

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17405

研究課題名(和文) 酸化DNA傷害修復酵素欠損マウスを用いたNASH肝発癌機序の解明および治療応用

研究課題名(英文) Elucidation of NASH hepatocarcinogenesis mechanism and therapeutic application using oxidative DNA damage repair enzyme-deficient mice

研究代表者

田中 信悟 (Tanaka, Shingo)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60561024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは酸化DNA傷害修復酵素MUTYH欠損マウスに高カロリー・高酸化ストレスを負荷した新規NASHモデルマウスを作成した。本研究は同マウスの評価および新規抗酸化療法の開発を目的とした。高脂肪、高コレステロール食+鉄過剰食(HFHC+Fe)を給餌したマウスの肝組織内に酸化ストレスの指標とされる4-HNEおよび8-OHdG量の増加を認めた。MUTYH-nullマウスにHFHC+Feを給餌したところ25%のマウスに肝腫瘍を認めた。遺伝子発現を比較したところ、ヒトの肝細胞癌で比較的高頻度に認められるWnt/cateninシグナル異常の関与が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスモデルとヒトの類似性を考える上で、NASHをメタボリック症候群の肝臓部分症として捉えることが重要視され、肥満やインスリン抵抗性を示さないマウスモデルの使用が減少している。例として、メチオニン・コリン欠乏食モデルは従来広く使用されてきたが、体重減少、低血糖、低インスリン血症を呈するなど、メタボリック症候群と正反対の表現型を呈する。ヒトのファストフードに類似した食餌を与え肥満となり、かつ酸化ストレス負荷を与えることで肝発癌をきたす本マウスは、これまで報告されたマウスの様々な問題点を解決できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The applicants established a new NASH model mouse created by loading high-calorie and high-oxidative stress on oxidative DNA injury repair enzyme (MUTYH)-deficient mice. The purpose of this study was to evaluate this mice and to develop a novel antioxidant therapy. Increased levels of 4-HNE and 8-OHdG, which are indicators of oxidative stress, were observed in the liver tissue of mice fed a high-fat, cholesterol and iron-rich diet(HFHC+Fe). When MUTYH-null mice were fed with HFHC+Fe, 25% of the mice showed liver tumors. Comparison of gene expression revealed that Wnt/catenin signaling, which is relatively frequent in human hepatocellular carcinoma, is involved.

研究分野：消化器病学，肝臓病学，NASH，酸化ストレス

キーワード：NASH NAFLD MUTYH モデルマウス 鉄過剰

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化などにより、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の患者数は増加の一途をたどり、本邦での有病率は検診受診者の約 30% と言われている。NAFLD の多くは非アルコール性脂肪肝 (NAFL) であるが、その約 10~20% を占める非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は肝硬変・肝細胞癌へと進行する病態であり、その治療法開発は急務とされている。NASH の治療法として食事療法や運動療法が有効と報告されているが、確立された治療プロトコールは存在しない。薬物療法については糖尿病などの症例に対して基礎疾患に準じた治療が推奨されているが、評価の定まったものはない。抗酸化療法のうちビタミン E の有効性が報告されているが、長期投与で骨粗鬆症などのリスクが増大するとの報告もある。

申請者は NASH 症例の半数以上の肝組織に鉄が過剰沈着すること、肝における鉄過剰の原因が IRP1 の活性増強による十二指腸鉄トランスポーター DMT1 の発現上昇にともなう鉄吸収亢進であること、さらに preliminary ながら抗酸化療法としての除鉄療法が NASH 進行阻止に有効であることを報告した (Hepatology 2015)。

一般に、ヒト疾患の治療研究には動物モデルが必須であり、資するところは大きい。NASH 動物モデルについてもジェネティックモデル、食餌性モデル、両方を組み合わせたモデルなど数多く報告されている。しかし、ヒト NASH は多様な背景因子を有する疾患であり、その病態を完全に模倣する動物モデル作成は困難とされ、このことが治療法開発の進まない原因と考えられている。以上から、緊急課題とされるヒト NASH の治療法開発には、目的に応じてそれぞれに長所・短所がある病態モデル動物を使い分ける必要があり、そのためには新規機序を有する NASH 動物モデルの開発が必須と考えられる。

