

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15826

研究課題名（和文）Notchリガンドの機能的差異を基盤とした肝細胞癌治療への新戦略

研究課題名（英文）Notch ligands Dll4 and Jag1 have antagonistic effects on hepatocellular carcinoma development

研究代表者

中野 泰博（Nakano, Yasuhiro）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：80755439

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌の発生・進展におけるNotchシグナルは、肝細胞へ同シグナルを過剰に活性化させたマウスの結果から促進的に作用することが示唆されているものの、その詳細はいまだに明らかとなっていない。本研究課題では、肝細胞癌の進展に対して、NotchリガンドのDll4が促進的に作用し、Jag1が抑制的に作用することを見出した。また、Dll4はNotch1シグナルを活性化し、癌細胞の増殖を促進する一方で、Jag1はNotch2シグナルを活性化し、Dll4の異所的発現を抑制するとともに癌細胞の増殖も抑制した。これらのことから、Notchリガンドの機能的差異を利用した分子標的薬開発の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓は世界的に死者数の多い癌であり、その治療法開発が待たれる。肝線維化・肝硬変を背景として肝臓は発生・進展するが、線維化が進行した肝臓においては正常肝と比較し、肝再生能が低下する。このため、肝臓を切除した場合には、残存肝の再生能が乏しいために術後肝不全を引き起こすリスクを伴う。本研究課題は「肝臓の抑止」と「線維肝再生」の両方を可能とする治療法の開発基盤を構築することを目的とした。本研究の成果として、線維肝の再生を促進するNotchリガンドJag1からのNotch2シグナルが肝臓の進展を抑止することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In many types of cancer, the Notch signaling is one of the most common drivers of carcinogenesis. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third cancer killer in the world, but the type of Notch ligands and receptors influencing HCC development is unclear. Using diethylnitrosamine (DEN)-induced murine HCC model, we identified Notch ligands Dll4 and Jag1 as the genes whose expression was significantly correlated with that of the Notch target gene Hes1 in the cancer tissue. Using Dll4 or Jag1 conditional knockout mice, we investigated how different Notch ligands modulate DEN-induced hepatic carcinogenesis. Hepatocyte lineage-specific Dll4 knockout suppressed HCC progression via loss of Notch1 signaling. On the other hand, Jag1 deletion induced ectopic Dll4 expression in hepatocytes by loss of Notch2 signaling, which led to HCC progression. These results suggest that different ligands and receptors have different effects on Notch signaling in HCC development.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝細胞癌 Notchリガンド Notch受容体 肝線維化 肝星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の肝臓病に対する治療戦略のひとつとして、「肝線維化の進展抑制と線維肝の再生促進」と同時に「硬変肝からの発癌を抑止する」治療法の開発が喫緊の研究課題である。その理由として、C型肝炎ウイルスに対して有効な治療法が開発された反面、ウイルス除去後も長期に渡る線維化状態の持続と、発癌リスクが高いことが挙げられる (*J Hepatol* 65: 663-665, 2016)。また、肝硬変を背景とした肝細胞癌を切除した場合には、残存肝の再生能が乏しいために術後肝不全を引き起こすリスクを伴う。我々はこれまでに、線維肝組織中の筋線維芽細胞に発現する Notch リガンドの Jag1 が、肝細胞の Notch2 シグナルを活性化させ、線維肝の再生に寄与することを示してきた (*Hepatol Commun* 1: 215-229, 2017)。

一方で Notch シグナルは、種々の臓器の発癌や転移に対して強く関与していることが明らかになってきた (*Nat Rev Cancer* 11: 338-351, 2011)。肝細胞癌と Notch シグナルの関連については、Notch1 または Notch2 細胞内ドメインの過剰発現マウスの解析から、Notch シグナルの活性化が肝細胞癌に対して、促進的に作用することが示唆されている (*Hepatology* 3: 942-952, 2015)。しかし、ノックアウトマウスによる解析の報告が極めて少ないうえ、肝細胞癌進展に関わる Notch リガンド/受容体の選択は未だ明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、肝細胞癌の進展における Notch リガンド/受容体の機能的差異を明らかにし、「肝細胞癌の進展抑止」と「線維肝の再生促進」を同時に可能とする治療法の開発基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

