

令和元年6月20日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09777

研究課題名(和文) CD206陽性マクロファージが肥満に合併する肝腫瘍に与える経時的影響とその機序

研究課題名(英文) the effects of CD206-positive macrophages on obesity-associated liver tumors

研究代表者

薄井 勲 (USUI, ISAO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：50377272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がんは肥満症や糖尿病に高率に合併するが、その機序は十分に解明されていない。本研究計画では、発がん物質DENによるマウス肝がんモデルを用い、肥満や糖尿病によるマクロファージ機能の変化と、肝がん発症の関係について検討した。高脂肪食により肥満・糖尿病を誘導したところ、肝がんの発症が増加した。このとき抗炎症性のCD206陽性マクロファージ数を約40%除去するも、肝がんの発症率に影響を与えなかった。一方、マクロファージ特異的にHIF-1 α を欠損させたところ、肝がんの発症が約50%減少した。またその機序として、肝臓の炎症シグナルおよびERKの活性抑制の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝がんは肥満症や糖尿病に合併しやすいがんの一つである。本研究計画では、腫瘍周囲に浸潤するマクロファージという免疫細胞に注目し検討を行った。肥満糖尿病マウスでは肝がんの発症が促進されるが、マクロファージに発現するHIF-1 α という転写因子を抑制することで、肝がんの発症を抑制しうることを示した。従来CD206をマーカーとするマクロファージががんの増殖に促進的な役割を担うことが知られていた。しかし、単にその数を減らすのではなく、HIF-1 α を抑制することによりがんの抑制が期待できるという新しい予防・治療の概念を提唱したところに本研究の意義がある。

研究成果の概要(英文)：The incidence of cancers increases in obese and/or diabetic patients. In this study, we examined the relationship between altered macrophage polarity and development of liver cancer by using DEN, a chemical carcinogen, -induced mouse liver cancer model. High fat diet-induced obesity increased the number of liver cancer. Ablation of CD206-positive macrophages by about 40% did not affect the incidence of liver cancer. On the other hand, macrophage-specific HIF-1 α deletion decreased the number of liver cancer by about 50%, which was associated with decreased activation of inflammatory signaling and ERK in liver.

研究分野：糖尿病学

キーワード：肝がん 肥満 糖尿病 マクロファージ HIF-1 α マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは肥満症や糖尿病に高率に合併するが、その機序は十分に解明されていない。がんの局所に存在し、腫瘍の発症や増殖に影響を与えるマクロファージを‘腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM)’と呼ぶ。これまで研究代表者は、肥満や糖尿病によるマクロファージ機能の変化(異常)が、がんの発症や増殖促進に関与するのではないかと考え検討を進めてきた。化学発がん物質 diethylnitrosamine (DEN)を投与し肝がんを発症させたマウスでは、高脂肪食肥満によって腫瘍数が増え、マクロファージ特異的な HIF-1 α の欠損により減少する。また HIF-1 α を欠損した肝臓のマクロファージでは炎症性 M1 マーカーと同時に抗炎症性 M2 マーカーが同時に低下していることをこれまでに報告してきた。これらの結果から、(1)高脂肪食負荷による肝臓の栄養環境の変化が HIF-1 α 依存性にマクロファージを活性化し、腫瘍の発症に促進的な機能を与えるのではないか、(2)HIF-1 α 依存性に発現誘導される M1 マーカーは、腫瘍促進性の機能を有しているのではないか、(3)腫瘍の増殖に関与するとされていた CD206 陽性 M2 マクロファージは腫瘍の発症にも関与しているのではないか、等の仮説を立てた。

2. 研究の目的

これらの仮説を証明するために、本研究計画では次の2つの課題を設けた。

課題1 . CD206 陽性マクロファージは肥満マウスの肝がんの発症を促進するのか。

M2 マクロファージが肝がん発症に与える影響と機序を解明するためには、発がん誘導後に CD206 陽性 M2 マクロファージを減らし、その影響を見ることが有用である。我々が独自に作製した **CD206-DTR マウス**は、ジフテリアトキシンの投与により生後必要な時期に CD206 陽性マクロファージ数を減らすことができる。このマウスに DEN と高脂肪食負荷を行い、腫瘍の**発症**および増殖における CD206 陽性マクロファージの役割を明らかにすることを課題1の目的とした。

課題2 . マクロファージの HIF-1 α はどのように肥満マウスの肝がんの発症を促進するのか。

マクロファージ特異的な HIF-1 α の欠損は高脂肪食負荷時にのみ腫瘍数を減少させた。そのため、高脂肪食処置による肝臓の代謝の変化がマクロファージの HIF-1 α を活性化し、腫瘍の発症に促進的な機能を与えた可能性がある。マクロファージの HIF-1 α 活性化の機序として、マクロファージ自身の代謝の変化および、HIF-1 α 活性化の結果マクロファージで産生されるがん発症促進因子について明らかにすることを、課題2の目的とした。

