

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293179

研究課題名(和文)酸化ストレス応答シグナルの網羅的解析による肝発癌機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of hepatocarcinogenic mechanisms by comprehensive analysis of cellular signaling responding to oxidative stress

研究代表者

日野 啓輔 (Hino, Keisuke)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは重要な肝発癌機構であるが、本研究で以下の2点を明らかにした。(1)酸化ストレスによって細胞内情報伝達が影響を受け、糖代謝や細胞死機構が影響を受ける。(2)酸化ストレスの主役は活性酸素種(ROS)であるが、ROSの主な産生部位であるミトコンドリアの品質管理障害は肝発癌に関係し、細胞内の鉄が減少するとミトコンドリアの品質管理障害が回復する。以上の結果は肝発癌における酸化ストレスの意義を説明する。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms underlying oxidative stress induces hepatocarcinogenesis in terms of cellular signaling and mitochondria quality control. Oxidative stress modified cellular signaling for glycolysis and apoptosis through activation of several kinase. These changes were cancelled by antioxidant, N-acetyl cysteine. Mitochondria is the main site of ROS production. Therefore, mitochondria quality control is critical for controlling oxidative stress. We found that iron loss reduces the development of liver tumors in NASH-related hepatocarcinogenic mouse model through induction of mitochondria quality control.

研究分野：肝臓病学、肝発癌、酸化ストレス

キーワード：酸化ストレス 活性酸素種 細胞内シグナル ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

依然、肝細胞癌の第一位の原因はC型肝炎ウイルス (HCV) である。Direct Acting Antiviral (DAA)の登場によりHCVの排除が容易になると予想されるが、sustained viral responder (SVR)例からの肝発癌に代表されるように、HCV 排除のみでHCV 関連肝癌が撲滅されるわけではない。一方、HCV 関連肝癌の制御にはHCV 感染のみでなく、インスリン抵抗性、肝脂肪化、鉄代謝異常などが発癌促進因子として関与することが明らかにされている。こうした代謝異常の根幹に共通する病態の一つは酸化ストレスである。HCV による肝発癌機構はこれまで主として細胞内シグナルや転写因子の活性制御等の観点から検討されてきたが、HCV を基軸とした酸化ストレスと細胞内シグナルの関係については殆ど明らかにされていない。酸化ストレスの実行分子は活性酸素種 (ROS) であるが、ROS の主たる産生部位はミトコンドリアである。このため過剰な ROS 産生を防ぐため、ミトコンドリアには抗酸化機構が備わっている。ミトコンドリアの機能障害により抗酸化機能が発揮できず、過剰な ROS を産生しないために、障害をもつミトコンドリアはミトコンドリア特異的オートファジー (マイトファジー) により排除され、ミトコンドリアの品質管理が制御されている。酸化ストレスによる肝発癌にミトコンドリア品質管理障害がどのように関与しているかも明らかにされていない。

2. 研究の目的

ROS に起因する酸化ストレスの分子機構は、不対電子をもつフリーラジカルによる細胞内高分子の障害と H₂O₂ に代表される非ラジカルラジカル oxidant による細胞内シグナルの障害やレドックス制御機構の破綻に大別される。細胞内の酸化ストレス環境ではラジカルスカベンジャーの存在によりラジカルよりも圧倒的に非ラジカル oxidant が多く存在する。アミノ酸の cysteine (Cys) は多くのタンパク質の活性部位に存在し、酸化・還元センサーであるチオール基 (-SH) を含有する。細胞内が酸化状態になるとチオール基は酸化型 (-SS-や-SO⁻) に変化することで、タンパク質活性部位の On-Off スイッチとなり、さらには高分子との相互作用やアロステリックな作用でタンパク質の活性に影響を及ぼす。したがって、チオール基は酸化・還元状態に応じた細胞内のシグナル伝達や転写因子の DNA 結合あるいは受容体の活性化に重要な役割を果たすと考えられる。Cys は殆どすべての phosphatase に含有されているため、酸化状態では phosphatase 活性が抑制され、kinase 活性が相対的に活性化されることが明らかにされており、これまで報告されてきた HCV コアタンパクによる種々の細胞内シグナル (NF-κB、MAPK、TGF-β など) の変

化との関連も想定される。そこで代表的な細胞内シグナル別にシグナル内タンパク質のリン酸化状態を網羅的に解析し、HCV による酸化ストレスに対してどのようなシグナル経路が変化しているのかを明らかにする。

