

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09362

研究課題名(和文) ゲノム不安定性が解き明かす非アルコール性脂肪性肝炎の発癌ポテンシャル

研究課題名(英文) Detection of DNA damage response in nonalcoholic fatty liver disease via p53-binding protein 1 nuclear expression.

研究代表者

赤澤 祐子 (AKAZAWA, Yuko)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：80582113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の一部は肝硬変、肝癌へ進展するが、その病態については不明な点が多い。p53 binding protein 1(53BP1)は放射線刺激および多段階発癌の過程で、DNA損傷部位に集積し核内focusを形成することからDNA不安定性マーカーとして知られている。我々は53BP1蛍光免疫染色を用いてNAFLDにおける肝細胞の遺伝子損傷応答を検討した。当研究において、肝の線維化が進行している肝組織では53BP1の発現が高くなっており、53BP1と発癌リスクとの関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDにおける肝細胞における53BP1核内フォーカス発現解析は、独特の“ゲノム不安定性”病態マーカーとして確立できる可能性がある。ヒトNAFLD肝における53BP1発現と発癌のリスクの関係が評価できれば、当手法は安価で簡便であるためNASHにおける発癌予測の指標となり、臨床診断学への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common liver diseases worldwide. However, the pathogenesis of hepatocellular carcinoma in NAFLD is largely unexplored. p53-binding protein 1 (53BP1), a DNA damage response molecule, accumulates at DNA double-strand break regions, forms a nuclear focus, and serves as a molecular marker of genomic instability during carcinogenesis in various malignancies. Therefore, the aim of this study was to evaluate the significance of 53BP1 expression in hepatocytes of human NAFLD. In the human liver biopsy tissues, abnormal 53-BP1 nuclear foci in hepatocytes were significantly elevated NAFLD livers, compared to normal controls ($p < 0.01$). Large 53BP1 foci were positively associated with pathological fibrotic score and age of patients, and negatively associated with platelet counts. These results suggest that DNA damage in hepatocytes form large 53BP1 foci in patients with NAFLD, potentially contributing to carcinogenesis.

研究分野：病理学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 NAFLD DNA損傷応答 53BP1 発癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群は世界で増加傾向にあり、非アルコール性脂肪性肝疾患(Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)はその表現型の一つである。NAFLD は肝細胞への脂肪蓄積を特徴とし、炎症を伴うと、肝炎(Nonalcoholic hepatitis; NASH)へと移行する(Fig.1)。NASH における炎症、肝硬変への進展には遊離飽和脂肪酸による肝細胞アポトーシスが寄与しており、主研究者はそのメカニズムを解明してきた(Akazawa et al, J hepatol, 2010/ Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013)。

現在、本邦における肝細胞癌の主たる原因はウイルス性肝炎である。しかし、新規抗ウイルス薬開発及びワクチン接種の徹底により、ウイルス性肝炎の罹患率は今後低下すると考えられる。NASH の一部は肝硬変を背景として肝臓への進展が見られ、将来 NASH を背景とした発癌は、肝細胞癌の主要な原因の一つになることが予想される。さらに、肝硬変に移行していないNASH 発癌も散見され、これらの症例における発癌リスクの予想は特に困難である。よって NASH の病態及び発癌への機序解明と、その予防が必要である。

DNA の二重鎖切断はゲノム不安定性を惹起し、癌細胞への変化を誘導することが示唆されている(Nakashima, et al. Int J Cancer 2008, Naruke et al. Cancer Sci 2008)。DNA 損傷応答蛋白 (p53 binding protein-1) 53BP1 は DNA 二重鎖切断部位に速やかにされ集積する。例えば、細胞への放射線照射は、DNA 二重鎖切断を誘導し、53BP1 蛍光免疫染色で核内フォーカスとして検出される。

一方、前癌病変から浸潤癌における多段階発癌過程では、放射線曝露の有無に関わらず、内因性の DNA 損傷によって 53BP1 核内フォーカスが形成される。53BP1 は遺伝子のいわばレスキュー隊であり、p53 を含む下流の遺伝子修復システムへとシグナルを伝達する。しかし、遺伝子修復が正常に機能しない場合、53BP1 が集積し、核内で過剰発現すると考えられる。実際、我々は、53BP1 の発現パターンとアレイ CGH による遺伝子コピー数異常が相関することを証明した。したがって 53BP1 核内フォーカス発現パターンはゲノム不安定性の指標となることが示唆される(Matsuda et al. Histopathology. 2011;59:441-51, Oikawa et al, Radiat Oncol 6:168, 2011)。

