M1/M2 の両方の極性を持つ活性化を促すものと考えた。

組織染色では、低酸素プローブとして知られるピモニダゾールが腫瘍の内外で染色されず、HIF-1 α の活性化には低酸素以外の機序が関与していると考えられた。

以上の結果より、肥満マウスの肝臓では HIF-1 α 依存性にマクロファージが活性化され、肝がんの発症を促進していると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Takikawa A, **Usui I**, Fujisaka S, Ikutani M, Senda S, Hattori S, **Tsuneyama K**, Koshimizu Y, Inoue R, Tanaka-Hayashi A, Nakagawa T, Nagai Y, Takatsu K, Sasaoka T, Mori H, Tobe K. Deletion of SIRT1 in myeloid cells impairs glucose metabolism with enhancing inflammatory response to adipose tissue hypoxia. *Diabetology*

International 査読有、 7, 59-68, 2016

Yoon MJ, Yoshida M, Johnson S, Takikawa A, **Usui I**, Tobe K, Nakagawa T, Yoshino J, Imai S. SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD⁺ and Function in Mice. Cell Metab. 査読有、 21(5): 706-17, 2015

Fujisaka S, **Usui I**, Ikutani M, Aminuddin A, Takikawa A, **Tsuneyama K**, Mahmood A, Goda N, Nagai Y, Takatsu K, Tobe K. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. Diabetologia 査読有、 56(6): 1403-12, 2013

Ishiki M, Nishida Y, Ishibashi H, Wada T, Fujisaka S, Takikawa A, Urakaze M, Sasaoka T, **Usui I**, Tobe K. Impact of divergent effects of astaxanthin on insulin signaling in L6 cells. Endocrinology 査読有、 154(8): 2600-12, 2013

Wada Y, Nakamachi T, Endo K, Seki T, Ohtaki H, Tsuchikawa D, Hori M, Tsuchida M, Yoshikawa A, Matkovits A, Kagami N, Imai N, Fujisaka S, **Usui I**, Tobe K, Koide R, Takahashi H, Shioda S. PACAP attenuates NMDA-induced retinal damage in association with modulation of the microglia/macrophage status into an acquired deactivation subtype. J Mol Neurosci 査読有、 51(2):493-502, 2013

〔学会発表〕(計 18件)

Akiko Takikawa, **Isao Usui**, Qun Zhang, Keisuke Okabe, Tomonobu Kado, Allah Nawaz, Shiho Fujisaka, Takashi Nakagawa, **Koichi Tsuneyama**, Kazuyuki Tobe. Myeloid cell-specific HIF-1 α deletion decreases the number of liver tumors in high fat-fed mice. the American Diabetes Association's 76th Scientific Sessions; 2016 Jun 10-14; New Orleans

瀧川章子, **薄井 勲**, 張 群, 岡部圭介, 角 朝信, Allah Nawaz, 藤坂志帆, **常山 幸一**, 戸邊一之。肥満症・糖尿病での肝がん発症におけるマクロファージ HIF-1 α の働き。第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 May 19-21 ; 京都 岡部圭介, **薄井 勲**, 戸邊一之, 中川崇. Nampt-mediated NAD synthesis regulates the metabolic remodeling during the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. 第 38 回日本分子生物学会年会; 2015 12 月 1-4 日; 神戸

薄井 勲, 瀧川章子, 戸邊一之。肥満における脂肪組織マクロファージの機能。第 36 回日本肥満学会総会 シンポジウム 2015 Oct 2-4; 名古屋

Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Senda S, Okabe K, **Usui I**, Tobe K. Myeloid Cell-specific HIF-1 α Deletion Protected against Insulin Resistance with Increased Angiogenesis in High Fat-fed Mice. the American Diabetes Association's 75th Scientific Sessions; 2015 Jun 5-9; Boston

薄井 勲, 瀧川章子, 戸邊一之。マクロファージ SIRT1 による糖代謝制御。第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム 2015 May 21-24 ; 山口

瀧川章子, Arshad Mahmood, Allah Nawaz, 角朝信, 山本誠士, **常山幸一**, 岡部圭介, 仙田聡子, 中川崇, **薄井 勲**, 合田巨人, 戸辺一之. マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損による食餌性肥満マウスの糖代謝・脂肪組織への影響. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2015 May 21-24; 山口.

