

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250028

研究課題名(和文) 肥満による発癌促進機構の解明とその予防法開発への応用

研究課題名(英文) Study of obesity-associated carcinogenesis and its application to cancer prevention

研究代表者

原 英二 (Hara, Eiji)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80263268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでマウスにおいては肥満に伴い増加する腸内細菌が作る代謝産物の一つである二次胆汁酸が肝星細胞に細胞老化とそれに伴うサイトカインの分泌現象(SASP)を引き起こすことで肝がんの発症を促進していることを法臆してきたが、その詳細なメカニズムは不明であった。今回我々は主に以下のことを明らかにした。(1) 肥満するとコレステロールの摂取量が増え、一次胆汁酸の量が増加する。多くの腸内細菌は一次胆汁酸に抵抗性を持たないため、高濃度の一次胆汁酸の存在下では増殖出来ず、結果的に二次胆汁酸産生菌等一次胆汁酸に耐性を有する菌が選択的に増える。(2) 二次胆汁酸はリポタイコ酸と協調することでSASPを誘導する。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that increased level of DCA, a secondary bile acid, contributes to liver cancer development in obese mice. However, the precise mechanisms underlying this phenomenon remain unclear. In this study, following findings are obtained: (1) obesity increases the levels of cholesterol and thereby causing production of bile acid. Because high level of bile acid is toxic for many gut bacteria, gut bacteria which are resistant to bile acid, such as secondary bile acid producing bacteria, are preferentially increased in obese mice, resulting in alteration of gut bacterial community in obese mice. (2) Although DCA on its own can provoke senescence-associated secretory phenotype (SASP) in hepatic stellate cells (HSCs) in lean mice, it takes a much longer time as compared to those in obese mice. Here, we show that DCA cooperates with Lipoteichoic acid (LTA), to provoke the onset of SASP in HSCs through toll-like receptor 2 signaling pathway in obese mice.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：細胞老化 肥満 腸内細菌 発がん

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は様々な種類のがんの発症率を高めることも知られており、近年先進国で見られるがんの発症率増加の一因になっている可能性が指摘されている。しかし、「肥満するとなぜがんの発症率が上昇するのか？」についてはこれまであまり解析が進んでこなかった。

我々は最近、マウスを用いた実験により、肥満すると、脂肪の消化吸収を助ける1次胆汁酸を deoxycholic acid (2次胆汁酸)に変換する腸内細菌が爆発的に増え、その結果、体内に増加した2次胆汁酸が肝星細胞に細胞老化に伴う分泌現象である SASP を起こさせることで周囲に存在する肝実質細胞のがん化を促進することを見出した (Yoshimoto *et al.*, *Nature* 2013)。しかし、(1) 肥満するとなぜ腸内細菌叢が変化するのか？(2) 2次胆汁酸がどのようにして SASP を誘導するのか？(3) SASP がどのようにして発がんを促進するのか？については依然として不明なままであった。そこで、肥満に伴う発癌促進機構を解明し、効果的な発がん予防法の開発を実現するためにはこれらの謎を明らかにすることが重要であると考えに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) 肥満に伴い、二次胆汁酸産生菌が増加するメカニズムを明らかにし、(2) 2次胆汁酸がどのようにして肝星細胞に SASP を誘導するのか？(3) SASP がどのようにして発がんを促進するのか？について明らかにすることにより、肥満が引き起こす発がんの仕組みを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 肥満により増殖する2次胆汁酸産生菌のゲノム配列を解読し、類縁菌の配列と比較することで肥満により爆発的に増殖する

メカニズムを解き明かす。

(2) 肝星細胞の初代培養細胞を用い、次世代シーケンサーやプロテオーム解析、RNAi ライブラリー等を駆使した多方面からの解析を行うことで、2次胆汁酸による SASP 誘導機構を明らかにする。