これらの研究に基づき、我々は、遊離飽和脂肪酸による刺激、及び炎症反応の持続により、DNA 二重鎖切断が惹起され遺伝子不安定性が亢進し、発癌に結びつく可能性があると考えに至った。しかし NASH をはじめ、慢性肝疾患における肝細胞 DNA 二重鎖切断の有無、および発癌への関与の可能性については、ほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究を基盤として、53BP1 蛍光染色を中心とした解析により、遊離飽和脂肪酸が肝細胞に caspase-3 依存性の DNA 二重鎖切断を誘導することを証明する。さらに NASH において肝細胞 DNA 二重鎖切断・ゲノム不安定性の亢進が肝臓への進展に関与している可能性を証明することが目的であった。

3. 研究の方法

マウス遊離肝細胞において飽和脂肪酸刺激による 53BP1 の核内フォーカス発現を証明し、その機序(caspase-3 の関与)を検討した。

さらに肝生検組織において NAFLD 患者・および NAFLD 発癌患者の肝細胞 53BP1 核内フォーカス数を検討し、発癌における関与について検討した。

4. 研究成果

正常肝において 53BP1 異常 focus 出現は稀であったが、NAFLD 肝では有意な発現増加が見られた(0.45% vs 21.4%, normal vs NAFLD, $p < 0.01$)。異常 focus は病理学的に繊維化に乏しい NAFLD 症例にも発現していたが、より顕著な DNA 損傷応答を示すとされる large focus は、病理学的線維化スコアと相関していた。さらに large focus は年齢と正の相関関係を示し、血小板数との負の相関が見られた。生検により NAFLD と診断された症例の中で、経過中に肝細胞癌が確認された 5 例のうち、2 例に高い Large focus の発現が見られた。これは、線維化が少ない症例における発がんリスクを、53BP1 が同定できる可能性を示している。

In vitro の検討において、低濃度脂肪酸で刺激された Rat 肝細胞において核内 53BP1 focus 数の増加が見られ、この現象は caspase 阻害剤 ZVAD-FNK および抗酸化剤 N-acetyl-cysteine により有意に阻害された。

以上より、線維化および年齢の高い症例に 53BP1 large focus がより多く発現しており、これらの症例では DNA 損傷応答が惹起されていると考えられる。また、53BP1 focus 形成のメカニズムの一つとして脂肪酸による酸化ストレスおよび caspase による DNA 二重鎖切断が惹起されていることが示唆され

