様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ５ 月 ２３ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2013～2014
課題番号：２５８９３０４２

研究課題名（和文）炎症・ストレスシグナルを介したNASH発癌機構の解明と治療応用への基礎的検討

研究課題名（英文）Roles of inflammation- and stress-related signaling pathways in NASH-associated hepatocarcinogenesis

研究代表者
中川　勇人（HAYATO, NAKAGAWA）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：００５５５６０９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では新規マウスモデルを用いて、NASH・肥満による肝発癌機構について解析した。小胞体ストレスと肝脂肪蓄積は脂肪酸合成に重要な転写因子SREBP1の活性化を介して悪性サイクルを形成し、TNFをはじめとする炎症性サイトカインの発現亢進などを通じて肝発癌を促進した。また小胞体ストレス低減剤やTNF阻害剤の投与によってマウスの病態を改善させた。これらはNASH・肥満肝癌の有望な治療ターゲットとなり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed the mechanisms of NASH- and obesity-associated hepatocarcinogenesis using new mouse models. Feeding an HFD to MUP-uPA mice resulted in steatohepatitis that closely resembles the pathology of human NASH, eventually leading to spontaneous development of HCC. In this mouse model, the vicious cycle of ER stress and hypernutrition synergistically aggravates lipid accumulation in the liver via SREBP activation, which leads to excess oxidative stress, ballooning degeneration, and susceptibility to lipotoxic cell death. In parallel, increased TNFα expression during this process further accelerates NASH and HCC development in a TNF receptor 1-IKK-NF-κB-dependent manner. Reducing ER stress using chemical chaperones significantly improved liver pathology, suggesting that interrupting this vicious cycle might be a promising therapeutic target for NASH and HCC.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎　肝細胞癌

１．研究開始当初の背景

近年肥満人口の増加と相まって、メタボリック症候群をベースにした炎症を伴う脂肪肝、いわゆる非アルコール性脂肪肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis; NASH)からの肝発癌が増加してきており、今後さらに増加することが予想される。また近年の疫学研究から、肥満は NASH だけでなく、肝炎ウイルスによる肝線維化や発癌も促進することが明らかとなってきた。しかしながら、肥満がどのように肝疾患を進展させるのかについては不明な点が多い。

肝発癌には慢性炎症がきわめて重要であることはよく知られている。高脂肪食を与えたマウスでは肝化学発癌剤ジエチルニトロサミン(DEN)による肝発癌が促進されるが、IL-6やTNFR1欠損マウスでは促進されないことが報告されており、肥満による肝発癌促進においても炎症性サイトカインが関与していることを明らかとなった(Park EJ, et al. Cell 2010)。しかし、この DEN+HFD モデルはヒト肝癌ではほぼ必須である背景肝の線維化が存在せず炎症も非常に軽微であるため、ヒト肝癌の微小環境を模倣できているとは言い難い。また本研究では IL-6 や TNFa がどのように肝発癌を促進しているのかについては、不明のままである。

また今までにいくつかの NASH マウスモデルが報告されているが、NASH に必須な要素である、肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝、肝臓への炎症細胞浸潤、肝線維化、さらに最終的な発癌までを模倣できるモデルは存在しない。このことは NASH の病態解明において、大きな障壁となっている。

そこで本研究では、申請者らが最近報告した肝炎症発癌マウスモデルに、さらに改良を加えて肥満・NASH 関連肝発癌マウスモデルを作成し、その病態進展メカニズムの解明を行った。