3 週齢のマウスに diethylnitrosamine (DEN) を投与し、肝細胞癌を誘発させた。また、Dil4-flox マウスに対して、肝細胞特異的に Cre recombinase を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV8) を 8 週齢で投与し、後天的かつ肝細胞特異的に Dil4 を欠損させた Dil4-HepKO マウスを作製した。さらに、Jag1-flox マウスに Mx-Cre マウスをかけ合わせ、Mx-Cre/Jag1-flox (Jag1-MxKO) マウスを作製した。同マウスに polyI:C を 8 週齢で投与し、後天的に Jag1 遺伝子を欠損させた。次に、Notch 受容体による Notch シグナルの差異を検討するため、Notch1, Notch2 それぞれの細胞内ドメインを過剰発現するアデノ随伴ウイルス (AAV8) を作製し、野生型マウスへ投与し、肝臓の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにて解析した。

## 4. 研究成果

DEN 投与から 10 か月後のマウスにおいて、肝表面に腫瘍の形成が認められた。同肝細胞癌組織において、Notch シグナルの下流因子 Hes1 が肝癌細胞の細胞核に認められた。また、Hes1 遺伝子の発現量は Dil4 遺伝子および Jag1 遺伝子の発現量と正の有意な相関を示した (図 1)。次に、両リガンドの発現を免疫組織染色によって解析したところ、腫瘍辺縁の増殖が活発な部位 (Ki67 陽性) の肝癌細胞は Dil4 陽性・Notch1 強陽性・Hes1 強陽性で、周囲の間葉系細胞が Jag1 陰性であるのに対して、中心部へ向かうにしたがって間葉系細胞が Jag1 を発現し、肝癌細胞の Dil4・Notch1・Hes1・Ki67 発現は減弱し、Notch2 発現が増強した。(図 2)。

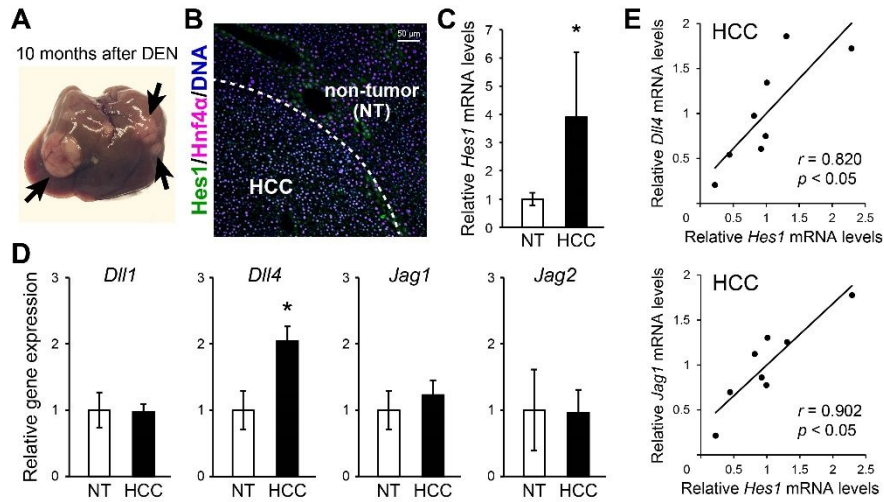


図1. DEN 誘発肝細胞癌 (HCC) における Notch リガンドの発現

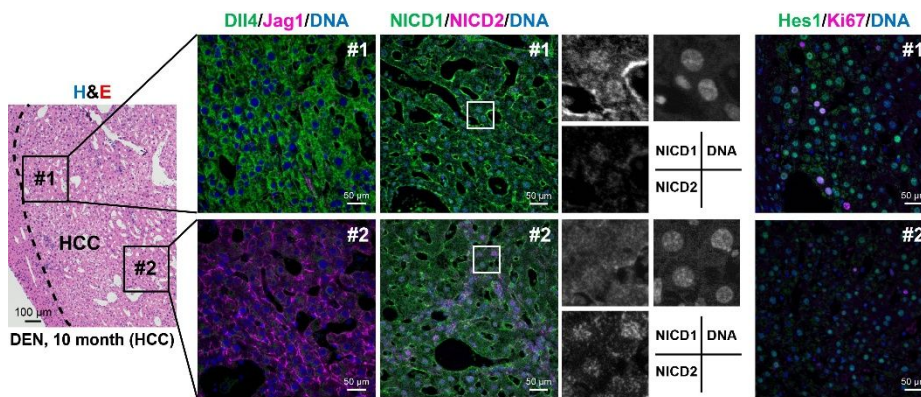


図2. 肝細胞癌における Dll4, Jag1, Notch1, Notch2 の発現

次に、Dll4-HepKO マウスでは、対照マウスと比較し、肝表面の腫瘍の個数および平均直径が有意に減少した。同組織を抗 Notch1 抗体および抗 Hes1 抗体によって免疫染色した結果、対照マウスでは肝癌細胞の核に Notch1 および Hes1 の発現が認められたのに対して、Dll4-HepKO マウスでは Notch1 の染色性そのものが顕著に低下し、Hes1 の発現は認められなかった (図3)。