持続炎症に起因する発癌過程には、活性酸素 (ROS) による酸化的 DNA 傷害が関与する。特に ROS により生じたグアニン残基の 8-オキシ体 (8-OHdG) などが DNA 変異を引き起こすと推定されている。DNA 中に蓄積した 8-OHdG が修復されないと、突然変異を引き起こすことで細胞の癌化の原因となる。MUTYH はアデニン:8-OHdG 誤対合からアデニンを切除することで突然変異の生成を回避する酵素であり、MUTYH 酵素活性の低下した個体では、発癌の危険が高いものと予測される。

申請者は MUTYH 酵素活性と肝発癌の関係について研究を進める中で、鉄過剰食を MUTYH ホモ欠損 (Mutyh^{-/-}) マウスに与えた結果、高率に肝発癌することを確認し、さらに抗酸化剤 (N-acetylcysteine, NAC) の投与による発癌抑制効果を報告した (Free Radic Biol Med 2018)。また、申請者は NASH を背景とする肝細胞癌患者に 8-OHdG が増加していることを明らかにしたこと (J Gastro 2013)、Mutyh^{-/-} マウスに NASH を惹起する食餌を与えることで、肝発癌をきたす NASH モデルマウスが作成できると考えた。

2. 研究の目的

NASH 肝発癌における酸化的 DNA 傷害修復酵素 MUTYH の関与について着目し、MUTYH 欠損マウスに高カロリー・高酸化ストレスを負荷して作成される新規 NASH マウスの評価および新規抗酸化療法の開発を目的とする。そのために、次のことを明らかにしていく。

- ・作成した新規 NASH モデルマウスのヒト NASH との類似性
- ・抗酸化剤による NASH の治療効果および肝発癌抑制効果

3. 研究の方法

(1) マウスと介入

樹立された MUTYH null mice と C57BL/6 mice を交配させ、野生型 (Mutyh^{+/+}) マウス、MUTYH ヘテロ欠損 (Mutyh^{+/-}) マウス、および MUTYH ホモ欠損 (Mutyh^{-/-}) マウスを得て、SPF 環境で飼育した。8 週齢のマウスに、コントロール食 (鉄含有量 45mg/kg・diet)、高脂肪高炭水化物 (high-fat high-carbohydrate : HFHC) 食、HFHC+鉄過剰食 (鉄含有量 225mg/kg・diet) を与えた。また、発癌率が最も高い群に対して抗酸化薬である N-アセチル-L-システイン (NAC) を追加投与した。介入 9 か月後に採血を行い、全血算・ALT を測定し解剖を行った。

(2) 肝臓鉄濃度

肝組織を 120°C で 24 時間乾燥させ、加熱しながら硝酸および硫酸を加えて溶解した後脱イオン水で希釈し、3000rpm で 10 分間遠心分離した後、原子吸光分析計 (AAAnalyst 800, Perkin Elmer, Norwalk, CT) を用いて測定した。

(3) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソントリクローム (MT) 染色

パラフィン固定された肝組織に対して HE 染色および MT 染色を施行した。Brunt らの報告に基づき肝組織の脂肪化、小葉内炎症および線維化のスコアリングを行った。

(4) 肝内 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) 染色と半定量

パラフィン固定された肝組織に対して抗 4-HNE 抗体 (MHN-020P, 日本老化制御研究所, 日本) を用いて免疫染色を施行した。半定量については、Paradis らの報告に基づき、1 視野あたりの染色性を 0-3 の 4 段階で評価し、数値化した。各標本について、ランダムで 5 視野を評価し平均値を解析に用いた。

(5) 肝内 8-OHdG 免疫染色と定量法

パラフィン固定された肝組織に対して抗 8-OHdG 抗体(MOG-020P, 日本老化制御研究所, 日本)を用いて免疫染色を施行した. 定量については肝細胞内の核の染色程度についてKS-400 システム(Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbermoss, Germany)を用いて数値化し, normal mouse IgG との比を相対的免疫染色強度とした. 各標本において少なくとも 3 視野以上で測定を行い, その平均値を解析に用いた.

(6) マイクロアレイ解析

肝腫瘍を発生しなかった *Mutyh*^{+/+} HFHC+鉄過剰食群と肝腫瘍を発生した *Mutyh*^{-/-} HFHC+鉄過剰食群 3 匹ずつの背景肝についてマイクロアレイ分析を行った. RNA の抽出には RNeasy Lipid Tissue Mini Kits (QIAGEN, Hilden, Germany)を使用し, トランスクリプトーム解析には GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0, Affymetrix, Santa Clara, CA)を使用した. その後, differentially expressed genes (DEGs) の解析と Gene set enrichment analysis (GSEA) によるパスウェイ解析を行った.