一方、われわれはこれまでに HCV がミトコンドリア障害を引き起こすだけでなく、マイトファジーを抑制することも報告してきた (*Am J Pathol* 2014)。そこでマイトファジーの回復が肝発癌を抑制するかどうかを検討することで、ミトコンドリア品質管理障害と肝発癌との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス状態下での細胞内蛋白質リン酸化状態の網羅的解析

HCV-JFH1 株感染細胞ならびにヒト肝細胞キメラマウスを用いて、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) を利用した iTRAQ®リン酸化部位同定・相対的定量解析を行った。

(2) マイトファジー誘導による肝発癌抑制効果についての検討

鉄キレート剤によるマイトファジー誘導の報告 (*EMBO reports* 2013) を参考にして、鉄キレート剤がマイトファジー誘導を介して、脂肪肝関連肝発癌マウスモデル (STAM マウス、7,12-dimethylbenz(a)anthracene [DMBA]投与後高カロリー飼育マウス) の肝発癌を抑制するかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレス状態下での細胞内蛋白質リン酸化状態の網羅的解析

ROS 産生が亢進している HCV 感染細胞では 488 種類の蛋白に質量変化を認めた。そのうち 80.3% がリン酸化による質量増加であった。リン酸化を受けたアミノ酸の 97% が serine、3% が threonine であり、ストレス応答性キナーゼである serine/threonine kinase の活性亢進が示唆された。非感染細胞と比較してリン酸化タンパク質の質量比が 1.2 以上、すなわち JFH1 感染細胞でリン酸化が亢進していたタンパク質を 125 個認めた。逆に質量比が 0.8 以下、すなわちリン酸化が抑制された蛋白は 4 個のみであった。

JFH1 感染細胞でリン酸化が亢進したタンパク

Protein	Related pathway	Targeting point
Isiorm 7 of tight junction protein ZO-2	Apoptosis	Apoptotic cleavage of cell adhesion protein
Alpha-amylase	Glucose metabolism	Glycolysis
Isiorm 2 Heat shock protein HSP 90-alpha	Metabolism of nitric oxide	eNOS activation
Endoplasmic	Toll-like receptors cascade	ATF-α activates chaperone genes
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthetase, cytoplasmic	Regulation of lipid metabolism by PP2A/alpha	Activation of gene expression of SREBP
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Regulation of insulin secretion	Acetylcholine regulates insulin secretion
Peroxiredoxin-1	Cellular responses to stress	Detoxification of ROS
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	Apoptosis	Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins
Glyoxaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glucose metabolism	Glycolysis
Alpha-adducin	Apoptosis	Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins
Sequestosome-1	NF-κB is activated and signals survival	IKKβ is activated
RNA polymerase-associated protein LEO1	Signaling by Wnt in cancer	XVAF39 binds tankyase to stabilize axin and inhibit Wnt signaling
High mobility group protein B1	Activation of DNA fragmentation factor	Association of HMGB1/HMGB2 with chromatin
Pyruvate kinase PKM	Glucose metabolism	Glycolysis
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Signaling by type 1 insulin-like growth factor 1 receptor	PI3K activation
Lamin B1	Apoptosis	Apoptotic cleavage of cellular proteins
Catenin alpha-1	Signaling by VEGF	VEGFA-VEGFR2 pathway
Phosphatidate cytidylyltransferase 2	Metabolism of lipids and lipoproteins	Synthesis of FGF

HCV-JFH1 株感染細胞においてリン酸化が亢進した主なタンパク質と関与する細胞内シグナル経路の一覧を表 1 に示す。

一方、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織では信頼度 99.9% 以上のリン酸化タンパクは 292 個同定された。HCV 感染キメラマウス/非感染キメラマウスに対応するタンパクの質量比が 1.2 以上、すなわち HCV 感染キメラマウスでリン酸化亢進していたタンパクを 56 個に認められた。一方、質量比が 0.8 以下、すなわちリン酸化が抑制されたタンパクは 34 個であった。以上の結果から、HCV 感染による酸化ストレスはストレス応答性キナーゼ活性を活性化させ、細胞内リン酸化シグナルを亢進させるのではないかと考えられたが、in vitro と in vivo での細胞内リン酸化シグナル活性化には差が認められ、更なる検討が必要と考えられた。