２．研究の目的

新規の肥満・NASH 関連肝発癌マウスモデルを作成し、炎症・ストレスシグナルに焦点を当てその病態進展メカニズムを解析するとともに、治療応用への基礎的検討を行う。

３．研究の方法

肝化学発癌剤 DEN 投与 5 か月後のマウスから肝細胞を分離すると、通常の肝細胞よりやや小型の aggregate した細胞集団を認め、それらを単離し、自然に肝炎を発症する MUP-uPA マウス(肝細胞で発現する Major urinary protein (MUP) プロモーター下に urokinase-type plasminogen activator（uPA）を発現する）の肝臓に経脾臓的に移植すると、5 か月後に多数の HCC を発症する(He G, et al. Cell 2013)。この aggregated cells は肝前駆細胞と HCC の中間的な発現プロファイルを持っており、いわゆる HCC progenitor cell (HcPC) を多く含む細胞集団と考えられる。このモデルの利点は肝炎による発癌の promotion というヒト肝癌の重要なプロセスを模倣でき、且つドナーやレシピエントに異なる遺伝子改変マウスを使用することで、その遺伝子の癌細胞における役割と周囲の微小環境における役割を別々に解析できる点である。そこで本マウスモデルにおいても肥満が肝発癌を促進するのかを調べるため、HcPC を移植した MUP-uPA マウスに高脂肪食を与え、5 か月後に発癌の状態を評価し、メカニズムを詳細に解析した。さらに HcPC を移植せずに高脂肪食を与えたのみの MUP-uPA マウスについても解析を行った。

４．研究成果

(1)新規 NASH 肝癌モデルの作成

MUP-uPA マウスに高脂肪食を与えると、肝細胞 ballooning、肝細胞周囲線維化や架橋線維化、炎症細胞浸潤など、NASH 類似の組織像を呈し、インスリン抵抗性も示すことがわかっ

た。この環境下に前述の HcPC を移植したところ有意に腫瘍が増大し、この方法によって NASH 環境下における癌細胞発育促進メカニズムを解析できると考えられた。さらに 40 週齢まで高脂肪食を与えると、HcPC を移植しなくとも、自然に肝細胞癌を発症した。すなわち自然発癌モデルによって NASH 進展および HCC の initiation step を、そして移植モデルを用いて promotion, progression step を、というように NASH 発癌の様々なプロセスを詳細に解析することが可能となった。

(2)NASH 進展における小胞体ストレスの役割

MUP-uPA マウスで肝細胞死が起きる原因はよくわかっていないが、小胞体（Endoplasmic reticulum stress; ER）が著明に拡張していることが報告されおり、この ER の拡張はヒト NASH の重要な所見である ballooning hepatocyte においても共通してみられる所見である。よって本マウスでみられる小胞体の障害が単純性脂肪肝から NASH へ進展するカギとなっているのではないかと考えた。まず 5 週齢の MUP-uPA マウスの肝臓における ER ストレスマーカーを調べたところ著明に発現が増加しており、さらに高脂肪食を負荷すると synergistic に非常に高い ER ストレスが持続していることがわかった。また高脂肪食負荷 MUP-uPA マウスでは ER stress を介して脂肪酸合成に重要な SREBP1 の核移行が亢進し、16 週齢ですでに著明な脂肪蓄積が認められた。それに伴い、肝組織中の酸化ストレスのレベルも上昇していた。ER ストレス低減剤のタウロデオキシコール酸投与および分子シャペロン GRP78 の過剰発現によって、SREBP1 活性化と NASH の病態は有意に改善され、ER ストレスによる SREBP1 活性化が肝脂肪化との悪性サイクルを形成し、病態進展に寄与しているものと考えられた。この現象は初代肝細胞でも確認された。

(3) NASH 肝癌における TNF シグナルの役割

次に本マウスモデルにおける炎症性サイトカインの役割を検討した。高脂肪食 MUP-uPA マウスでは特に TNFa の発現が著明に増加しており、主にマクロファージから分泌されていた。そこで TNFa の病態進展への関与を調べるため、TNFR1 欠損(TNFR1KO)マウスと MUP-uPA マウスを交配させることで TNFR1KO/MUP-uPA マウスを作成し、高脂肪食を投与したところ、TNFR1KO/MUP-uPA マウスは MUP-uPA マウスに比べ、NASH の病態が有意に改善し、また発癌についても有意に抑制された。

上記の結果から、TNFa が本マウスの病態進展に重要な役割を果たすことが明らかとなったが、発癌プロセスという点では、NASH の病態を改善させたことの結果なのか、腫瘍進展に直接寄与しているのか区別できない。そこで前述の NASH 環境下における HCC の promotion・progression プロセスへの TNFa の役割を詳細に解析するため、次のような 2 つのモデルを作成した。

