

令和 3 年 4 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02789

研究課題名(和文) NASH・肥満関連肝癌の特異的代謝変化に基づく基礎的病態解明から前臨床試験まで

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and translational research in NASH and obesity-related liver cancer focusing on lipid metabolic reprogramming

研究代表者

中川 勇人 (Nakagawa, Hayato)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00555609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NASH肝癌の病態解析に基づき、脂質代謝経路を基軸とした新たな治療法やバイオマーカーを探索するとともに、新規化合物を用いた前臨床試験を行った。結果、次のような成果が得られた。血清アシルカルニチン分画はNASHのバイオマーカーとなり得る、SREBP阻害作用を有するビタミンD誘導体を新規合成し、in vivoにおける脂肪肝改善効果を確認した、しかしNASHモデルマウスにおいて強力にSCAP-SREBP経路を阻害することはむしろ肝臓の病態を悪化させる可能性がある、NASHモデルマウスにおいて、骨髄球特異的にASK1をKOすることにより肝発癌を抑制できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、NASHの病態を反映する血清バイオマーカーを同定することができ、さらにNASHの治療につながり得る脂肪酸合成を標的とした新規化合物の導出に成功した。しかしながらマウスモデルにおける検討では、強力すぎる脂質合成の阻害はかえってNASHの病態を悪化させる可能性を示唆する結果が得られた。このことは今後のNASHの治療戦略を考えるうえで、重要な示唆を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We analyzed molecular mechanisms of NASH-related HCC development focusing on lipid metabolism and explored biomarkers. In addition, we conducted preclinical studies using new compounds. We obtained the following results. 1) Altered serum acylcarnitine profile is a potential biomarker for NASH, 2) We developed VDR-silent vitamin D derivative that impairs SREBP in vivo, 3) Strong inhibition of SCAP-SREBP pathway rather exacerbates liver injury in NASH, 4) Myeloid cell-specific KO of ASK1 prevents NASH-related HCC.

研究分野：肝臓学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 肝細胞癌 アシルカルニチン SREBP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年肝炎ウイルスの関与のない肝癌が増加しており、背景には肥満人口の増加に伴う非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)の罹患率上昇がある。しかし NASH や肥満からの発癌促進機構は未だ十分には解明されておらず、また確立された薬物療法もない。申請者はこれまでに肝癌組織のメタボローム解析を行い、肥満関連肝癌には特徴的な脂質代謝変化が生じていること、また発癌前には小胞体ストレスを介した脂質合成亢進が NASH の病態を進展させることを見出している。これらの知見を基に本研究では、肥満関連肝癌特異的代謝変化に基づく発癌促進機構解明とバイオマーカー同定、脂質生合成の司令塔 SREBP 阻害作用を有するビタミン D 誘導体の開発と NASH 発癌抑制効果、小胞体ストレスの下流因子 ASK1 の NASH 発癌における役割、の 3 つの観点から、NASH・肥満関連肝癌の基礎的病態解明から新規治療標的の探索、ヒトへの応用を目指した前臨床試験まで、脂質代謝経路を軸に幅広く検討する。

### 2. 研究の目的

NASH 肝癌の病態解析に基づき、脂質代謝経路を基軸とした新たな治療法やバイオマーカーを探索するとともに、新規化合物を用いた前臨床試験まで行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 肥満関連肝癌特異的代謝変化に基づくバイオマーカー探索

これまでのマウスモデルの研究結果に基づき、生検で非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) と診断された 241 症例(肝癌あり 23 例、肝癌なし 218 例)の血清を用いて、LC-MS/MS によって不飽和を含む AC0~18 の 16 種類のアシルカルニチン濃度を測定し、病態との関連を詳細に検討した。

#### SREBP 阻害作用を有するビタミン D 誘導体の開発

これまでの検討によって、NASH の初期および肝細胞癌(HCC)において SREBP を介した脂質生合成が亢進していることがわかっている。そこで京都大学化学研究所との共同研究によって約 300 個の脂質関連内因性分子のライブラリーを細胞でスクリーニングした結果、SREBP 阻害作用を持つ内因性因子としてビタミン D を同定した。またその作用は SREBP 活性化に必須の分子 SCAP をビタミン D は受容体非依存的に分解することによって発揮されていることを見出した。そこで本検討では、ビタミン D 受容体へは結合せず SREBP 阻害機能のみを有する化合物を合成し、in vitro で SREBP 阻害作用を持つビタミン D 誘導体の中から、短期 in vivo モデルで SREBP 機能を阻害するビタミン D 誘導体を絞り込み、さらに ob/ob マウスを用いて脂肪肝における有用性を検証した。