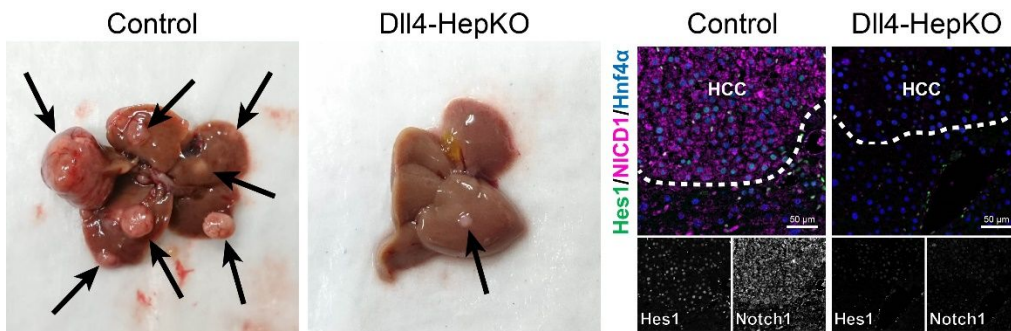


図3. 肝細胞特異的 Dll4 欠損マウスにおける肝発癌抑制

一方で、Jag1-MxKO マウスは、対照マウスと比較し、肝表面に認められる腫瘍の発生率および個数が有意に上昇していた。同肝細胞癌組織の Hes1 の発現を確認したところ、肝癌細胞に Hes1 の発現が認められた (図4)。また、Jag1 欠損により肝細胞における Notch2 の核内移行が消失し、Dll4 の異所的発現が誘導された (図5)。これらのことから、Jag1 は Notch2 シグナルを活性化させることで、Dll4-Notch1 シグナルを抑制し、肝細胞癌の進展を抑えることが示唆された。