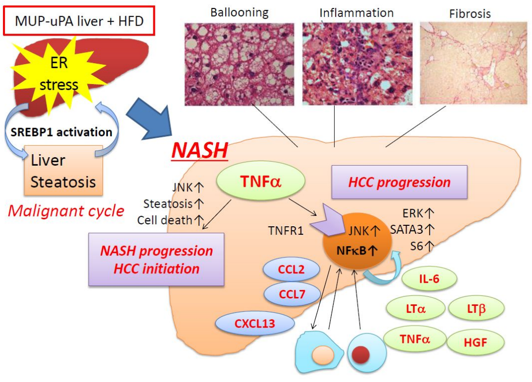
①腫瘍細胞への直接的な TNFa の役割を検討するため、2 週齢の TNFR1KO マウスに DEN を投与して 5 か月後に HcPC を分離し、MUP-uPA マウスに移植し高脂肪食を与える。この方法によって腫瘍細胞でのみ TNFR1 を KO した状態にできる。

②微小環境における TNFa の役割を解析するため、TNFR1KO/MUP-uPA マウスに WT マウス由来 HcPC を移植するモデルを作成し、同様の検討を行う。すなわち、全身では TNFR1 が KO された状態であるが、腫瘍細胞では TNFR1 が発現した状態とできる。

移植 5 か月後、②の実験では依然として高脂肪食による腫瘍促進傾向が認められたのに対して、①の実験では高脂肪食を投与しても腫瘍の増大が認められなかった。この実験結果から promotion、progression step においては、TNFa が直接腫瘍細胞に作用して増殖を

促進していることが明らかとなった。

WT-HcPC を移植した腫瘍部では高脂肪食により腫瘍細胞内の NF-κB が著明に活性化し、腫瘍内での炎症性サイトカイン・ケモカインの発現亢進と炎症細胞浸潤の増加がみられたが、TNFR1KO-HcPC では通常食時と同等であった。また TNF 阻害剤 Enbrel 投与によっても、高脂肪食による肝癌増大は有意に抑制された。さらに HcPC において NF-κB の上流因子 IKKβを欠損させたところ、高脂肪食によるケモカイン上昇と腫瘍促進効果はキャンセルされた。これらの結果から、NASH 環境下における肝癌増大には、TNF-IKK 経路を介した tumor-associated inflammation が寄与していることが明らかとなった(下図)。



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　１４件）

1) Fujiwara N, Nakagawa H, Kudo Y, Tateishi R, Taguri M, Watadani T, Nakagomi R, Kondo M, Nakatsuka T, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Tanaka Y, Ohtomo K, Shiina S, Koike K. Sarcopenia, Intramuscular Fat Deposition, and Visceral Adiposity Independently Predict the Outcomes of Hepatocellular Carcinoma. ***J Hepatol.*** in press.

2) Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, Arano T, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Impact of serum levels of IL-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients. ***J Gastroenterol Hepatol.*** 2015 Feb;30(2):379-88. doi: 10.1111/jgh.12719. 査読有

2) Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, Zhong Z, Valasek MA, Seki E, Hidalgo J, Koike K, Kaufman RJ, Karin M. ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. ***Cancer Cell.*** 2014 Sep 8;26(3):331-43. doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.001. 査読有

3) Umemura A, Park EJ, Taniguchi K, Lee JH, Shalapour S, Valasek MA, Nakagawa H, Seki E, Hall MN, Karin M. Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition. ***Cell Metab.*** 2014 Jul 1;20(1):133-44. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.001. 査読有

4) Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 2014 Jan 21;111(3):1090-5. doi: 10.1073/pnas.1322731111. 査読有

〔学会発表〕（計　８件）

1) 中川勇人、ほか：新規マウスモデルを用いた NASH 発癌機構の解明. 第 1 回肝臓と糖尿病・代謝研究会、東京、2014 年 7 月 4 日.

2) 中川勇人、ほか：新規マウスモデルを用いた NASH 肝癌における TNFα の役割解析. 第 21 回 JDDW, 東京. 2013 年 10 月 10 日.

〔図書〕（計　１件）

1) 中川勇人、ほか：Autocrine IL-6 依存的な肝癌前駆細胞の同定、北隆館、月刊細胞 2015 年 2 月号、54-57

６．研究組織

(1)研究代表者

中川　勇人（HAYATO NAKAGAWA）
東京大学・医学部付属病院・助教
研究者番号：00555609