

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461908

研究課題名(和文) がんの発症や進展へ影響を及ぼす炎症性分子インフラマソームの検討

研究課題名(英文) Discovery of inflammasome components in background liver of HCC associated with prognosis

研究代表者

杉本 博行 (SUGIMOTO, Hiroyuki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20437007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌(HCC)の発生には背景肝の炎症が強く関係する。炎症にはインフラマソームと呼ばれる分子複合体が関与しており、その構成分子であるNLRP3、NLRC4およびAIM2の遺伝子発現は背景肝でHCCおよび肝炎のない肝組織より有意に高かった。また、NLRP3、NLRC4およびCASP1の各高値群は低値群より全生存期間が有意に不良であった。多変量解析で全生存期間の独立したリスク因子の一つとして背景肝のNLRP3発現中央値以上が抽出された。

本研究結果からインフラマソーム構成分子はHCC早期発見マーカーおよび予後予測マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inflammasomes are multiprotein complexes that evoke key inflammatory cascades. The present study evaluated the influence of inflammasome component expression in non-tumorous tissue on postsurgical hepatocellular carcinoma (HCC) prognosis. The expression of nod-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3), nod-like receptor family, CARD domain containing 4 (NLRC4), and absent in melanoma 2 (AIM2) was significantly higher in corresponding normal tissue (CN) compared with those in HCC. High expression of NLRP3, NLRC4, and caspase 1 (CASP1) in CN was significantly correlated with worse overall survival. Furthermore, multivariate analysis revealed that NLRP3 expression in CN greater than the median was an independent prognostic factor for poorer overall survival.

High expression of NLRP3, NLRC4, and CASP1 in background non-tumorous liver is significantly correlated with poor prognosis of patients after resection of HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：インフラマソーム 癌 進展 発がん

1. 研究開始当初の背景

- (1) 経験的に、癌と炎症との間には、関連があることが知られてきた。慢性炎症が及ぼす癌発生の例として、各種肝炎と肝細胞癌 (HCC)、ピロリ菌感染と胃癌などが挙げられる。これまでは、主に疫学調査や病理学的側面から着目されることが多かったが、最近になって分子レベルにおける炎症の発癌に対する関与の解明が進められている。炎症には腫瘍化を促す「向腫瘍作用」とそれとは逆の「抗腫瘍作用」の双方があるとされる。炎症反応を起こした組織では免疫細胞の浸潤・線維芽細胞の増殖・血管新生などが顕著に認められるが、これと同様の状態が癌組織中でも生じている。この炎症に類似した「癌の微小環境」は向腫瘍作用に傾いていることが多いとされる。我々外科医は、術後の長期間の合併症による全身性の持続的炎症状態が、癌の再発や進展を促進し予後を不良にすることを経験してきた。しかしながら、癌に関連した抗炎症療法についてはいまだ確立したものは存在しない。
- (2) 近年、様々な炎症状態がインフラマソームと呼ばれる細胞内の分子複合体を介していることが報告されている。インフラマソームは様々な炎症刺激で形成され、この活性化により IL1-B の成熟化を司るカスペーゼ 1 が活性化し、炎症反応が惹起される。インフラマソーム構成分子は NOD, NLRC, NLRP family など 30 種以上が存在する。中でも NLRP3 の活性化が全身性の炎症惹起や癌の増進に有利に働くことが報告されている。2013 年の Nature Medicine に掲載された報告で、抗腫瘍薬 5-FU の投与がむしる腫瘍の増進に働くことがあり、そのシグナルの起点に NLRP3 の活性化を認めたと発表された。また、NLRP3 の機能獲得型遺伝子変異が特発性関節炎や心膜炎の原因であることも報告されており、様々な疾患との関与が明らかにされつつある。しかし、いまだ癌におけるインフラマソームの発現や変異型に関する報告はない。
- (3) 他施設から HCC 症例術後における抗腫瘍薬 5-FU の投与 (UFT 内服) がむしる HCC 再発や再発腫瘍の血管浸潤を促進し、予後を悪化させる可能性があるという内容が報告されている。この現象についても上記 (2) の報告と同様に、インフラマソーム構成分子である NLRP3 活性化が関与している可能性がある。我々のグループはこれまでに、HCC や胃癌において非癌部と癌部を比較するマルチアレイ法 (発現, メチル化, SNP アレイ等) を行い新規の癌関連遺伝子を抽出する試みを行ってきた。また、HCC 初回手術後の肝内再発は多中心発生が 7 割を占めており、肝内転移よりも多いと考えられている。このため、HCC には癌部だけ