3. 研究の方法

課題1 . CD206-DTR マウスと野生型マウスに DEN を投与し、肝がんを発症させる。それぞれ高脂肪食と通常食にて飼育し、計4群を設定する。がんの発症過程の異なる時期にジフテリアトキシンを投与し、CD206 陽性マクロファージ数の減少が腫瘍の発症や増殖に与える影響について調べる。

課題2 . マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損マウスと野生型マウスに DEN を投与し、肝がんを発症させる。それぞれ高脂肪食と通常食にて飼育し、計4群を設定する。肝がんの発症および、肝臓マクロファージの遺伝子発現と代謝の違い、非腫瘍部の増殖シグナルについて調べる。

4. 研究成果

課題1 .

CD206-DTR マウスおよび野生型マウスに DEN を投与後、高脂肪食および通常食にて飼育。DEN 投与の6か月後に解剖し、肝臓の解析を行った。平成28年度にはまず、我々が独自に作製した

CD206-DTR マウスへのジフテリアトキシン (DTX) の投与条件の検討から始めた。脂肪組織で確認した我々の予備実験にならって、解剖の直前 2 か月間に週 3 回 DTX を投与した。同条件で行った DTX 投与は、肝臓より採取した CD206 マクロファージ数を野生型コントロールの約 40%まで低下させた。しかし、この条件で肝腫瘍の数およびサイズに有意な変化はなかった。CD206 陽性マクロファージの除去効率は脂肪組織の解析から予想したものにほぼ近い値であったが、肝腫瘍への明らかな変化が見られなかった理由として、(1)CD206 陽性マクロファージの除去条件 (特に、除去すべき時期など) が適切でなかった、(2)我々の仮説に反して、CD206 陽性マクロファージが肝腫瘍の発症や増殖に関与していない、のふたつの可能性を考えた。平成 29 年度にはより早期から長期間 (解析 4 か月前から週 3 回) DTX の投与を行った。この投与方法においても、肝臓におけるマクロファージの数は野生型群の 40%程度まで低下した。しかし肝腫瘍の数とサイズには有意な変化はなかった。

本研究で用いた CD206 除去マウスは、DTX の投与期間中全身の CD206 陽性細胞を除去 (死滅) させることができる。DTX の投与量や投与回数を増やすと除去効率は上がるが、副作用としてマウスの死亡率が高まる。そのため、今回用いたコントロールの 40%程度までの除去効率をさらに上げることはできず、CD206 陽性マクロファージ数の減少が DEN 誘導性肝腫瘍の発症および増殖に与える影響を本研究計画において示すことができなかった。しかし、別の実験モデルで CD206 陽性 M2 マクロファージの除去効率を上げることができるならば、肝腫瘍の発症・増殖に影響をあたえる可能性があることを否定するものではなく、本モデルマウスを用いての解析の限界と考えた。以上の結果より、「40%までの CD206 陽性マクロファージ数の減少では DEN 誘導性肝腫瘍の発症と増殖に影響を与えない」ことを、課題 1 の結論とした。

課題 2 .

マクロファージ特異的な HIF-1 α 欠損マウスに DEN を投与後、普通食および高脂肪食にて飼育し、肝がんを発症させた。それまでの実験で、マクロファージ特異的な HIF-1 α の欠損は高脂肪食負荷時にのみ腫瘍数を減少させるとの結果を得ていた。本研究課題では HIF-1 α の欠損が腫瘍数を減らした機序について検討をすすめた。まず、肝臓から組織を採取し、組織学的検索および RT-PCR による遺伝子発現を調べた。マクロファージ特異的な HIF-1 α の欠損は、肝腫瘍内外に浸潤するマクロファージ数と炎症性サイトカインなど炎症マーカーを低下させた。また、肝臓の非腫瘍部の ERK のリン酸化を低下させた。これらの結果より、肥満マウスの肝臓におけるマクロファージ HIF-1 α の活性化は、肝臓の炎症シグナルと肝細胞の ERK の活性化を伴いがん発症に促進的な役割を担っている可能性が考えられた。

次に、マクロファージ HIF-1 α の活性化と ERK リン酸化の機序についてさらに検討を進めた。培養肝細胞 (HepG2 細胞) において増殖因子 EGF は ERK のリン酸化を促進した。しかし、HIF-1 α 欠損マウスの肝臓で ERK が抑制されるとき、肝臓より単離したマクロファージにおける EGF を含む増殖因子の発現に差が認められなかった。また、単離マクロファージのメタボローム解析でも、HIF-1 α の活性化作用が知られる succinate などの代謝産物の量に差がなかった。