た。53BP1 核内フォーカスの検討により、NAFLD 患者における発がんリスクが同定でき、モニタリングの個別化に貢献できる可能性があると考えられる。

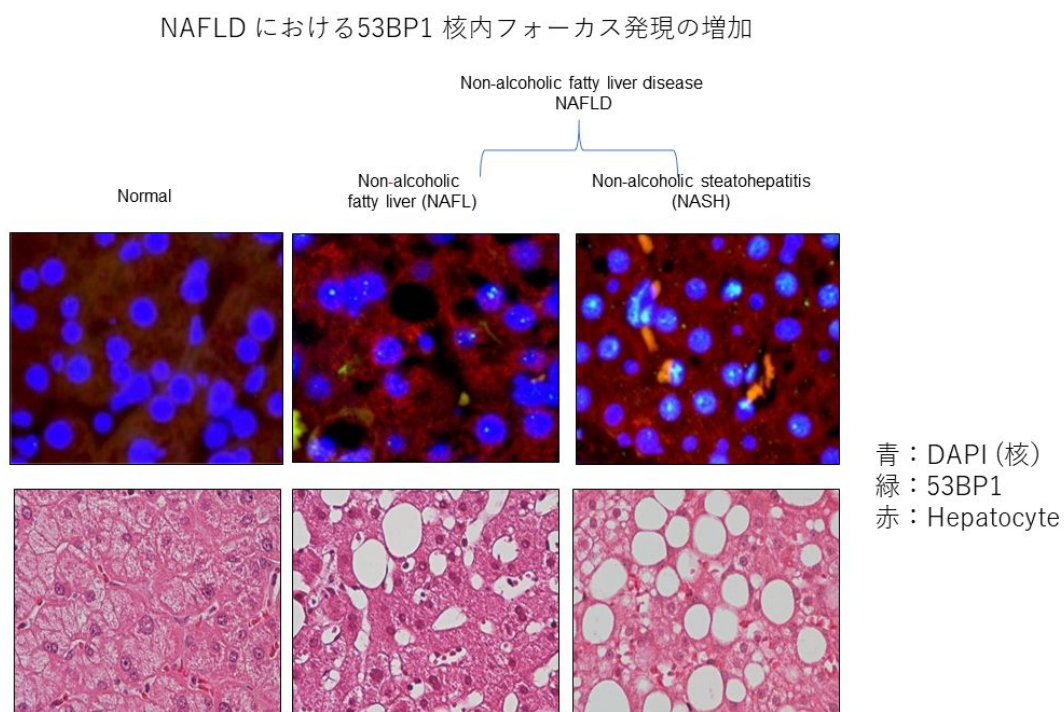


図)NAFLD 患者における 53BP1 核内フォーカスの集積
正常の肝組織と比較して、NAFLD 患者肝細胞においては 53BP1 核内フォーカスの発現の増加が見られてた(Akazawa et al, Modern pathology, 2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Akazawa Y, Nakashima R, Matsuda K, Okamoto K, Hirano R, Kawasaki H, Miura S, Miyaaki H, Malhi H, Abiru S, Itoh M, Kondo H, Fukuoka J, Nakao K, Nakashima M. | 4. 巻 32(7) |
| 2. 論文標題 Detection of DNA damage response in nonalcoholic fatty liver disease via p53-binding protein 1 nuclear expression. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Modern pathology | 6. 最初と最後の頁 997-1007 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41379-019-0218-8. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Matsuda K, Kawasaki T, Akazawa Y, Hasegawa Y, Kondo H, Suzuki K, Iseki M, Nakashima M. | 4. 巻 19;8(1) |
| 2. 論文標題 Expression pattern of p53-binding protein 1 as a new molecular indicator of genomic instability in bladder urothelial carcinoma. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Scientific report | 6. 最初と最後の頁 15477 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-018-33761-9. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Akazawa Y, Nakao K. | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Gastroenterol | 6. 最初と最後の頁 893-906 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00535-018-1451-5. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sasaki R, Taura N, Miyazoe Y, Yamamichi S, Nakashiki S, Yamashita M, Suehiro T, Honda T, Shibata H, Ozawa E, Miura S, Akazawa Y, Miyaaki H, Matsumoto T, Nakao K, Ashizawa K. | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Ketone bodies as a predictor of prognosis of hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nutrition | 6. 最初と最後の頁 97-103 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.nut.2017 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Akazawa Yuko, Nakao Kazuhiko | 4. 巻 53(8) |
| 2. 論文標題 To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 893-906 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1451-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Senoo Takemasa, Sasaki Ryu, Akazawa Yuko, Ichikawa Tatsuki, Miura Satoshi, Miyaaki Hisamitsu, Taura Naota, Nakao Kazuhiko | 4. 巻 18(1) |
| 2. 論文標題 Geranylgeranylacetone attenuates fibrogenic activity and induces apoptosis in cultured human hepatic stellate cells and reduces liver fibrosis in carbon tetrachloride-treated mice | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 BMC Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 34 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-018-0761-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Otsubo Ryota, Mussazhanova Zhanna, Akazawa Yuko, Sato Ayako, Matsuda Katsuya, Matsumoto Megumi, Yano Hiroshi, Matsuse Michiko, Mitsutake Norisato, Ando Takao, Niino Daisuke, Nagayasu Takeshi, Nakashima Masahiro | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Sporadic pediatric papillary thyroid carcinoma harboring the ETV6/NTRK3 fusion oncogene in a 7-year-old Japanese girl: a case report and review of literature | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism | 6. 最初と最後の頁 461-467 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/jpem-2017-0292 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Takaki Hiroko, Akazawa Yuko, Kido Youko, Morishita Mami, Honda Takuya, Shibata Hidetaka, Miura Satoshi, Miyaaki Hisamitsu, Taura Naota, Kondo Hisayoshi, Nakao Kazuhiko | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Hepatitis C Virus Infection Increases c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Phosphorylation and Accentuates Hepatocyte Lipoapoptosis | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Medical Science Monitor | 6. 