(3) 肝臓のオルガノイド培養法と CRISPR-Cas9 によるゲノム編集システムを組み合わせることで、SASP による肝癌促進機構の詳細を明らかにする。

(4) 上記の研究により明らかにした分子機構を標的とした阻害剤を探索することで肥満による発癌の効果的な予防法開発につなげる。

### 4. 研究成果

(1) 肥満に伴い、2次胆汁酸産生菌が増加するメカニズムについて解析を行った結果、以下のことが明らかになった。まず、肥満するとコレステロールの摂取量が増えるため、一次胆汁酸の量が増加する。十二指腸に分泌された一次胆汁酸はその殆どが小腸で再吸収される(腸肝循環)が、一部は大腸へ移行するため、大腸の一次胆汁酸濃度が高くなる。多くの腸内細菌は一次胆汁酸に抵抗性を持たないため、高濃度の一次胆汁酸の存在下では増殖出来ず、結果的に二次胆汁酸産生菌など一次胆汁酸に耐性を有する菌が選択的に増えた可能性が高いことがマウス及び腸内細菌の培養液を用いた実験により明らかになった。

(2) 我々は既にマウスにおいて肥満に伴い Clostridium クラスター XI に属する未同定の腸内細菌の増加が肝がんの発症に関与している可能性が高いことを見出していた。そこで、この Clostridium クラスター

XI に属する未同定の腸内細菌の同定を試みた。ゲノム配列を解読した結果、この腸内細菌のゲノム上には当初期待していた二次胆汁酸産生酵素をコードする遺伝子は存在していなかった。しかし、二次胆汁酸を含む胆汁酸を脱抱合化し、より毒性の高い胆汁酸へと変換する作用のある酵素（脱抱合化酵素）をコードしていることを見出した。このため、肥満に伴い二次胆汁酸産生菌が増加すると同時に、二次胆汁酸を脱抱合化する菌も増加することで、より毒性の高い二次胆汁酸が産生され、このために肝がんの発症率が上昇した可能性が高いことを見出した。また、我々は肥満によって増加する未知の菌の中から二次胆汁酸産生酵素をコードする遺伝子を有する菌の特定及び単離培養にも成功した。

(3) 二次胆汁酸が SASP を誘導する作用機序の解明を試みた結果、次のことを明らかにした。培養細胞を用いた実験により、高濃度の二次胆汁酸はそれ自身が肝星細胞に DNA 損傷を引き起こし、細胞老化とそれに伴うサイトカインの分泌現象 (SASP) を起こすが、肥満によって腸管に増加するグラム陽性菌の構成因子であるリポタイコ酸と協調することで、DNA 損傷の程度を更に増加させ、細胞老化及び SASP を起こしやすくしていることを明らかにした。

(4) SASP がどのようにして発がんを促進するのかについて解析した結果、IL-1 によって誘導される複数のサイトカインが H-ras 及び p53 遺伝子に異常を持った肝実質細胞に作用することで肝がんの進展を促進していることを見出した。一方、遺伝子異常のない肝実質細胞に同じ SASP 因子を作用させても肝がんの進展が促進されないことから、SASP 因子は標的細胞の状況に応じて作用が異なり、がん遺伝子やがん抑

制遺伝子が異常を起こしている細胞においてのみ発がん（がんの進展）を促進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 10 件)

1. Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M.T., Obuse, C. & Hara, E.

Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells.

**Nature Communications** (2017) in press

2. Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N. & Hara, E.

The impact of SASP and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases.

**Cancer Science** (2017) in press

doi: 10.1111/cas.13184.

3. Loo, T.M., Kamachi, F., Watanabe, Y., Yoshimoto, S., Kanda, H., Arai, Y., Nakajima-Takagi, Y., Iwama, A., Koga, T., Sugimoto, Y., Ozawa, T., Nakamura, M., Kumagai, M., Watashi, K., Taketo, M.M., Aoki, T., Narumiya, S., Oshima, M., Arita, M., Hara, E. & Ohtani, N.

Gut Microbiota Promotes Obesity-Associated Liver Cancer through PGE2-Mediated Suppression of Antitumor Immunity.