(2) HCV 感染細胞でのリン酸化亢進タンパクの個別解析

リン酸化の亢進したタンパク質のうち糖代謝に関連する pyruvate kinase muscle isozyme (PKM) と細胞骨格タンパクである alpha-adducin (ADD1) のリン酸化について HCV-JFH1 株感染細胞を用いて検討した。PKM はリン酸化されるとその活性が低下することが知られているが、HCV-JFH1 株感染細胞では PKM の活性は低下し、抗酸化剤である N-acetyl cysteine (NAC) の添加により PKM の活性は回復した。HCV 非感染 Huh7 細胞に H₂O₂ を加えると PKM の活性は低下した。また、HCV-JFH1 株感染細胞ではリン酸化 ADD1 の発現量は亢進していたが、NAC の添加によりリン酸化 ADD1 の発現量は低下した。PKM は解糖経路の最終段階の律速酵素であり、ADD1 のリン酸化が caspase 3 による ADD1 の cleavage に関与することが報告されている。以上の成績は、細胞内の酸化ストレスにより種々のタンパク質のリン酸化が亢進し、様々な細胞内シグナルを変化させることを示していると考えられた。

(3) 鉄キレート剤によるマイトファジー誘導と肝発癌抑制に関する検討

鉄キレート剤(Deferiprone, DFP)を Huh7 細胞に投与すると、細胞内、ミトコンドリアへの鉄が減少し、電子顕微鏡的には障害ミトコンドリアが隔離膜で被われた小胞体(マイトファゴソーム)が増加し、マイトファジーの誘導が確認された。ミトコンドリアの鉄代謝関連分子の発現を調べたところ、ミトコンドリアフェリチン(FtMt)の発現上昇が確認された。一方、FtMt はオートファジーの cargo receptor である nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4) と結合することが明らかとなった(図 1)。さらに FtMt をノックダウンするとマイトファジーの誘導は抑制された。

In vivo では DFP 投与により STAM マウスと

DMBA 投与後高カロリーマウスの肝発癌とともに抑制した(図 2)。

図 1 : ミトコンドリアフェリチンと NCOA4 の共免疫沈降

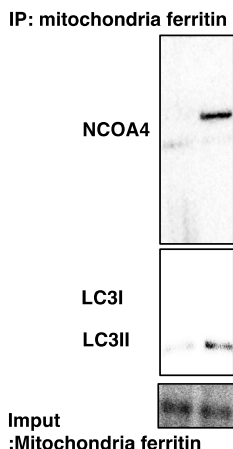
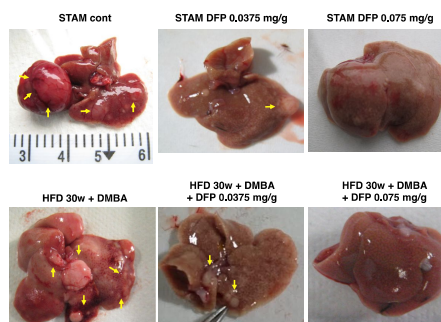


図 2

DFPは容量依存性に脂肪肝からの肝腫瘍形成を抑制する



以上の結果から鉄キレート剤によるマイトファジーの誘導は肝発癌を抑制することが明らかとなった。

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 21 件)

1. Masugi Y, Abe T, Tsujikawa H, Effendi K, Hashiguchi A, Abe M, Imai Y, Hino K, Hige S, Kawanaka M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Sakamoto M. Quantitative assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Commun* 2018, 2, 58-68, doi: 10.1002/hep4.1121.
2. Nishida N, Sugiyama M, Sawai H, Nishina S, Sakai A, Ohashi J, Khor SS, Kakisaka K, Tsuchiura T, Hino K, Sumazaki R, Takikawa Y, Murata K, Kanda T, Yokosuka