最初と最後の頁 4526-4532 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12659/MSM.903210 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tahaki H, Akazawa Y, et al | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Hepatitis C virus infection increases JNK phosphorylation and accentuates hepatocyte lipopoptosis | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Med sci monnit | 6. 最初と最後の頁 4526-4532 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Takahara I, Akazawa Y, Tabuchi M, Matsuda K, Miyaaki H, Kido Y, Kanda Y, Taura N, Ohnita K, Takeshima F, Sakai Y, Eguchi S, Nakashima M, Nakao K. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Toyocamycin attenuates free fatty acid-induced hepatic steatosis and apoptosis in cultured hepatocytes and ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Plos one | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) e0170591. doi: 10.1371/journal.pone.0170591. eCollection 2017. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Akazawa Y, Fukuda D, Fukuda Y. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Vonoprazan-based therapy for Helicobacter pylori eradication: experience and clinical evidence. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Therap Adv Gastroenterol. | 6. 最初と最後の頁 845-852 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Wada H, Matsuda K, Akazawa Y, Yamaguchi Y, Miura S, Ueki N, Kinoshita A, Yoshiura K, Kondo H, Ito M, Nagayasu T, Nakashima M. | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Expression of Somatostatin Receptor Type 2A and PTEN in Neuroendocrine Neoplasms Is Associated with Tumor Grade but Not with Site of Origin. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Endocr Pathol | 6. 最初と最後の頁 179-187 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1007/s12022-016-9436-5. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hirano R, Akazawa Y, Matsuda K, Miyaaki H, Fukuoka J, Nakashima M, Nakao K |
| 2. 発表標題 Palmitate Induces DNA Damage Response Dependent on Oxidative Stress and Caspases in Hepatocytes. |
| 3. 学会等名 AASLD (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ryoma Nakashima, Yuko Akazawa, Katsuya Matsuda, Kazuhiko Nakao, Masahiro Nakashima |
| 2. 発表標題 Nuclear expression of p53-binding protein 1, a DNA damage response molecule, is increased in NAFLD liver |
| 3. 学会等名 AASLD (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuko Akazawa |
| 2. 発表標題 Significance of Hepatocyte Lipotoxicity in NAFLD/NASH: How the free fatty acid-mediated Signals Kill and tell |
| 3. 学会等名 The 103rd General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuko Akazawa |
| 2. 発表標題 Mediators of lipid metabolism and hepatocyte apoptosis in NASH: How they execute and communicate |
| 3. 学会等名 APASL single topic (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tabuchi Maiko, Akazawa Yuko et al. |
| 2. 発表標題 Toyocamycin, an inhibitor of IRE1 -XBP1activation, attenuates steatosis and liver injury in high fat high carbohydrate diet-induced steatohepatitis. |
| 3. 学会等名 DDW (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 赤澤祐子、宮明寿光、中尾一彦 |
| 2. 発表標題 NASHは肝細胞核内におけるp53 binding protein-1フォーカス集積を増加させる |
| 3. 学会等名 日本肝臓病学会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 赤澤祐子、宮明寿光、中尾一彦 |
| 2. 発表標題 NAFLD病理組織における肝細胞遺伝子損傷応答の検討. |
| 3. 学会等名 酸化ストレスと肝研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 赤澤祐子、宮明寿光、中尾一彦 |
| 2. 発表標題 53BP1 蛍光免疫染色によるNAFLD 肝細胞遺伝子損傷応答の可視化. |
| 3. 学会等名 日本肝臓学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 赤澤祐子、松田勝也、中尾一彦、中島正洋 |
| 2. 発表標題 H. pylori 胃炎におけるBH3-only 蛋白Bim の役割 . |
| 3. 学会等名 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 中尾 一彦 (NAKAO Kazuhiko) (00264218) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301) | |
| 研究分担者 | 中島 正洋 (NAKASHIMA Masahiro) (50284683) | 長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授 (17301) | |