#### NASH マウスモデルにおける SREBP 阻害効果の検証

NASH モデルマウスの一つである肝臓特異的 PTEN 欠損マウスに、SREBP 活性化に必須の分子 SCAP を欠損させ(Alb-Cre;PTEN<sup>F/F</sup>;SCAP<sup>F/F</sup> PTEN/SCAPDKO マウス)、その病態に与える影響を解析した。

#### NASH 発癌における ASK1 の役割

NASH 肝癌モデルマウスの一つ高脂肪食負荷 MUP-uPA マウスを用いて、全身 ASK1 欠損マウス(ASK1KO;MUP-uPA マウス)、肝臓特異的 ASK1 欠損マウス(Alb-Cre;ASK1<sup>flx/flx</sup>;MUP-uPA マウス ASK1<sup>hep</sup>KO;MUP-uPA マウス)、骨髄球特異的 ASK1 欠損マウス(LysM-Cre;ASK1<sup>flx/flx</sup>;MUP-uPA マウス ASK1<sup>Lys</sup>KO;MUP-uPA マウス)をそれぞれ作成し、そのフェノタイプに与える影響を解析した。

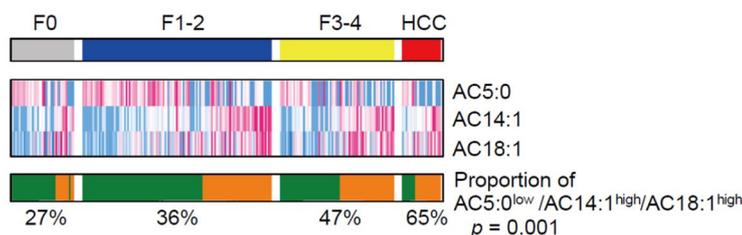
### 4. 研究成果

#### 肥満関連肝癌特異的代謝変化に基づくバイオマーカー探索

我々はこれまでに肝細胞癌(HCC)組織を用いた網羅的メタボローム解析から、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)や肥満に関連した肝癌では β 酸化を誘導する酵素 CPT2 の発現低下に伴い β 酸化は抑制されており、この現象は過剰な β 酸化を抑制して脂肪毒性を回避すると同時に、中間代謝産物アシルカルニチン(Acylcarnitine; AC)の蓄積により癌幹細胞機能を獲得するという合目的反応であることを見出した(Gut 2018)。また NASH 肝癌患者血清中のアシルカルニチンを測定したところ、非癌患者に比べて血清総アシルカルニチン量が有意に増加しており、バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

そこで本研究では、生検で非アルコール性脂肪肝(NAFLD)と診断された 241 症例(肝癌あり 23 例、肝癌なし 218 例)の血清を用いて、LC-MS/MS によって不飽和を含む AC0~18 の 16 種類のアシルカルニチン濃度を測定し、病態との関連を詳細に検討した。すると肝線維化進行とともに長鎖不飽和アシルカルニチンが増加する傾向にあり、NAFLD→NASH→LC→HCC と変化するにつれて AC14:1high/AC18:1high/AC5:0low という特徴的シグニチャーを示す割合が有意に増加し

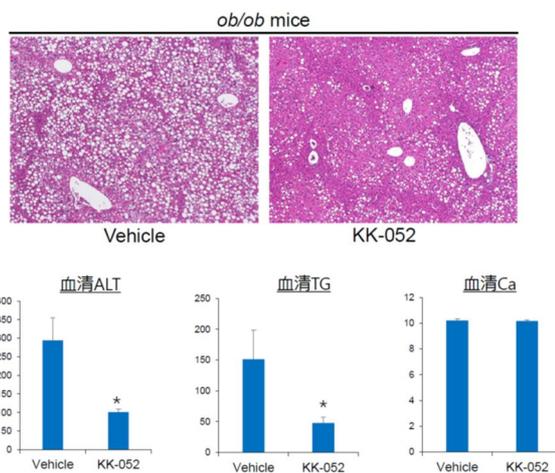
ていた(次項図)中でも *in vitro* およびマウスモデルで発癌促進作用を認めた AC18:1 は肝癌患者で有意に増加しており、ヒトの NASH 関連肝癌でも発癌に寄与している可能性が考えられた。また AC18:1 は血清中の TNF $\alpha$  や IL-6 といった炎症