でなく、背景肝の非癌部にも発癌や進展・再発に影響する何らかの原因があると考え、全くの正常肝と HCC 背景肝を比較したマルチアレイ (現状では発現, メチル化アレイ) を行った。この結果によると、正常肝と HCC 背景肝の比較で、HCC 背景肝における NLRP3 発現の上昇を認めた。これらの報告・結果より、HCC 発生母地となる背景肝でウイルス性や脂肪性肝炎等の慢性炎症状態に関連したインフラマソーム分子の発現が HCC の発生・進展にも影響しているという仮説を立てた。また、術後早期における全身性の炎症状態が癌の進展に増進的に働くことをインフラマソームの観点で説明するため、HCC・大腸がん手術症例の術前・術後 3 日目における血液中 NLRP3 の発現を測定したところ、術前と比べ術後で発現が上昇していた。この結果からも、周術期の全身状態や術後の合併症により惹起されたインフラマソームの活性化シグナルが癌の再発や予後に影響を与えている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

- (1) HCC は全世界における癌死で 2 番目に多く (2012 年)、肝炎ウイルス、アルコールおよび脂肪性肝炎が HCC 発生に強く関わっている。根治切除が最も有効な治療の一つであるが、再発率は高く、再発を抑制する有効な治療とともに、再発・生存のリスク因子の詳細な解明やそれらを予測する有用なバイオマーカーが切望されている。
- (2) これまでに当教室では手術で切除された臨床検体を用い、HCC 腫瘍部だけでなく、非腫瘍部における遺伝子の発現変化を調査し、予後との関連などを示してきた。HCC の発生・進展には周囲肝組織の炎症が重要であるという観点から HCC 腫瘍部, HCC 背景肝、および肝炎のない肝組織の遺伝子発現状況を比較し、HCC 予後予測に有用なインフラマソーム構成分子を見出すことが本研究の主目的である。

3. 研究の方法

- (1) 候補となるインフラマソーム構成分子の抽出: HCV 肝炎から生じた典型的 HCC の腫瘍部および非腫瘍部 (corresponding normal: CN) と 11 例の肝炎のない転移性肝癌の背景肝 (super normal: SN) の RNA を用いた発現アレイで各遺伝子の発現状況を比較した。
- (2) 臨床検体: 1998 年から 2011 年の間に名古屋大学医学部附属病院第二外科で根治切除された 158 例の HCC 腫瘍部、非腫瘍部を対象とした。患者の観察期間中央値は 48.5 か月 (範囲、0.3 から 193.8 か月) であった。また HBV 41 例、HCV 92 例、非 B/C

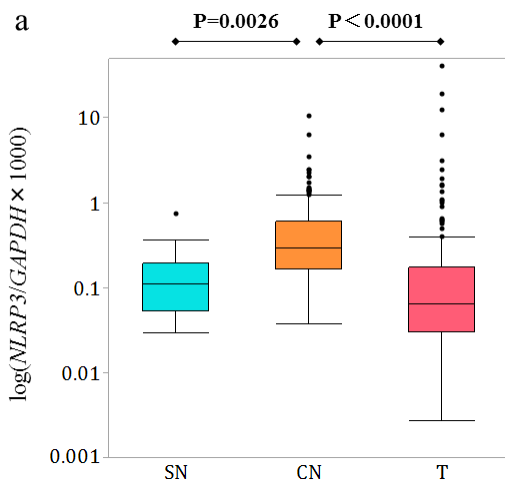
が 28 例であった。すべての患者に文書と口頭による説明を行い、臨床検体を用いた研究に対する同意を得た。