瀧川章子, Arshad Mahmood, Allah Nawaz, 角朝信, 仙田聡子, **薄井 勲**, 合田巨人, 戸辺一之. マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損は高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する. 第 88 回日本内分泌学会学術総会; 2015 Apr 23-25; 東京.

瀧川章子, Arshad Mahmood, Allah Nawaz, 角朝信, **薄井 勲**, 戸辺一之. マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損は高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する. 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会; 2015 Feb 13-14; 京都.

瀧川章子, Mahmood A, 仙田聡子, **薄井 勲**, 戸邊一之. マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損は高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する. 日本肥満学会第 19 回アディポサイエンス・シンポジウム; 2014 Aug 23; 大阪.

瀧川章子, Mahmood A, **薄井 勲**, 戸邊一之. マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損は高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する. 日本内分泌代謝学サマーセミナー; 2014 Jul 10-12; 山梨.

Takikawa A, Mahmood A, Fujisaka S, Nakagawa T, Senda S, Aminuddin A, **Usui I**, Tobe K. Myeloid Cell-Specific Deletion of Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha Gene Protected against Diet-Induced Insulin Resistance in Mice. 74th scientific sessions of

American Diabetes Association; 2014 Jun 13-17; San Francisco.

薄井 勲, 瀧川章子, 戸辺一之. 肥満脂肪組織の慢性炎症と低酸素シグナル 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム 2014, May 大阪

瀧川章子, **薄井 勲**, 藤坂志帆, Mahmood A, 仙田聡子, Aminuddin, 岡部圭介, 角朝信, 小清水由紀子, 戸辺一之. 脂肪組織の慢性炎症における低酸素とマクロファージの関連. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2014 May 22-24; 大阪.

Aminuddin, Takikawa A, **Usui I**, Fujisaka S, Mahmood A, Nawaz A, Tobe K. Depletion of CD206-positive cells is associated with increased white adipose tissue proliferation. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2014 May 22-24; 大阪.

Mahmood A, Senda S, Nakagawa T, Fujisaka S, Takikawa A, Aminuddin A, Nawaz A, **Usui I**, Tobe K. Myeloid-Specific deletion of Hypoxia-inducible factor 1-alpha gene protected against Diet induced Insulin resistance. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2014 May 22-24; 大阪.

瀧川章子, Mahmood A, 藤坂志帆, 仙田聡子, Aminuddin, 中川崇, **薄井 勲**, 戸邊一之. マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損は高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する. 第 51 回日本臨床分子医学会学術集会; 2014 Apr 11-12; 東京. **薄井 勲**, 瀧川章子, 戸辺一之. 肥満糖尿病マウスの脂肪組織低酸素シグナルと慢性炎症に関する研究 第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 シンポジウム 2014 Feb 宮崎

〔図書〕(計 8件)

薄井 勲, 戸邊一之 M1/M2 マクロファージの多様性とその制御。医学のあゆみ 257(6), 2016

瀧川章子, **薄井 勲**, 戸邊一之. 脂肪細胞からみた糖尿病の病態と治療. 月刊糖尿病 7(1): 6-13, 2015

薄井 勲, 戸邊一之 脂肪組織マクロファージとインスリン抵抗性 Annual Review 糖尿病・内分泌 71-77, 2014

薄井 勲, 戸邊一之. メタボリックシンドロームとマクロファージポラリティー 血管医学 6月号, 2014

薄井 勲, 戸邊一之 脂肪組織マクロファージと低酸素 医学のあゆみ 特集「肥満の医学--臨床と研究の最先端」 751-754, 2014

M2 マクロファージと疾患。 **薄井 勲**, 戸邊一之 別冊・医学のあゆみ 自然免疫 Update-研究最前線 129-134, 2013

Toll-like receptor (TRL)と糖尿病、インスリン抵抗性。 **薄井 勲**, 藤坂志帆, 戸邊一之 内分泌・糖尿病・代謝内科 36(6): 548-551, 2013

糖尿病発症における臓器の役割 脂肪組織。 **薄井 勲**, 戸邊一之 糖尿病 56(7): 417-419, 2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

薄井 勲 (USUI, Isao)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号: 50377272

(2)研究分担者

早川芳弘 (HAYAKAWA, Yoshihiro)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 10541956

(3)連携研究者

常山幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学系)・教授
研究者番号: 10293341