

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K10671
研究課題名(和文) 肥満・糖尿病を背景とした肝臓患者における胆汁酸組成変化と発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) An investigation of oncogenic mechanism in patients with hepatocellular carcinoma caused by obesity or diabetes

研究代表者
岩下 幸雄 (Iwashita, Yukio)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60534203
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年増加しているヒトNBNC-HCCにおける肝細胞癌の発症メカニズムの解明を目的とし、preliminaryな研究に着手した。これまでの研究成果により、ヒトNBNC-HCCにおける総胆汁酸量と分画の特異な変化を見出している。特に門脈血内の胆汁酸解析は他に類を見ない研究であり、今後も症例を重ねて研究を推進する意義がある。さらに他の疾患群コントロールとの比較により、詳細な検討が可能となる。加えて基礎研究では2次胆汁酸分画の増加により星細胞の老化現象がより強く起こることを確認し、論文報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前述の研究成果は、ウイルスを介さずに肝細胞癌が発がんする条件や状況の解明に繋がる。ウイルスが治療薬によってコントロール可能となった現代においては、肝細胞癌の制圧に必要なあと一つの要素を考える必要がある。本研究は、その癌化メカニズムの解明と新たな治療法の開発につながる研究として今後の発展が期待される。臨床研究と基礎研究の組み合わせを継続的に行うことでその信憑性を評価しつつ進めることが求められる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we started a preliminary study with the aim of clarifying the onset mechanism of hepatocellular carcinoma in human NBNC-HCC, which has been increasing in recent years. Based on the results of our research to date, we found a unique change in total bile acid content and fraction in human NBNC-HCC. In particular, the analysis of bile acids in the portal blood is a unique study, and it will be meaningful to continue the study. Further comparison with other disease group enables detailed examination. In addition, in the basic research, it was confirmed that the aging phenomenon of stellate cells was more intensely caused by the increase of the secondary bile acid fraction, and the paper was published.

研究分野：肝臓、肝細胞癌、肥満、糖尿病

キーワード：肝細胞癌 肥満 糖尿病 胆汁酸 肝星細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、非 B 非 C 肝細胞癌 (NBNC-HCC) の患者数が増加している。肝星細胞が発癌促進作用を有する細胞老化関連分泌因子 (SASP 因子) を分泌することで、周囲の肝細胞の老化および癌化を促進するメカニズムが提唱されている。しかし、ヒトでは肥満や糖尿病を背景とした肝細胞癌の発症メカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト肥満者 NBNC-HCC において、腸内細菌叢、胆汁酸の定量、免疫組織学的解析、遺伝学的解析を網羅的に行うことで、ヒトにおける肥満や糖尿病を背景とした肝細胞癌の発症メカニズムの解明を目的とする。さらに、二次胆汁酸のみならず、他の内因性・外因性物質が誘導する星細胞の SASP 因子分泌による、より普遍的な病態メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ヒトにおける肥満や糖尿病を背景とした肝細胞癌の発症メカニズムと、星細胞の SASP 因子分泌によるより普遍的な病態メカニズムを明らかにすることを目的として、(1) ヒト臨床検体の解析、(2) 星細胞 SASP 因子分泌による病態解析にわけて研究を計画した。ヒト臨床検体としては、NBNC-HCC 患者(50 例)、高度肥満患者(非癌コントロール)(30 例)、肥満・糖尿病かつ NBNC-HCC 患者(30 例)、および健康ボランティアおよび転移性肝がん(計 30 例)を目標症例数とし、腸内細菌叢、胆汁酸の定量、免疫組織学的解析、遺伝学的解析を網羅的に行った。

また、*in vitro* 星細胞培養での SASP 因子分泌誘導物質の同定と *in vivo* 実験系における病態解析および治療介入を行った。

4. 研究成果

ヒト臨床検体に関しては 64 症例の集積が完了した。内訳を以下に示す。HCC 患者 37 症例を集積し、そのうち 17 例がウイルス性 HCC であった。20 例が NBNC-HCC で、肥満・糖尿病かつ NBNC-HCC は 20 例中 7 例を占めていた。健康ボランティアおよび転移性肝がん症例は 27 例(健康ボランティア 8 例、転移性肝がん 19 例)の集積が完了した。高度肥満患者(非癌コントロール)については現在までに集積件数は 0 件である。対象としていた①～③の件数が少なかったため、以下の項目別に Preliminary に検討を行った。(A. ウイルス性 HCC B. アルコール性 HCC C. NBNC-HCC かつ非アルコール性 HCC、いわゆる NAFLD-HCC D. 転移性肝がん)

