

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09444

研究課題名(和文) 運動誘発性筋ホルモンirisinによるNASH関連肝癌抑制効果の検討

研究課題名(英文) Effects of exercise-induced hormon "irisin" on NASH-related hepatoma

研究代表者

川口 巧 (Takumi, Kawaguchi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：00320177

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炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)は、肝癌の主な成因である。NASH関連肝癌には骨格筋量の減少が関与するが、骨格筋が分泌するマイオカインと肝癌との関連は不明である。本研究の目的は、マイオカインが肝癌におよぼす影響を検討することである。NASH肝癌マウスでは、マイオカインの一種であるdecorinの血中濃度が低値であった。さらに、decorinは肝癌細胞の増殖を抑制することも明らかとなった。本研究により、骨格筋の萎縮はマイオカインの変化を介して肝癌の増殖に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、筋肉が分泌するホルモンであるdecorinが肝癌細胞の増殖に関与することが明らかとなった。Decorinにより肝癌細胞の増殖は抑制されることから、decorinは、近年増加傾向にあるNASH関連肝癌の新たな創薬ターゲットとなる可能性が示唆された。また、decorinは筋肉量とも相関を認めたことから、本研究により、社会的問題となっているサルコペニアの病態についても新たな知見が得られた。

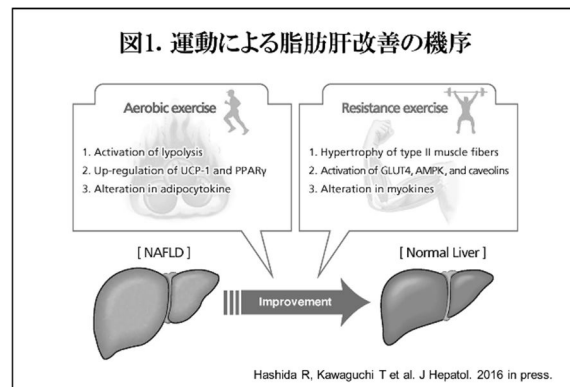
研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a major etiology of hepatocellular carcinoma (HCC). Although muscle atrophy is associated with the development of HCC, it remains unclear an association between HCC and myokine, which is secreted from muscle fiber. The aim of this study is to examine effects of myokine on HCC in a mouse model of NASH-related HCC. In the mouse model of NASH-related HCC, serum levels of decorin, a myokine, was decreased compared to the control group. Moreover, decorin inhibited the proliferation of HCC in vitro study. These findings suggested that muscle atrophy may be associated with HCC proliferation through regulation of myokine.

研究分野：消化器内科

キーワード：マイオカイン 運動 肝癌 非アルコール性脂肪性肝障害 筋肉量

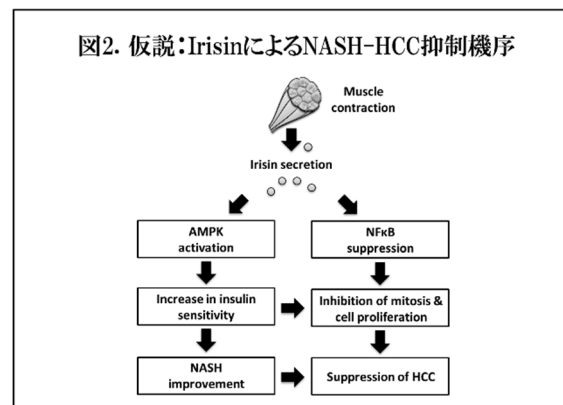
1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) は、生活習慣の欧米化にともない本邦でも慢性肝疾患の主な成因となっているだけでなく、近年患者数が急増している非 B 非 C 肝癌の主な成因としても注目されている。我々は、これまでに、肝疾患と代謝異常の関連について一貫した研究を行うとともに、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の運動療法に取り組み運動療法が脂肪肝を改善するメカニズムにつき検討を重ねてきた (図 1)。