性サイトカインとも有意な正の相関を示した。長鎖アシルカルニチンは炎症細胞の NF- $\kappa$ B 経路活性化を介して炎症を促進する作用を有することが報告されており、蓄積したアシルカルニチンは炎症を促進することによっても、NASH の病態を悪化させている可能性が示唆された。さらに先天性 CPT2 欠損症の診断に用いられる、アシルカルニチン増加とミトコンドリア  $\beta$  酸化能低下の両者を反映する指標(AC16:0+AC18:1)/AC2:0 は、肝線維化とは独立した有意な肝癌関連因子であり、マウスの実験結果を裏付ける結果となった。これらの結果より、血清アシルカルニチンのバイオマーカーとしての有用性や病態への関与についてさらに検討する価値があると考えられた。本研究成果は、Scientific Reports 誌に掲載された。

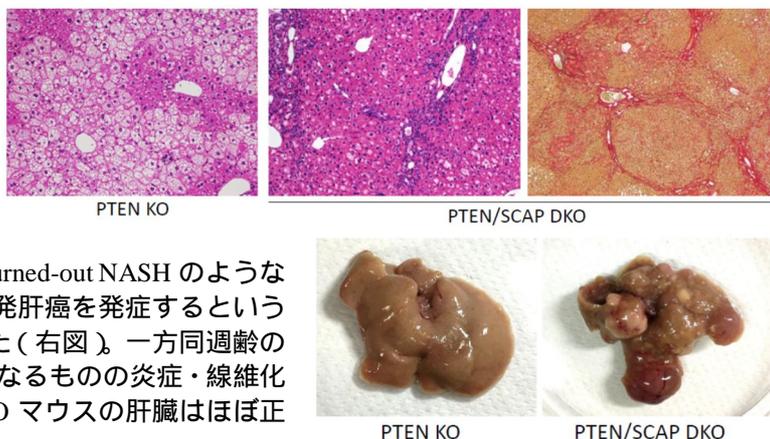
### SREBP 阻害作用を有するビタミン D 誘導体の開発

*In vitro* の実験において SREBP 阻害効果が高くかつビタミン D 受容体への作用が低い結果が得られたビタミン D 誘導体を用いて、*in vivo* での薬効評価試験を行った。スクリーニングの実験系として、マウスを 48 時間絶食にした後に、高炭水化物・低脂肪・ビタミン D 欠乏食を再摂食させるモデルを構築した。このモデルでは再摂食 48 時間後に肝臓組織中 SREBP1 および 2 の活性化が強く誘導され、薬剤スクリーニングの短期モデルとして非常に有用であることが分かった。これまでに 14 種類のビタミン D 誘導体をスクリーニングし、最終的に化合物 KK-052 が血清 Ca 値を上昇させることなく最も安定して SREBP 阻害作用を発揮することを見出した。短期モデルの結果に基づき KK-052 の認容最大投与量を 10mg/kg と設定し、次に過食から自然に脂肪肝を発症する Ob/Ob マウスを用いて、KK-052 の脂肪肝抑制効果と長期投与の安全性について検討した。Ob/Ob マウスに対して KK-052 (10mg/kg) を 4 週間投与するプロトコルにて実験を行った結果、同化合物は血清 Ca 値を上昇させることなく長期投与可能で、かつ体重増加および脂肪肝発症を有意に抑制し得ることが明らかとなった。また血清 ALT 値や血清 TG 値の上昇も有意に抑制した(右図)。NASH や HCC の治療薬として、有望な可能性が示唆された。本研究成果は、Journal of Medicinal Chemistry 誌に掲載された。