**Cancer Discovery** (2017) in press

doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0932

4. Takeuchi, S., Fukuda, K., Arai, S., Nanjo, S., Yamada, T., Hara, E., Nishihara, H., Uehara, H. & Yano, S.

Organ-specific efficacy of HSP90 inhibitor in multiple-organ metastasis model of chemorefractory small cell lung cancer.

**Int. J. Cancer.** 138, 1281-1289. (2016)

doi: 10.1002/ijc.29858.

5. Sato, S., Kawamata, Y., Takahashi, A., Imai, Y., Hanyu, A., Okuma, A., Takasugi, M., Yamakoshi, K., Sorimachi, H., Kanda, H., Ishikawa, Y., Sone, S., Nishioka, Y.,

- Ohtani, N. & Hara, E.  
Ablation of the p16<sup>INK4a</sup> tumour suppressor reverses ageing phenotypes of *klotho* mice.  
**Nature Communications** 6, 7035 (2015)  
doi: 10.1038/ncomms8035
6. Nanjo, S., Nakagawa, T., Takeuchi, S., Kita, K., Fukuda, K., Nakada, M., Uehara, H., Nishihara, H., Hara, E., Uramoto, H., Tanaka, F., & Yano, S.  
*In vivo* imaging models of bone and brain metastases and pleural carcinomatosis with a novel human EML4-ALK lung cancer cell line.  
**Cancer Science** 106, 244-252. (2015)  
doi: 10.1111/cas.13184.
7. Yamakoshi, K., Katano, S., Iida, M., Kimura, H., Okuma, A., Ikemoto-Uezumi, M., Ohtani, N., Hara, E. & Maruyama, M.  
Dysregulation of the Bmi-1/p16<sup>INK4a</sup> pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function.  
**Aging Cell** doi: 10.1111/ace1.12337.(2015)
8. Brookes, S., Gargic, S., Sanij, E., Rowe, J., Gregory, F.J., Hara, E. & Peters, G.  
Evidence for a CDK4-dependent checkpoint in a conditional model of cellular senescence.  
**Cell Cycle** 14, 1164-1173. (2015)  
doi: 10.1080/15384101.2015.1010866.
9. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., Hoeijmakers, J.H.J., de Bruin, A., Hara, E. & Campisi, J.  
An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA.  
**Developmental Cell** 31, 722-733. (2014)  
doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012.
10. Johmura, Y., Shimada, M., Misaka, T., Naiki-Ito, A., Miyoshi, H., Motoyama, N., Ohtani, N., Hara, E., Nakamura, M., Takahashi, S. & Nakanishi, M.  
Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction.

**Molecular Cell** 55: 73-84. (2014)  
doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.003.

〔学会発表〕(計 4件)

1. 腸内細菌による発がん制御, 口頭, 原 英二, 日本臨床栄養学会シンポジウム, 2016/10/9, 国内
2. Obesity and cancer :a gut microbial connection, 口頭, 原 英二, 日本癌学会シンポジウム, 2016/10/8, 国内
3. Cellular senescence and liver cancer :a gut microbial connection, 口頭, 原 英二, FASEB Conference (Liver Biology), 2016/10/9, 国外
4. Obesity, the gut microbiome and liver cancer, 口頭, 原 英二, EASL The International Liver Congress, 2016/4/14, 国外

〔図書〕(計 0件)

〔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 2件)

名称：腸内細菌叢を改善し、発がんのリスクを軽減することのできる食品成分及び食品組成物のスクリーニング方法  
発明者：原 英二、大谷直子、吉本真、羅智文  
権利者：公益財団法人がん研究会  
種類：特許  
番号：5951101  
取得年月日：2016年6月17日  
国内外の別：国内

名称：がん及び/又は発がんリスクの検査方法、及び医薬のスクリーニング方法  
発明者：原 英二、大谷直子、吉本真、羅智文  
権利者：公益財団法人がん研究会  
種類：特許  
番号：5829353  
取得年月日：2015年10月30日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/molmicro/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原 英二 (Hara Eiji)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80263268