活動量の低下は NASH の主な原因であり、運動療法により NASH が改善することは広く認知されている。これまでに、

我々は NAFLD 患者に対して運動療法を行い、筋肉量や基礎代謝が増加しないにも関わらず、NAFLD が改善することを報告してきた。従来、有酸素運動は脂肪分解を誘導することで、レジスタンス運動は筋肥大を誘導することで NAFLD を改善すると考えられてきた。しかし、近年、骨格筋は運動器としてだけでなく、内分泌臓器であることが明らかとなった。これまでに約 30 種類の筋細胞由来のホルモンであるマイオカインが同定されており、造骨作用、抗炎症作用、認知能の改善作用などがあることが報告されている。なかでも、運動誘発性マイオカインの“irisin”は



AMP-activated protein kinase (AMPK)の活性化を介してインスリン感受性を高め、糖・脂質代謝の改善効果を有する。また、

irisinはnuclear factor-kappa B (NF B)の抑制を介して細胞増殖作用を有することも報告されている。以上より、irisinは、NASHにおける糖・脂質代謝異常を改善しうるとともに、NASH 関連肝癌に対しても抑制的に作用することが期待される (図 2)。

NASH 動物モデルには、肝細胞特異的 PTEN 欠損マウス、acyl CoA oxidase 欠損マウス、メラノコルチン 4 型受容体欠損マウスなどが存在するが、その多くは肝発癌を認めないだけでなく、遺伝子改変マウスである。NASH 患者では上記遺伝子の欠損は認められないことから、NASH 病態の解析には遺伝子改変をとまなわない動物モデルを用いることが望ましいと考えられる。近年、遺伝子改変を伴わずに、ストレプトゾトシンと高脂肪食により、脂肪肝から肝炎、肝硬変、そして肝癌へと進展する NASH 関連肝癌モデルマウス (STAM mouse®) が開発された。本モデルはヒト NASH に類似した病態を安定的に発現するだけでなく、16 週齢より肝癌を発症する。そのため、肝発癌をターゲットとした研究においても迅速な検討が可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、運動誘発性マイオカイン (cathepsin B, myostatin, irisin, decorin) が、NASH の糖・脂質代謝異常と肝発癌におよぼす影響について NASH 関連肝癌マウスモデルを用いて検討することである。

## 3. 研究の方法

### NASH関連肝癌マウスモデル

2日齢の雄性C57BL/6Jマウスに対しストレプトゾトシン (STZ, n=16) を皮下注射し、4週齢より高脂肪食にて飼育することにより、8週齢で、NASH、12週齢で肝硬変 (liver cirrhosis; LC)、16週齢で約50%のマウスに肝癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) が発生するNASHモデル (STAM mouse) を用いた。

### NASH関連肝癌マウスモデルにおけるマイオカインの変化

16週齢のNASH肝癌マウスモデル (STAM mouse) の肝組織を採取し、病理学的検討を行った。また、16週齢のNASH肝癌マウスモデルおよびコントロール群の血清を用いて、インスリン抵抗性指数 (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance) を評価した。同血清を用いて、cathepsin B, myostatin, irisin, decorinをenzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) にて評価した。

### 肝癌患者における筋肉量とマイオカインの関連

過去に肝動脈化学塞栓術にて治療された肝癌患者を対象とした。肝癌の評価目的にて撮影されたCT画像を用いて、第三腰椎レベルの骨格筋量を測定し、skeletal muscle index (筋肉量/身長<sup>2</sup>)にて筋肉量を評価した。年齢、BMI、血清GGT値、アルブミン値、ビリルビン値、アンモニア値、プロトロンビン活性値、Child-Pugh scoreとskeletal muscle indexの相関をSpearmanの順位相関係数にて検討した。また、skeletal muscle indexの変化に基づき対象者を筋肉量増加群と減少群の2群に群分けし血清マイオカイン値 (cathepsin B, myostatin, irisin, decorin) の差異を検討した。さらに、骨格筋量減少に関わる要因を決定木解析にて検討した。

### マイオカインが肝癌培養細胞の増殖におよぼす影響

ヒト肝癌培養細胞の培養上清にマイオカイン (decorin) を添加し、マイオカインが肝癌細胞の増殖におよぼす影響を検討した。また、細胞増殖に関与する細胞内シグナル伝達分子 (EGFR, GSK3 および ERK1/2) のリン酸化についても western blot 法にて検討した。