4. 研究成果

(1) Mice への HFHC 食および HFHC+鉄過剰食の給餌による肝障害, 鉄過剰

体重, 血清 ALT 値は HFHC 食群および HFHC+鉄過剰食群においてコントロール食群と比較して増加していた. また, 肝内鉄濃度は HFHC 食群ではコントロール食群と同様であり, HFHC+鉄過剰食群においてコントロール食群と比較して有意に増加していた.

(2) 肝臓の組織学的所見

HFHC 食を給餌した群 (HFHC 食群および HFHC+鉄過剰食群) において, 優位な肝脂肪化, 炎症反応, 肝細胞のバルーニングが認められた. 肝組織の脂肪化, 小葉内炎症および線維化のスコアリングにおいても, HFHC 食を与えた群におけるスコアが有意に高かった. ジェノタイプ間での差は認められなかった.

(3) HFHC+鉄過剰食による肝発癌 (図 1)

Mutyh^{-/-} HFHC+鉄過剰食群において 20 匹中 5 匹 (25%) に肝腫瘍が認められ, 肝腫瘍の発生割合は *Mutyh*^{+/+} HFHC 食群や *Mutyh*^{-/-} HFHC 食群と比較して有意に高率であった. また, *Mutyh*^{-/-} HFHC+鉄過剰食群に NAC を追加投与すると, 肝腫瘍の発生割合はおおよそ半分となった.

(4) Mice における肝内 4-HNE と 8-OHdG 量の解析

脂質過酸化の指標である 4-HNE について, HFHC 食群においてはコントロール食群と比較して有意に増加しており, HFHC+鉄過剰食群においては HFHC 食群と比較して有意に増加していた. *Mutyh*^{-/-} HFHC+鉄過剰食群において腫瘍発生の有無では, 4-HNE の評価に差は認められなかった. HFHC 食群においてはコントロール食群と比較して有意に 8-OHdG 染色強度が増強しており, HFHC+鉄過剰食群においては HFHC 食群と比較して有意に 8-OHdG 染色強度が増強していた (図 2). *Mutyh*^{-/-} HFHC+鉄過剰食群において腫瘍発生の有無では, 染色強度に差は認められなかった.

(5) DEGs と GSEA (表 1)

MUTYH 欠損マウスの肝組織において, 免疫グロブリン関連遺伝子と *Myc* mRNA が高い発現が認められた. またパスウェイ解析では, コレステロール代謝, インターロイキン-2/STAT5 経路, Wnt/ β カテニン経路と apical junction に関連する経路の異常が認められた.