各群で胆汁酸の定量を行ったところ、A 群 21.4 μ M、B 群 11.5 μ M、C 群 8.4 μ M、D 群 9.4 μ M であり、HCC の癌成因別に胆汁酸量が違うことがわかった。またそれぞれで腸内細菌叢を検討したところ C 群では Bacteroides 門が減り、Firmicutes 門が増加していた。細菌叢変化について、他には明らかな差を認めることはできなかった。

星細胞 SASP 因子分泌による病態解析に関しては DNA マイクロアレイによる pathway 解析を行ったところ、Tumor Necrosis Factor (TNF) signaling pathway に属する多数の遺伝子群の upregulation を認めた。この傾向は特に nuclear factor-kappa B signaling pathway において顕著であった。また IL-6 に代表される SASP 関連遺伝子の有意な upregulation を認めた。各種胆汁酸の添加実験においては 2 次非抱合型胆汁酸群において上清中 IL-6 濃度の有意な上昇を認めた。免疫蛍光染色では 2 次非抱合型胆汁酸群で内皮下突起が放射状に延長し、myofibroblast 様の形態学的変化が確認された。フローサイトメトリーによる解析では 2 次非抱合型胆汁酸群において有意な α -SMA の発現増強を認めた。上記結果を学会発表および論文化した。

これらの成果により明らかになったことは、1. 胆汁酸の分画により星細胞活性化の程度に違いがあること、2. 肝細胞癌患者における胆汁酸分画の違い、3. 腸内細菌の違いにより胆汁酸文庫に影響がある、の 3 点である。我々はこの断片的な 3 つの事象を結びつける研究が、以下のように新たに必要と考えている。

・末梢血と門脈血における胆汁酸分画の違い

本研究期間においては、解析をすでに開始している。これまでに、末梢血の胆汁酸と門脈血の胆汁酸では、総量、分画ともに大きな差があることが確認されている。また、我々が注目する非ウイルス性肝癌患者では、2 次胆汁酸分画の割合が大きく、その総量においても若干異なることが確認されている。

・腸内細菌による胆汁酸分画の変化

腸内細菌の解析も進めている。これまでに 1 次胆汁酸を 2 次胆汁酸に変化させる腸内細菌

菌は数多く報告されているが、臨床検体から得られる膨大な腸内細菌のデータと照らし合わせる有用な方法は開発されていない。今後の大きな課題である。

・星細胞の老化現象について

我々の基礎研究においては、2次胆汁酸が星細胞の老化現象に大きく関与していることが見出された。この老化現象こそが非ウイルス性肝癌のトリガーであると考えれば、このトリガーをコントロールすることで発癌を防ぐ有効な治療になるかもしれない。このため、いくつかの薬剤を試用して、このトリガーを抑制的にコントロールできるかどうか、検討を開始している。これまでに試した約20種類の薬剤では抑制的にコントロールできる結果は得られていない。今後さらなる検討を行っていきたいと考えている。

これらを項目ごとに丁寧に探究することにより本分野のさらなる発展と、増加している非ウイルス性肝細胞癌の発癌メカニズムの解明、さらには新しい治療法の開発につながっていくものと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saga K, Iwashita Y, Hidano S, Aso Y, Isaka K, Kido Y, Tada K, Takayama H, Masuda T, Hirashita T, Endo Y, Ohta M, Kobayashi T, Inomata M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Secondary Unconjugated Bile Acids Induce Hepatic Stellate Cell Activation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E3043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19103043	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嵯峨 邦裕, 岩下 幸雄, 多田 和裕, 高山 洋臣, 平下 禎二郎, 遠藤 裕一, 内田 博喜, 太田 正之, 猪股 雅史
2. 発表標題 胆汁酸が誘導する肝星細胞活性化の検討
3. 学会等名 JDDW
4. 発表年 2018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	猪股 雅史 (Inomata Masafumi) (60315330)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	城戸 康年 (Kido Yasutoshi) (90511395)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	飛弾野 真也 (Hidano Shinya) (80516386)	大分大学・医学部・助教 (17501)	