- (3) RT-PCR 法：158 例の各サンプルから抽出された RNA を用いて逆転写反応を行い、相補的 DNA を合成した。これを鋳型とし、各サンプルにおける発現を測定するために定量 RT-PCR 法を用いて発現状況を調査した。
- (4) 各インフラマソーム構成分子の HCC, CN における発現状況と各臨床病理学的因子および予後(全生存期間・無再発生存期間)との関連を統計的に解析した。

4. 研究成果

- (1) HCC 腫瘍部, CN, および SN における遺伝子発現を比較したマイクロアレイの結果を参照し、6 つの主要なインフラマソーム構成分子 (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, PYCARD, および CASP1) について少数例(HCC 腫瘍部・非腫瘍部 24 組)での測定を行った。この結果 NLRP3, NLRC4, AIM2 および CASP1 が候補として抽出された。
- (2) 158 例の臨床検体を用いて RT-PCR 法による発現解析を行った。NLRP3, NLRC4 および AIM2 は CN で HCC および SN よりも有意に発現が高かった (Fig. 1)。CASP1 の発現は CN で HCC よりも有意に高値であったが、CN と SN 間に有意差は認めなかった。

Fig. 1 NLRP3 の各組織における発現

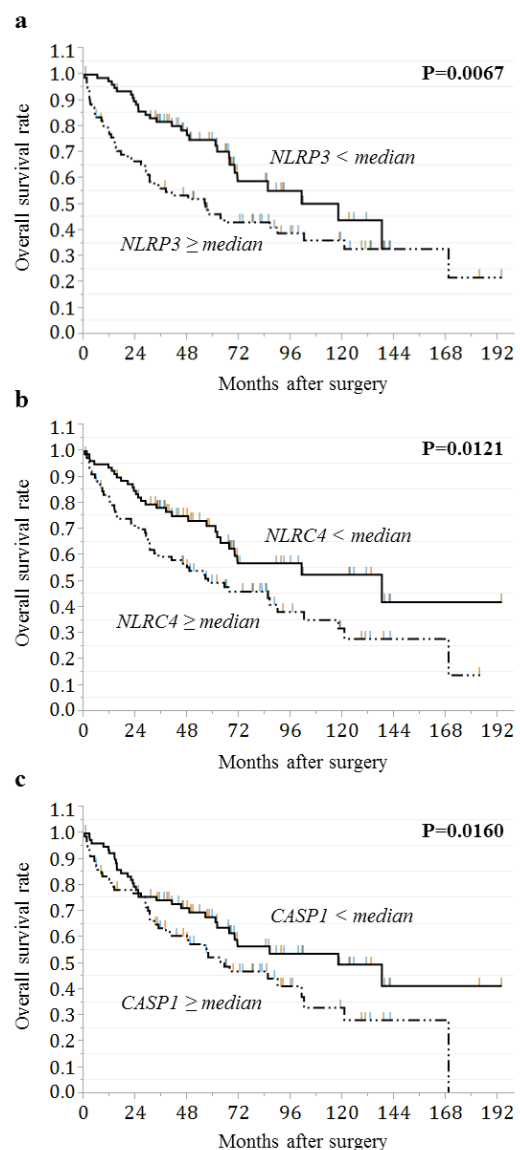


- (3) CN における各インフラマソーム遺伝子の発現 (中央値以上・未満) と各臨床病理学的因子との関係を調べると、NLRP3 発現高・低の割合はプロトンピン時間で有意に異なった。また、NLRC4 については腫瘍径 2cm 以上・未満と発育形式 (膨張性・浸潤性) で有意に異なる割合を示した。CASP1 の高低は HCV・非 HCV の割合において有意

に異なっていた。

- (4) 158 例を NLRP3, NLRC4 および CASP1 の中央値以上・未満に従って二群に分けたとき、各遺伝子高値の群は低値群よりも有意に全生存期間が不良であった (Fig. 2)。しかし、AIM2 に関してこの傾向は認められなかった。無再発生存率についてはいずれの分子についても予後との関連を認めなかった。COX 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では全生存期間に関わる独立したリスク因子として血清 α -フェトプロテイン値、漿膜浸潤有無、血管浸潤有無とともに、CN における NLRP3 発現中央値以上が抽出された。