以上結果から、高脂肪食肥満・糖尿病マウスでは、マクロファージの HIF-1 α が活性化され、肝臓の炎症反応および肝細胞 ERK の活性化を介して、肝腫瘍の発症を促すことを明らかにした。また、マクロファージの代謝産物の変化は、HIF-1 α の活性化には直接に関与しない可能性が考えられた。課題 2 に関するこれらの結果一部は、Journal of Diabetes Investigation 誌に論文報告した (doi: 10.1111/jdi.13047)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Takikawa A, Usui I, Fujisaka S, Tsuneyama K, Okabe K, Nakagawa T, Nawaz A, Kado T, Jojima T, Aso Y, Hayakawa Y, Yagi K, Tobe K. Macrophage-specific hypoxia-inducible factor-1 deletion suppresses the development of liver tumors in high-fat diet-fed obese and diabetic mice. *J Diabetes Investig*. 2019. doi: 10.1111/jdi.13047 査読有

Igarashi Y, Nawaz A, Kado T, Bilal M, Kuwano T, Yamamoto S, Sasahara M, Jiuxiang X, Inujima A, Koizumi K, Imura J, Shibahara N, Usui I, Fujisaka S, Tobe K. Partial depletion of CD206-positive M2-like macrophages induces proliferation of beige progenitors and enhances browning after cold stimulation. *Sci Rep*. 2018; 8(1):14567. doi: 10. 1038 /s41598-018-32803-6 査読有

Okabe K, Usui I, Yaku K, Hirabayashi Y, Tobe K, Nakagawa T. Deletion of PHGDH in adipocytes improves glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Sep 26;504(1):309-314. 査読有

Gulshan M, Yaku K, Okabe K, Mahmood A, Sasaki T, Yamamoto M, Hikosaka K, Usui I, Kitamura T, Tobe K, Nakagawa T. Overexpression of Nmnat3 efficiently increases NAD and NGD levels and ameliorates age-associated insulin resistance. *Aging Cell*. 2018 Jun 14: e12798. 査読有

Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K: CD206⁺ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nat. Commun*. 8(1):286, 2017 査読有

Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo BN, Kita S, O'Donnell E, Osawa T, Takahashi H, Takano KI, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, Sasahara M: A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. *Sci Rep* 7(1):3855, 2017 査読有

Takikawa A., Mahmood A., Nawaz A., Kado T., Okabe K., Yamamoto S., Aminuddin A., Senda S., Tsuneyama K., Ikutani M., Watanabe Y., Igarashi Y., Nagai Y., Takatsu K., Koizumi K., Imura J., Goda N., Sasahara M., Matsumoto M., Saeki K., Nakagawa T., Fujisaka S., Usui I., Tobe K.: HIF-1 in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. *Diabetes* 65(12): 3649-3659, 2016 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Fujisaka S, Usui I, Nawaz A, Igarashi Y, Kado T, Okabe K, Yagi K, Nakagawa T, Tobe K. Bofutsushosan improved gut barrier function with a bloom of Akkermansia

muciniphila and improves glucose metabolism in diet-induced obese mice. 78th Scientific Sessions of American Diabetes Association; 2018 Jun 22-26; FL.

瀧川章子, **薄井 勲**, 張 群, 岡部圭介, 角 朝信, Allah Nawaz, 藤坂志帆, 中川 崇, 常山幸一, 戸邊一之. 肥満症・糖尿病に伴う肝がん発症におけるマクロファージ HIF-1 の働き. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2017 May 18-20; 名古屋.

Okabe K., **Usui I.**, Tobe K., Nakagawa T.: Namp1-mediated NAD synthesis regulates the metabolic remodeling during the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. 76th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, New Orleans, 2016

Takikawa A., **Usui I.**, Zhang Q., Okabe K., Kado T., Nawaz A., Fujisaka S., Nakagawa T., Tsuneyama K., Tobe K.: Myeloid cell-specific HIF-1 deletion decreases the number of liver tumors in high fat-fed mice. 76th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, New Orleans, 2016

〔図書〕(計 4 件)

薄井 勲, 戸邊一之: 肥満症における脂肪組織マクロファージの HIF-1 α の重要性. 内分泌・糖尿病・代謝内科 44(6): 449-454, 2017

薄井 勲, 戸邊一之. 脂肪組織の炎症. 実験医学; 35(2): 85-91, 2017

Fujisaka S, **Usui I.**, Nawaz A, Takikawa A, Kado T, Igarashi Y, Tobe K. M2 macrophages in metabolism. Diabetes Int.; 7: 342-51. 2016

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. 7; 257(6): 601-4, 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 早川 芳弘

ローマ字氏名: HAYAKAWA, yoshihiro

所属研究機関名: 富山大学

部局名: 和漢医薬学総合研究所

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10541956

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 中川 崇

ローマ字氏名: NAKAGAWA, takashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。