- O, Tokunaga K, Mizokami M. Key HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and role of the BTNL2 gene for response to a hepatitis B vaccine. *Hepatology* 2018, doi: 10.1002/hep.29876.
3. Kudo M, Ueshima K, Ogasawara S, Obi S, Izumi N, Aikata H, Nagano H, Hatano E, Sasaki Y, Hino K, Kumada T, Yamamoto K, Imai Y, Iwadou S, Ogawa C, Okusaka T, Kanai F, Akazawa K, Yoshimura KI, Johnson P, Arai Y, Sillius study group. Sorafenib plus low-dose cisplatin and fluorouracil hepatic arterial infusion chemotherapy versus sorafenib alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma (SILIUS): a randomised, open label, phase 3 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018, doi: 10.1016/S2468-1253(18)30078-5.
 4. Kawanaka M, Tomiyama Y, Hyogo H, Koda M, Shina T, Tobita H, Hiramatsu A, Nishino K, Okamoto T, Sata S, Hara Y, Nishina S, kawamoto H, Chayama K, Okanoue T, Hino K. Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein predicts the development of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2018, doi: 10.1111/hepr.13054.
 5. Yanatori I, Richardson DR, Toyokuni S, Kishi F. The iron chaperone poly(rC)-binding protein 2 forms a metabolon with the heme oxygenase 1/cytochrome P450 reductase complex for heme catabolism and iron transfer. *J Biol Chem* 2017, 292, 13205-29. doi: 10.1074/jbc.M117.776021.
 6. Matsumoto A, Nishiguchi S, Enomoto H, Kang JH, Tanaka Y, Shinkai N, Kurosaki M, Enomoto M, Kanda T, Yokosuka O, Yatsushashi H, Nagaoka S, Okuse C, Kagawa T, Mine T, Takaguchi K, Saito S, Hino K, Ikeda F, Sakisaka S, Morihara D, Miyase S, Tsuge M, Chayama K, Hiramatsu N, Suzuki Y, Murata K, Tanaka E. Combinational use of hepatitis B viral antigens predicts responses to nucleos(t)ide analogue/peg-interferon sequential therapy. *J Gastroenterol* 2018;53:247-57. doi: 10.1007/s00535-017-1360-z.
 7. Tamada T, Korenaga M, Yamamoto A, Higaki A, Kanki A, Nishina S, Hino K, Ito K. Assessment of clinical and magnetic resonance imaging features of de novo hypervascular hepatocellular carcinoma using gadoxetic acid-enhanced magnetic resonance imaging. *Hepatol Res* 2017;47:E152-60. doi: 10.1111/hepr.12742.
 8. Nakamura M, Nakata K, Matsumoto H, Ohtsuka T, Yoshida K, Tokunaga S, Hino K. Acyl/free carnitine ratio is a risk factor for hepatic steatosis after pancreatoduodenectomy and total pancreatectomy. *Pancreatol* 2017;17:135-8. doi: 10.1016/j.pan.2016.11.007.
 9. Koyama N, Hata J, Sato T, Tomiyama Y, Hino K. Assessment of hepatic fibrosis with superb microvascular imaging in hepatitis C virus-associated chronic liver diseases. *Hepatol Res* 2017;47:593-7. doi: 10.1111/hepr.12776.
 10. Ueno D, Nakashima H, Higashida M, Yoshida K, Hino K, Irei I, Moriya T, Matsumoto H, Hirai T, Nakamura M. Emergent laparoscopic cholecystectomy for acute acalculous cholecystitis revisited. *Surg Today* 2016;46:309-12. doi: 10.1007/s00595-015-1173-8.
 11. Okamoto, K, Koda, M. Okamoto, T. Onoyama, T. Miyoshi, K. Kishina, M. Kato, J. Tokunaga, S. Sugihara, T. A. Hara, Y. Hino K, Murawaki, Y. A Series of microRNA in the Chromosome 14q32.2 Maternally Imprinted Region Related to Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in a Mouse Model. *PLoS One* 2016;11:e0154676. doi: 10.1371/journal.pone.0154676.