#### 4. 研究成果

##### NASH 肝癌マウスモデルにおけるマイオカインの変化

NASH モデルマウスの肝臓には大滴性の脂肪沈着、炎症細胞浸潤、肝細胞の風船様腫大、および中心静脈・肝細胞周囲の線維化が認められた。NASH モデルマウスにおけるインスリン抵抗指数 (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance) はコントロール群と比較し有意に高値であった。cathepsin B, myostatin, irisin の血中濃度はコントロール群と比較して有意差を認めなかった。一方、NASH モデルマウスにおける decorin の血中濃度はコントロール群と比較して有意に低値であった。

##### 肝癌患者における筋肉量とマイオカインの関連

肝動脈化学塞栓術にて治療された肝癌患者を対象として筋肉量を検討した (n=39, 年齢 75 [69-78]歳, 性別 男性/女性 20/19, BMI 22.1 [22.0-24.6], Child-Pugh score 6 [5-8])。その結果、治療後の骨格筋量に有意な減少が認められることを明らかにした。また、今回の検討で、加齢と肝予備能は骨格筋量と有意な相関を認めなかったが(表 1)、骨格筋量と血清 decorin 値の間には有意な正の相関が認められた。また、irisin と decorin は骨格筋減少群で非減少群と比較し有意に低値であった(図 3)。さらに、決定木解析により血清 decorin 値 < 10226.8 pg/mL 未満が骨格筋量減少に最も関わる因子であった(図 4)。

表1. 筋肉量と宿主因子・腫瘍因子・マイオカインの関連

	r	P
Age	-0.00228	0.989
BMI	0.377446	0.0178
ALT	0.124176	0.4513
ALP	0.23206	0.1552
GGT	0.41667	0.0083
Albumin	-0.1942	0.2362
Total bilirubin	0.062688	0.7046
Total cholesterol	-0.05848	0.7273
Ammonia	0.331436	0.0483
Prothrombin activity (%)	0.022398	0.8923
Child-Pugh score	0.112844	0.494
Creatinine	-0.01967	0.9054
eGFR	0.07408	0.654
AFP	-0.42655	0.0068
Des-γ-carboxy prothrombin	0.085112	0.6165
Myostatin	0.146524	0.3734
Decorin	0.374709	0.0188
Irisin	-0.0942	0.5684
Cathepsin B	0.271391	0.0947

図3.

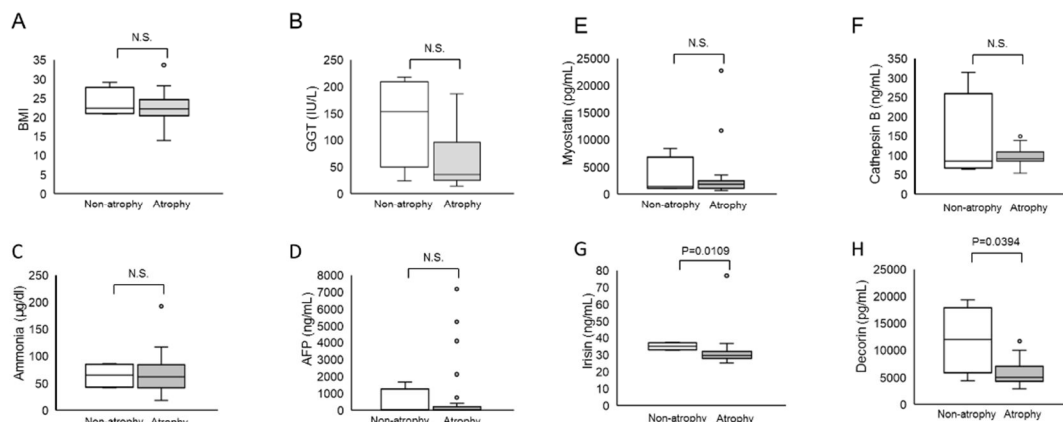
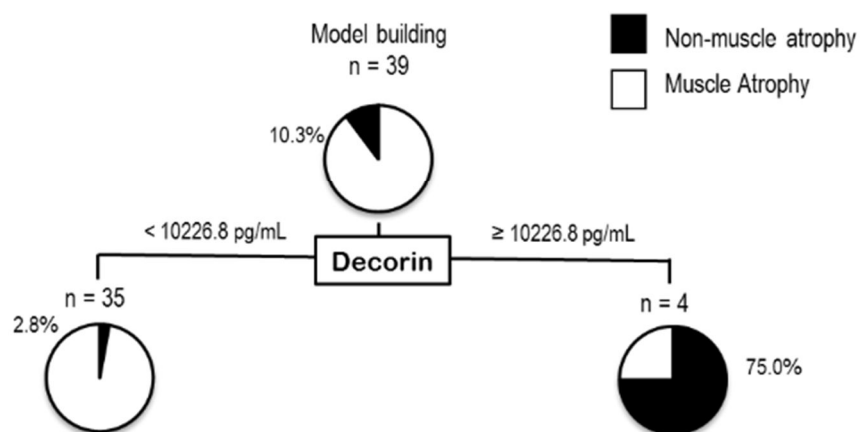