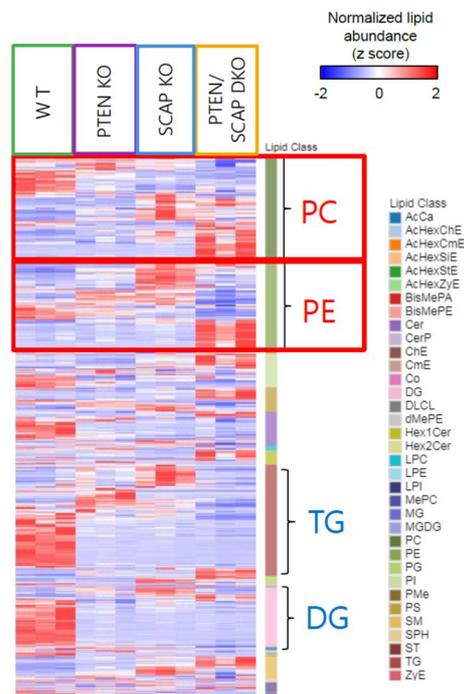
### NASH マウスモデルにおける SREBP 阻害効果の検証

NASH 肝癌モデルとして SREBP 活性化を伴って NASH から肝細胞癌を発症する肝臓特異的 PTEN 欠損マウス(Alb-Cre;PTEN<sup>F/F</sup>)を用いることとし、同マウスにさらに SREBP 活性化に必須の分子 SCAP を欠損させたマウスを交配させ、肝臓特異的 PTEN 欠損 SREBP 不活性化マウスを作成した(Alb-Cre;PTEN<sup>F/F</sup>;SCAP<sup>F/F</sup> PS-DKO マウス)。SREBP は活性化の際にエスコートタンパク SCAP により小胞体からゴルジ体に輸送される必要があり、SCAP が欠損すると SREBP1 と 2 の活性化がほぼ完全に阻害される。PS-DKO マウスでは予想通り肝細胞の脂肪滴形成が著明に抑制されたが、肝細胞障害・炎症はむしろ悪化し、5 か月齢で burned-out NASH のような肝硬変、さらに 7 か月齢で多発肝癌を発症するという全く予想に反する結果となった(右図)。一方同週齢の PTEN KO マウスは脂肪肝にはなるものの炎症・線維化は軽度で、また SCAP 単独 KO マウスの肝臓はほぼ正



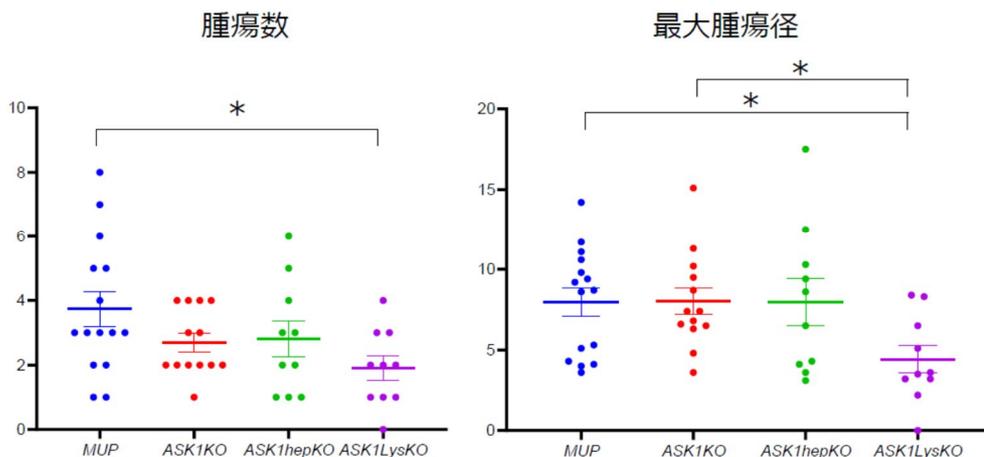
常であった。すなわち、肝細胞に脂質が蓄積する病態において脂質合成を阻害することは、むしろ病態を悪化させる可能性が示唆された。一般に NASH・肥満患者においては、食事から摂取する総脂肪量が多だけでなく、インスリン抵抗性を介して内臓脂肪からの脂肪分解も亢進しており、これらが門脈を通過して多量に肝細胞へ流入する。burned-out NASH ではこのような肝細胞への脂質流入が持続しているにもかかわらず、SREBP 活性低下によって脂質合成ができない状況ととらえると、burned-out という現象自体が病態悪化につながっていると考えられることができる。事実、PS-DKO マウスにアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて SREBP の活性型 N 末端領域を導入し脂質合成能を回復させると、burned-out NASH から単純性脂肪肝へと変化し、線維化・発癌を著明に抑制できることも見出した。

さらに、脂質合成阻害による NASH の病態悪化機序を明らかにすべく、各マウスの肝組織を用いて網羅的メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を行った。その結果、SCAP 欠損による SREBP 機能低下は、生体膜リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)に組み込まれる脂肪酸の組成を大きく変化させ(右図)、その結果として小胞体膜の流動性が低下し、小胞体ストレスを惹起することによって病態を悪化させている可能性を見出した。現在さらに詳細なメカニズムの解析を進めている。