12. Nishikawa H, Shiraki M, Hiramatsu A, Moriya K, [Hino K](#), Nishiguchi S. Japan Society of Hepatology guidelines for sarcopenia in liver disease (1st edition): Recommendation from the working group for creation of sarcopenia assessment criteria. *Hepatol Res* 2016;46:951-63. doi: 10.1111/hepr.12774.
13. Nishida, N. Ohashi, J. Khor, S.S. Sugiyama, M. Tsuchiura, T. Sawai, H. [Hino K](#), Honda, M. Kaneko, S. Yatsushashi, H. Yokosuka, O. Koike, K. Kurosaki, M. Izumi, N. Korenaga, M. Kang, J.H. Tanaka, E. Taketomi, A. Eguchi, Y. Sakamoto, N. Yamamoto, K. Tamori, A. Sakaida, I. Hige, S. Itoh, Y. Mochida, S. Mita, E. Takikawa, Y. Ide, T. Hiasa, Y. Kojima, H. Yamamoto, K. Nakamura, M. Saji, H. Sasazuki, T. Kanto, T. Tokunaga, K. Mizokami, M. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Sci Rep* 2016;6:24767. doi: 10.1038/srep24767.
14. Nakamura, M. Matsumoto, H. Nakashima, H. Ando, Y. Hirai, T. Yoshida, K. [Hino, K](#). L-carnitine supplementation improved hepatic steatosis after pancreatectomy. *Pancreas* 2016;45:e7-9. doi: 10.1097/MPA.0000000000000508.
15. Matsunami K, Nishida N, Kaneko N, Ikeo K, Toyo-Oka L, Takeuchi H, Matsuura K, Tamori A, Nomura H, Yoshiji H, Imamura M, Masaki N, Hayakawa T, Ide T, Shimada N, Ikeda F, [Hino K](#), Nishiguchi S, Okuse C, Nojiri S, Sawamoto K, Tokunaga K, Joh T, Tanaka Y. Genome-Wide Association Study Identifies ZNF354C Variants Associated with Depression from Interferon-Based Therapy for Chronic Hepatitis C. *PLoS One* 2016;11:e0164418. doi: 10.1371/journal.pone.0164418
16. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, [Hino K](#), 他 2464 名 (829 番目) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12;1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.
17. Nishida N.Ohashi J. Sugiyama M. Tsuchiura T. Yamamoto K. [Hino K](#). Honda, M. Kaneko S. Yatsushashi H. Koike K. Yokosuka O. Tanaka E. Taketomi A. Kurosaki M. Izumi N. Sakamoto N. Eguchi Y. Sasazuki T. Tokunaga K. Mizokami M. Effects of HLA-DPB1 genotypes on chronic hepatitis B infection in Japanese individuals. *Tissue Antigens* 2015;86;406-12. doi: 10.1111/tan.12684.
18. Korenaga M. [Nishina S](#). Korenaga K. Tomiyama Y. Yoshioka N. [Hara Y](#). Sasaki Y. Shimonaka Y. [Hino K](#). Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice. *Liver Int* 2015;35;1303-14. doi: 10.1111/liv.12675.
19. Kawase T. Yasui Y. [Nishina S](#). [Hara Y](#). Yanatori I. Tomiyama Y. Nakashima Y, Yoshida K. [Kishi F](#), Nakamura M. [Hino K](#). Fibroblast activation protein-alpha-expressing fibroblasts promote the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Gastroenterol* 2015;15;109. doi: 10.1186/s12876-015-0340-0.
20. Iio E. Matsuura K. Nishida N, Maekawa S. Enomoto N. Nakagaw M. Sakamoto, N. Yatsushashi H. Kurosaki M. Izumi N. Hiasa Y. Masaki N. Ide T. [Hino K](#). Tamori A. Honda M. Kaneko S. Mochida S. Nomura H. Nishiguchi S. Okus C. Itoh Y. Yoshiji H. Sakaida I. Yamamoto K. Watanabe H. Hige S. Matsumoto A. Tanaka E. Tokunaga K. Tanaka Y. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet* 2015;134;279-89. doi: 10.1007/s00439-014-1520-7.
21. Abe M, Miyake T, Kuno A. Ima, Y. Sawai

Y. Hino K., Hara Y., Hige S. Sakamoto M.
Yamada G. Kage M. Korenaga M. Hiasa Y.
Mizokami M. Narimatsu H. Association
between *Wisteria floribunda*
agglutinin-positive Mac-2 binding protein
and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty
liver disease. *J Gastroenterol*
2015;50:776-84. doi:
10.1007/s00535-014-1007-2.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Hara Y., Sasaki K, Nishina S., Hino K. Loss
of iron upregulates mitochondria ferritin and
triggers mitophagy. The annual meeting of
American Association for the Study of Liver
Diseases. 2017 Oct Boston. ポスター 国
外
2. Yuichi Hara., Kyo Sasaki, Soji Nishina.
Keisuke Hino Iron chelator suppresses
hepatocarcinogenesis through mitophagy
induction in STAM mice. ポスター、
AASLD Meeting, Boston USA 2016/09/22、
国外
3. Keisuke Hino (invited speaker) Oxidative
stress and NASH, focusing on mitochondrial
quality control. 口頭、The 25th Conferenc
of the Asian Pacific Association for the
Study of the Liver Tokyo 2016/02/23、国内
4. 鉄キレートは C 型肝炎ウイルスによる
mitophagy の抑制を回復させる 口頭
原 裕一、仁科惣治、日野啓輔 第 52
回日本肝臓学会総会 千葉、2016/04/21
国内

〔図書〕(計 1 件)

1. Keisuke Hino. Masaru Harada. Metal
metabolism and liver. The Liver in Systemic
Diseases. Edited By Hiromasa Ohira. 2016
Springer Nature Tokyo Japan

〔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
日野 啓輔 (Hino Keisuke)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：80228741

(2) 研究分担者
仁科 惣治 (Nishina Sohji)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：70550961

原 裕一 (Hara Yuichi)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：60550952

池田 正徳 (Ikeda Masanori)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：30315767

岸 文雄 (Kishi Fumio)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：40153077