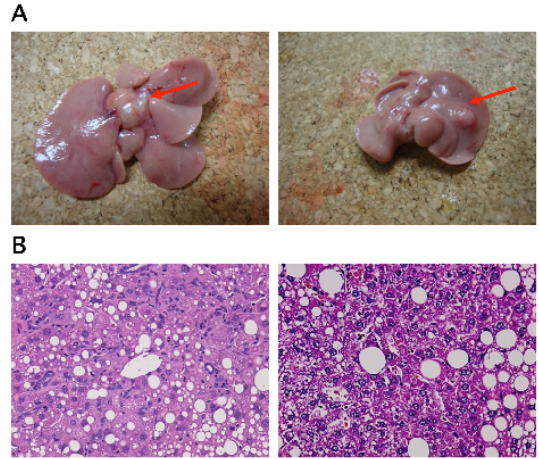


図 1

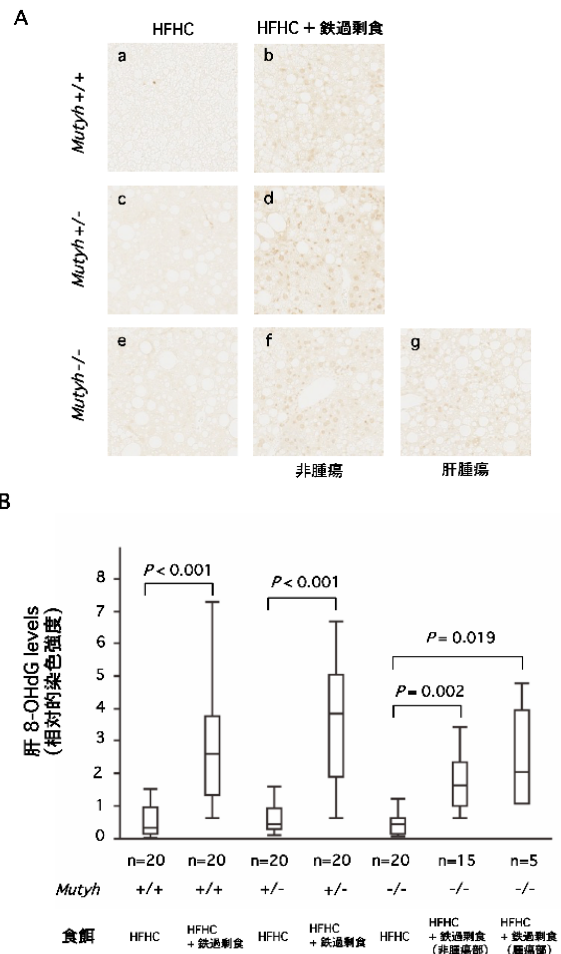


図 2

表 1. GSEA 結果

	NES	NOM p-value	FDR q-value
Hallmark cholesterol homeostasis	-1.634014	0.000000	0.144963
Hallmark Wnt/ β catenin signaling	1.387922	0.000000	1.000000
Hallmark apical junction	1.378887	0.000000	1.000000
Hallmark IL2 STAT5 signaling	1.356143	0.000000	0.906580

MUTYH^{-/-}マウスにおいて 18 か月で小腸腫瘍の自然発生が報告されているが、肝腫瘍についての報告はない。我々の以前の研究では *Mutyh*^{-/-}に鉄過剰食を給餌すると 12 か月で約 1/3 のマウスに肝腫瘍が認められた。本研究では介入 9 ヶ月の時点で MUTYH 欠損マウスに肝腫瘍が認められ、鉄過剰食のみよりも早期の肝腫瘍の発生が確認された。肝腫瘍が発生したマウスの割合は *Mutyh*^{-/-} HFHC+鉄過剰食群で最大であり、酸化ストレスと MUTYH 欠損が肝腫瘍の発生に寄与していると考えた。

これまでに NASH モデルマウスに関しては多くの報告があるが、ヒト NASH の疾患プロセスを忠実に再現したモデルは少数である。NASH モデルマウスのメタボローム解析やトランスクリプトーム解析により、ヒトの NASH を最もよく反映しているモデルは HFD マウスであると考えられているが、このマウスでは肝発癌が認められない。また肝腫瘍が発生する NASH モデルマウスについては様々な報告があるが、STAM マウスや MCD マウスなど異常な代謝により、体重減少を認めるモデルもある。以上のヒト NASH との類似性や肝腫瘍発生の観点から、我々が作製した NASH マウスモデルは NASH 関連肝腫瘍を調査するモデルとして適切であると考えた。

肝腫瘍は MUTYH 関連大腸癌患者の特徴的な腫瘍スペクトラムには属していない。しかし、MUTYH 変異と肝腫瘍の関連についての報告はある。Baudhuin らは HCC および胆管細胞癌患者の MUTYH Y165C、G382 変異保有率と腫瘍を持たない患者の変異保有率を比較し、MUTYH 変異の頻度に差が認められないことを報告した。Casper らは白人の胆管細胞癌患者における MUTYH G396D と Y179D の変異を検索したが、変異の発現率に有意な差が認められなかったことを報告した。一方で Win らは incident 大腸癌症例の第一、第二血縁者の DNA を既知の MUTYH 変異と照らし合わせた結果、MUTYH 変異を有する患者は肝腫瘍の発症リスクが高いことを報告した。しかしながら、背景に慢性肝疾患を有する患者における MUTYH 変異と肝発癌の関連は不明であった。我々は以前、酸化 DNA 損傷を修復する酵素をコードする遺伝子の SNP と慢性 C 型肝炎患者の肝発癌との関連について調べた結果、MUTYH の SNP (rs3412958) の単マイナーアレルが MUTYH 発現を減少させること、さらに肝発癌の独立したリスクであることを確認した。これらの報告や本研究結果から MUTYH 活性は NASH 患者における肝発癌に関与することが示唆された。大今後、規模コホート研究などのさらなる検討がこれらの結果を証明するために必要と考える。