#### NASH 発癌における ASK1 の役割

MUP-uPA マウス、ASK1KO;MUP-uPA マウス、ASK1hepKO;MUP-uPA マウス、ASK1LysKO;MUP-uPA マウスにそれぞれ 6 週齢から高脂肪食を与え、10 か月後に肝発癌を比較した。その結果興味深いことに、骨髄球で ASK1 を KO したときのみ、肝発癌が有意に抑制されることがわかった(下図)。現在そのメカニズムの解析を行っている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagai N, Kudo Y, Aki D, Nakagawa H, Taniguchi K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Immunomodulation by Inflammation during Liver and Gastrointestinal Tumorigenesis and Aging.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052238	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 Matsushita Y, Nakagawa H, Koike K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Lipid Metabolism in Oncology: Why It Matters, How to Research, and How to Treat.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers (Basel).	6. 最初と最後の頁 474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13030474	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 Nakatsuka T, Nakagawa H, Hayata Y, Wake T, Yamada T, Nishibatake Kinoshita M, Nakagomi R, Sato M, Minami T, Uchino K, Enooku K, Kudo Y, Tanaka Y, Kishikawa T, Otsuka M, Tateishi R, Koike K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Post-treatment cell-free DNA as a predictive biomarker in molecular-targeted therapy of hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-021-01773-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawagoe F, Mendoza A, Hayata Y, Asano L, Kotate K, Mototani S, Kawamura S, Kurosaki S, Akagi Y, Takemoto Y, Nagasawa K, Nakagawa H, Uesugi M, Kittaka A.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Discovery of a VDR-Silent Vitamin D Derivative That Impairs SREBP in Vivo.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Med Chem.	6. 最初と最後の頁 in press
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Enooku K, Nakagawa H, Fujiwara N, Kondo M, Minami T, Hoshida Y, Shibahara J, Tateishi R, Koike K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Altered serum acylcarnitine profile is associated with the status of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and NAFLD-related hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23;9(1):10663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47216-2	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 Nakagawa H, Hayata Y, Kawamura S, Yamada T, Fujiwara N, Koike K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Lipid Metabolic Reprogramming in Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 E447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers10110447	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9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中川 勇人、小池 和彦
2. 発表標題 ケミカルバイオロジーに基づくNAFLDに対する新規治療法の創出；人工ビタミンD誘導体による脂肪肝抑制効果
3. 学会等名 第56回肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawamura S, Nakagawa H, Koike K
2. 発表標題 Inhibition of SCAP/SREBP-mediated lipogenesis exacerbates liver injury in murine NASH model via disturbance of phospholipid metabolism.
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川村聡、中川勇人、小池和彦
2. 発表標題 NASH病態進展における脂質生合成経路の役割
3. 学会等名 第27回JDDW
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuma Nakatsuka, Hayato Nakagawa, Kazuhiko Koike
2. 発表標題 2.Clinical applications of liquid biopsy as a novel biomarker in hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 JDDW International Session
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川勇人、小池和彦
2. 発表標題 3.NASH・肥満関連肝癌に特異的な脂質代謝リプログラミングに基づく病態解明とバイオマーカー探索
3. 学会等名 第55回肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayato Nakagawa
2. 発表標題 4.Metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma for adaptation to lipid-rich environment.
3. 学会等名 JSH-EASL Joint Session
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川勇人、小池和彦
2. 発表標題 NASH・肥満関連肝癌におけるlipid metabolic reprogramming
3. 学会等名 第6回肝臓と糖尿病・代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川勇人、小池和彦
2. 発表標題 癌種特異的脂質代謝リプログラミングを標的とした新規治療戦略
3. 学会等名 第5回肝臓と糖尿病・代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川勇人、榎奥健一郎、小池和彦
2. 発表標題 NAFLD患者241症例における血清アシルカルニチン精密分析
3. 学会等名 酸化ストレスと肝研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 脂肪性肝疾患の検出又はリスクの予測方法、脂肪性肝疾患を検出するための診断薬キット	発明者 中川勇人、榎奥健一郎、藤原直人、小池和彦、曲尾直樹、青	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/032149	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 NAFLD又はNASHの検出又はリスクの予測方法、NAFLD又はNASHを検出するための診断薬キット及び対象における肝線維化の進行度を判定するための診断薬キット	発明者 中川勇人、榎奥健一郎、藤原直人、小池和彦、曲尾直樹、青	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/032138	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 3. N A F L D又はN A S Hの検出又はリスクの予測方法、N A F L D又はN A S Hを検出するための診断薬キット	発明者 中川勇人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許6592628	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 4. 脂肪性肝疾患の検出又はリスクの予測方法、脂肪性肝疾患を検出するための診断薬キット及びバイオマーカー	発明者 中川勇人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許6592638	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------