Fig. 2 インフラマソーム各分子と予後



- (5) 本研究によりインフラマソーム構成分子である NLRP3, NLRC4, および AIM2 は CN で HCC 腫瘍部や SN よりも高値で発現しており、HCC 自体よりも周囲の肝組織におい

てインフラマソームに関連した炎症の影響が強いことが示唆された。さらに、HCC 腫瘍そのものではなく、これらの CN における発現高値が予後に関わるという点は我々の仮説を支持する結果であった。また、背景肝因子であるプロトンピン時間やウイルスタイプだけでなく、HCC の腫瘍因子である腫瘍径や発育形式との関連を示唆する解析結果は、詳細な分子生物学的機序は明らかではないものの、非常に興味深い結果であった。

(6) 我々の知る限り HCC 背景肝におけるインフラマソーム構成分子の発現と予後との関連を示した報告はこれまでにない。非肝炎の肝組織と比較して HCC 背景肝でこれらの分子が高いことは、今後これらが HCC の早期発見マーカーになりうることを示している。また、背景肝の CN 発現状況を知ることで個々の患者の予後予測が可能となり、治療後のフォローアップ・追加治療に対する個別化医療へと結びつく可能性がある。本研究の現時点における課題として、本調査に用いた症例群とは別の独立した症例群での検証や、さらに有用なバイオマーカーとしての可能性を探索するために、採取がより容易な血液検体などでの検討も今後必要であると考えられた。

<引用文献>

Alnemri ES. Sensing cytoplasmic danger signals by the inflammasome. *Journal of clinical immunology* 30:512-519, 2010.

Nomoto S, Hishida M, Inokawa Y, Takano N, Kanda M, Nishikawa Y, Fujii T, Koike M, Sugimoto H, Kodera Y. Expression analysis of THOP1 in background liver, a prognostic predictive factor in hepatocellular carcinoma, extracted by multiarray analysis. *Annals of surgical oncology* 21:S443-450, 2014.

Bruchard M, Mignot G, Derangere V, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nature medicine*. 19:57-64, 2013.

Hasegawa K, Takayama T, Ijichi M, et al. Uracil-tegafur as an adjuvant for hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *Hepatology* (Baltimore, Md). 44:891-895, 2006.

Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in

carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nature immunology* 13:343-351, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fuminori Sonohara, Yoshikuni Inokawa, Mitsuro Kanda, Yoko Nishikawa, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Yasuhiro Kodera, Shuji Nomoto. Association of Inflammasome Components in Background Liver with Poor Prognosis After Curatively-resected Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Research*. 37:293-300, 2017. 査読有.
DOI : 10.21873/anticancer.11320

〔学会発表〕(計 2 件)

園原史訓、野本周嗣、猪川祥邦、神田光郎、山田 豪、藤井 努、杉本博行、小池聖彦、藤原道隆、小寺泰弘. 肝細胞がんの背景肝におけるインフラマソーム構成分子の遺伝子発現と予後との関連の検討. 第 70 回日本消化器外科学会総会. 2015 年 7 月 15 日. アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市中区)

Fuminori Sonohara, Shuji Nomoto, Yoshikuni Inokawa, Mitsuhiro Hishida, Mitsuro Kanda, Yoko Nishikawa, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Yasuhiro Kodera. Expression level of inflammasomes components NLRP3, NLRC4, and CASP1 in background non tumorous tissue were associated with worse prognosis for curatively resected hepatocellular carcinoma. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015. 2015 年 4 月 21 日、Philadelphia(USA)

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 博行 (SUGIMOTO, Hiroyuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 2 0 4 3 7 0 0 7

(2)研究分担者

園原 史訓 (SONOHARA, Fuminori)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号 : 3 0 7 4 5 5 3 4

林 真路 (HAYASHI, Masamichi)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号 : 7 0 7 5 5 5 0 3

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00644668

藤井 努 (FUJII, Tsutomu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60566967

野本 周嗣 (NOMOTO, Shuji)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：40300967