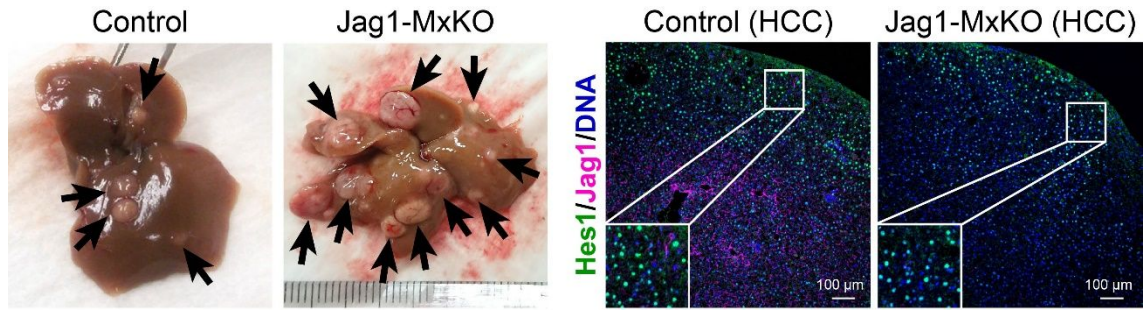


図4. 後天的 Jag1 欠損マウスにおける肝癌進展の促進

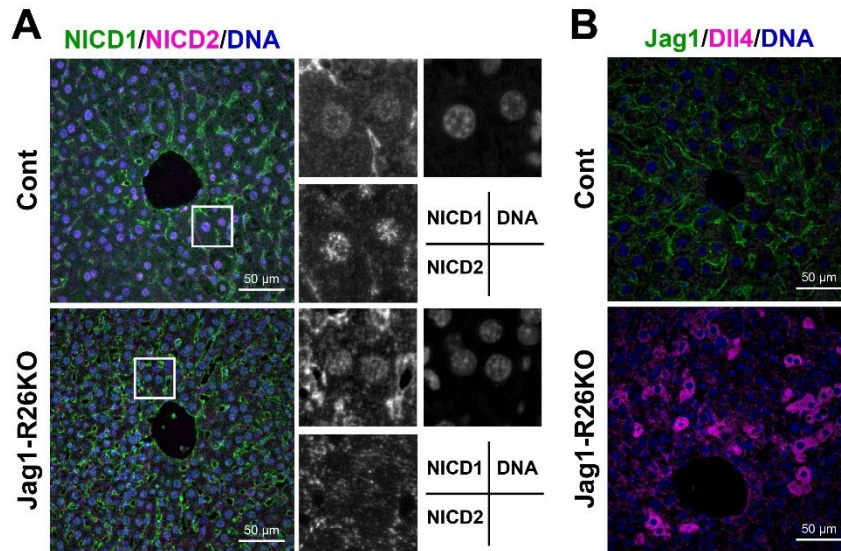


図5. Jag1 欠損による Notch2 シグナルの消失と肝細胞における Dll4 の異所的発現誘導

これらの結果を受け、Notch1 シグナルと Notch2 シグナルの機能的差異について検討した。AAV8 による Notch1 および Notch2 の肝細胞への過剰発現の結果、Notch1 の過剰発現は *Cdk1* などの細胞増殖関連遺伝子の発現を上昇させ、Notch2 の過剰発現は *Cdkn1a* などの細胞増殖抑制遺伝子の発現を上昇させることを見出した。さらに、Notch1 と Notch2 の両方を過剰発現させた肝臓では、*Cdk1* の発現は対照マウスと同等の発現量を示す一方で、*Cdkn1a* の発現は顕著に増加した (図6)。