図4.



#### マイオカインが肝癌培養細胞の増殖におよぼす影響

ヒト肝癌培養細胞の培養上清に decorin を添加し、マイオカインが肝癌細胞の増殖におよぼす影響を検討した。その結果、decorin 群では、コントロール群と比較して有意な細胞増殖の抑制効果が認められた ( $72.2 \pm 5.2\%$ ,  $P < 0.01$ )。また、decorin 群ではコントロール群と比較して、EGFR, GSK3 および ERK1/2 のリン酸化が抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bekki M, Hashida R, Kawaguchi T, Goshima N, Yoshiyama T, Otsuka T, Koya S, Hirota K, Matsuse H, Niizeki T, Torimura T, Shiba N	4. 巻 1
2. 論文標題 The association between sarcopenia and decorin, an exercise induced myokine, in patients with liver cirrhosis: a pilot study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle Rapid Communications	6. 最初と最後の頁 e00068
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirota K, Kawaguchi T, Hashida R, Koya S, Bekki M, Goshima N, Yoshiyama T, Otsuka T, Nozoe R, Nakano D, Shirono T, Shimose S, Iwamoto H, Niizeki T, Matsuse H, Koga H, Shiba N, Torimura T	4. 巻 3
2. 論文標題 Profiles Associated with Sarcopenia in Hepatoma Patients Underwent Transcatheter Arterial Chemoembolization: A Data Mining Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 e00066
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kawaguchi T, Koya S, Hashida R, Hirota K, Bekki M, Goshima N, Yoshiyama T, Otsuka T, Nozoe R, Nagamatsu A, Nakano D, Shirono T, Shimose S, Iwamoto H, Niizeki T, Matsuse H, Koga H, Shiba N, Torimura T
2. 発表標題 In-hospital Exercise Prevented Sarcopenia in Hepatoma Patients with Chronic Liver Disease Who Underwent Transcatheter Arterial Chemoembolization
3. 学会等名 The Liver Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 巧、中野 暖、橋田 竜騎、城野 智毅、下瀬 茂男、岩本 英希、相野 一、新関 敬、古賀 浩徳、志波 直人、鳥村 拓司
2. 発表標題 運動療法が肝がん患者のサルコペニアにおよぼす影響
3. 学会等名 第104回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 巧、中野 暖、鳥村 拓司
2. 発表標題 肝疾患におけるサルコペニア 判定基準の比較と運動療法の効果
3. 学会等名 第54回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 巧、橋田 竜騎、鳥村 拓司
2. 発表標題 有酸素運動とレジスタンス運動によるNAFLD改善効果の比較検討
3. 学会等名 第103回 日本消化器病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川口 巧、志波 直人、鳥村 拓司
2. 発表標題 運動療法が肝硬変患者のサルコペニアにおよぼす影響
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryuki Hashida, Takumi Kawaguchi, Shunji Koya, Keisuke Hirota, Goshima, Otsuka, Masafumi Bekki, Hiroo Matsuse, Jun Hayashi, Naoto Shiba, Takuji Torimura
2. 発表標題 Decorin, a Newly Identified Exercise-induced Myokine, was Associated with Sarcopenia in Patients with Liver Cirrhosis
3. 学会等名 The Liver Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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	橋田 竜騎  (Hashida Ryuki)  (40754841)	久留米大学・医学部・助教    (37104)	
研究 分担者	谷口 英太郎  (Taniguchi Eitaro)  (50341318)	久留米大学・医学部・助教    (37104)	