NAFLD 症例における鉄染色陽性の割合は、Eder らは 47%、Hoki らは 48%、Keith らは 41%、Sumida らは 68%と報告した。NAFLD 患者での鉄過剰はヘモクロマトーシスに認められる高度な鉄沈着ではなく、軽度から中等度の鉄過剰と言われている。NASH マウスモデルと人における NASH の肝内鉄沈着の違いを是正するために、軽度から中等度の鉄過剰状態を導入する目的で我々は HFHC 食による NASH モデルに鉄過剰食を加えて、肝発癌を検討した。鉄過剰食の量は Hino らの報告を基に、慢性肝疾患に認められる程度の鉄過剰状態となるように調整した。MUTYH 欠損と鉄過剰食のみでは肝腫瘍発生に介入後 12 ヶ月を要したが、今回の *Mutyh*^{-/-} NASH マウスモデルでは介入 9 ヶ月に約 1/4 の割合で肝腫瘍が発生した。これらの結果からは、肝内鉄過剰を伴う NASH 患者においては過剰な鉄と MUTYH 欠損が肝発癌のリスクを高める可能性があると考えた。また NAC 投与のデータから抗酸化薬による NASH からの発癌予防の可能性が示された。

本研究では肝発癌を認めた *Mutyh*^{-/-}マウスと肝発癌を認めない *Mutyh*^{+/+}マウスの非癌部での遺伝子発現を比較するため、マイクロアレイ解析を行った。GSEA では、Wnt/ β カテニンシグナル経路が特定され、Wnt シグナルのターゲット遺伝子である *Myc* が DEGs の 1 つとして同定された。HCC の 20-30%に CTNNB1 遺伝子変異が認められること、また MUTYH 欠損マウスに発生した小腸腫瘍においても *Ctnnb1* 変異が有意に増加していることから、MUTYH 欠損により誘導される腫瘍においては原発臓器に関わらず Wnt/ β カテニンシグナル経路が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 1件）

1. 著者名 Sakamoto H, Miyanishi K, Tanaka S, Ito R, Hamaguchi K, Sakurada A, Sato Mi, Kubo T, Osuga T, Murase K, Takada K, Nakabeppu Y, Kobune M, Kato J	4. 巻 11
2. 論文標題 MUTYH is associated with hepatocarcinogenesis in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model	5. 発行年 2021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/s41598-021-83138-8	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 -
1. 著者名 Miyanishi K, Tanaka S, Sakamoto H, Kato J	4. 巻 133
2. 論文標題 The role of iron in hepatic inflammation and hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med	6. 最初と最後の頁 200-205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.006.	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 田中信悟, 宮西浩嗣, 加藤淳二	4. 巻 84
2. 論文標題 非アルコール性脂肪肝炎 - 鉄吸収亢進の観点から -	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 459-464
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 無
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 宮西浩嗣, 櫻田晃, 坂本拡基	4. 巻 84
2. 論文標題 酸化的DNA損傷修復酵素遺伝子の一塩基多型と肝細胞癌	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 485-490
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 無
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本拓基、宮西浩嗣、加藤淳二
2. 発表標題 酸化了的DNA傷害修復酵素欠損マウスを用いた脂肪性肝疾患からの肝発癌機序の検討
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 坂本拓基、宮西浩嗣、伊藤亮、濱口孝太、久保智洋、大須賀崇裕、田中信悟、大沼啓之、村瀬和幸、高田弘一、加藤淳二
2. 発表標題 NASHからの肝発癌における酸化了的DNA傷害修復酵素の関与
3. 学会等名 第106回消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本拓基、宮西浩嗣、田中信悟、大須賀崇裕、村瀬和幸、高田弘一、加藤淳二
2. 発表標題 NASHモデルマウスを用いた、DNA傷害修復酵素MUTYHの肝発癌への関与の検討
3. 学会等名 第55回肝臓学会総会
4. 発表年 2019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
研究協力者	加藤 淳二 (Kato Junji)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	宮西 浩嗣 (Miyanishi Koji)		
研究協力者	坂本 拡基 (Sakamoto Hiroki)		

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