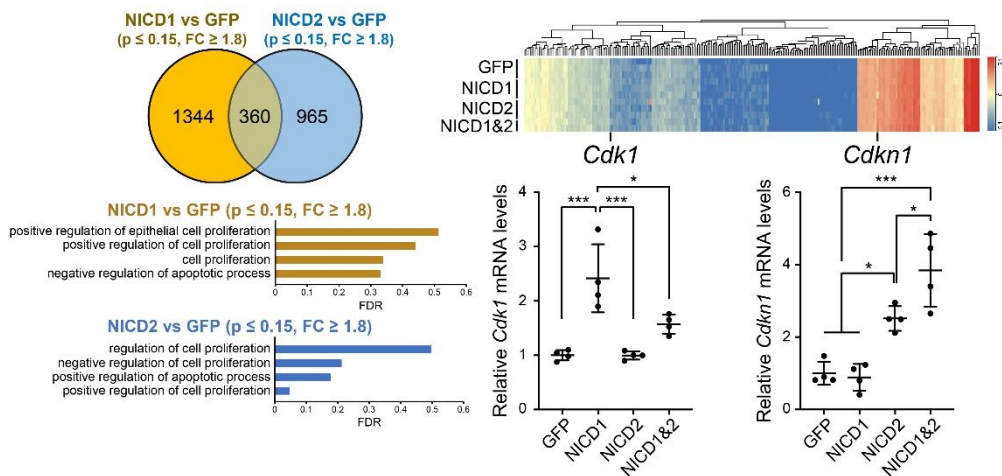


図6. Notch1 および Notch2 の細胞内ドメイン (NICD1, NICD2) の肝細胞への過剰発現による遺伝子発現変化

以上のことから、肝細胞癌進展に対して、肝癌細胞に発現する Dll4 は肝癌細胞自身の Notch1 シグナルを活性化することで促進的に作用し、間葉系細胞に発現する Jag1 は肝癌細胞の Notch2 シグナルを活性化させることで抑制的に作用することが明らかとなった。Jag1-Notch2 シグナルは線維肝の再生を促進することから、Dll4 と Jag1 の機能的差異を制御することによる「肝細胞癌の進展抑止」と「線維肝の再生促進」を同時に可能とする分子標的薬の開発など治療アプローチを提唱した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano Yasuhiro, Kamiya Akihideo, Sumiyoshi Hideaki, Tsuruya Kota, Kagawa Tatehiro, Inagaki Yutaka	4. 巻 71
2. 論文標題 A Deactivation Factor of Fibrogenic Hepatic Stellate Cells Induces Regression of Liver Fibrosis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1437 ~ 1452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.30965	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 Kamimoto Kenji, Nakano Yasuhiro, Kaneko Kota, Miyajima Atsushi, Itoh Tohru	4. 巻 3
2. 論文標題 Multidimensional imaging of liver injury repair in mice reveals fundamental role of the ductular reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-1006-1	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 Wu Raymond, Pan Stephanie, Chen Yibu, Nakano Yasuhiro, Li Meng, Balog Steven, Tsukamoto Hidekazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Fate and functional roles of Prominin 1+ cells in liver injury and cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76458-8	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 該当する
1. 著者名 Omori Satotaka, Wang Teh-Wei, Johmura Yoshikazu, Kanai Tomomi, Nakano Yasuhiro, et al.	4. 巻 32
2. 論文標題 Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16high Cells In?Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 814 ~ 828.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2020.09.006	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 Kasahara Daigo, Sumiyoshi Hideaki, Endo Hitoshi, Yanagawa Takayo, Nakano Yasuhiro, Matsuki Yuki, Nakao Sachie, Kamiya Akihide, Kimura Hiroshi, Inagaki Yutaka	4. 巻 528
2. 論文標題 Visualization and isolation of zone-specific murine hepatocytes that maintain distinct cytochrome P450 oxidase expression in primary culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 420 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.202	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Nakano Yasuhiro, Kamiya Akihide, Sumiyoshi Hideaki, Tsuruya Kota, Kagawa Tatehiro, Inagaki Yutaka
2. 発表標題 Regression of Liver Fibrosis Induced by a Novel Deactivation Factor of Fibrogenic Hepatic Stellate Cells
3. 学会等名 AASLD Liver Meeting 2019 (アメリカ肝臓病学会2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakano Yasuhiro, Kamiya Akihide, Sumiyoshi Hideaki, Tsuruya Kota, Kagawa Tatehiro, Inagaki Yutaka
2. 発表標題 A novel deactivation factor of fibrogenic hepatic stellate cells induces regression of liver fibrosis.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Conferences Asia. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakano Yasuhiro, Kamiya Akihide, Sumiyoshi Hideaki, Tsuruya Kota, Kagawa Tatehiro, Inagaki Yutaka
2. 発表標題 Treatment Strategy for Liver Fibrosis Using a Novel Deactivation Factor of Fibrogenic Hepatic Stellate Cells.
3. 学会等名 JSH-International Liver Conference 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 泰博、住吉 秀明、稲垣 豊
2. 発表標題 肝癌進展におけるNotchシグナルの意義と治療戦略
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会・パネルディスカッションPD8-4
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 泰博、伊藤 暢、宮島 篤、穂積 勝人、稲垣 豊
2. 発表標題 肝癌におけるNotchリガンドのDll4とJag1の相反する機能
3. 学会等名 第33回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 泰博、紙谷 聡英、稲垣 豊
2. 発表標題 細胞リプログラミングによる活性化星細胞の静止期転換を介した肝線維化治療法の開発
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 中野泰博、紙谷聡英、住吉秀明、稲垣 豊
2. 発表標題 肝星細胞の運命決定因子による活性化星細胞の静止期転換と肝線維症治療への応用
3. 学会等名 第25回 肝細胞研究会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Yasuhiro Nakano, Hideaki Sumiyoshi, Akihide Kamiya, Yutaka Inagaki
2. 発表標題 Treatment Strategy of Liver Fibrosis Using Novel Reprogramming Factor(s) of Fibrogenic Hepatic Stellate Cells
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)- Liver meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野泰博、穂積勝人、稲垣 豊
2. 発表標題 肝細胞癌におけるNotchリガンドのJag1とDll4の相反する機能
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会 年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 泰博、中尾 祥絵、住吉 秀明、三上 健一郎、丹野 友里、末岡 美那子、笠原 大瑚、茂呂 忠、紙谷 聡英、穂積 勝人、稲垣 豊
2. 発表標題 活性化星細胞・成熟肝細胞間のJag1/Notch2シグナルによる肝前駆細胞の動員と線維肝再生への寄与
3. 学会等名 第50回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 泰博, 稲垣 豊
2. 発表標題 肝星細胞の脱活性化誘導因子による肝線維症の治療戦略
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Notchリガンド・受容体の機能的差異による肝癌進展の制御機構
2. 発表標題 中野 泰博, 伊藤 暢, 宮島 篤, 稲垣 豊
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 肝星細胞による肝再生ニッチ構築の分子機構
2. 発表標題 中野 泰博, 住吉 秀明, 稲垣 豊
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中野 泰博, 稲垣 豊	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株)ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「細胞」 / 【肝星細胞活性化と肝硬変・肝がん】肝星細胞の脱活性化機構と肝線維化治療への応用	

1. 著者名 中野 泰博, 稲垣 豊	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学 / 【線維化 慢性疾患のキープロセス 多彩な間質細胞が織りなす組織リモデリング"fibrosis"の理解】(第1章)線維芽細胞の多様性 肝星細胞の活性化・脱活性化機構と肝線維症治療への展望	

1. 著者名 中野 泰博	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版(株)	5. 総ページ数 7
3. 書名 医学のあゆみ / 【臓器線維症を科学する-病態解明と治療法開発への展望】分子細胞基盤 コラーゲン産生細胞の形質転換による臓器線維症治療への応用	

〔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

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
---------	---------