

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590775

研究課題名（和文） 肝臓発症進展過程における低アディポネクチン血症の意義に関する研究

研究課題名（英文） Role of adiponectin in the development of liver cancer

研究代表者

吉田 雄一 (YOSHIDA YUICHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30457014

研究成果の概要（和文）：近年、内臓脂肪蓄積を基盤とするメタボリックシンドロームが、肝発症のリスクを増加させることが報告されている。アディポネクチンはメタボリックシンドローム発症に抑制的に働く善玉のアディポサイトカインであるが、肝発症における直接的な抗腫瘍作用は明らかではない。今回、アディポネクチン欠損マウスを用いた肝腫瘍モデルにおいて、アディポネクチン欠損が移植肝腫瘍の増殖を促進させることが明らかとなった。以上より、肝臓において、アディポネクチンが抗腫瘍作用を有している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, the metabolic syndrome, a cluster of metabolic disorders often associated with visceral obesity, is reported to increase the risk of hepatocarcinogenesis. Although adiponectin is a plasma protein secreted from adipose tissue with known anti-diabetic and anti-atherogenic properties, its role in the development of liver cancer has remained unclear. In our current study, we investigated the growth of the transplanted liver tumors in the adiponectin knock out (KO) mice and demonstrated that KO mice showed the increased proliferation of liver tumors. These data indicated the possible anti-tumor role of adiponectin in the development of liver cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝発症、メタボリックシンドローム、アディポネクチン

## 1. 研究開始当初の背景

（1）近年、生活習慣の欧米化に伴う運動不足と過栄養により肥満症が増加しており、内臓脂肪の蓄積を基盤としたメタボリックシンドロームが大きな問題となっている。メタボリックシンドロームの肝での表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患

(nonalcoholic fatty liver disease :NAFLD) は肝硬変から肝細胞癌に進展することが明らかになっているが、肝細胞癌への進展の分子メカニズムは明らかになっていない。

（2）脂肪組織は、近年の研究により多くの分泌蛋白、アディポサイトカインを発現して

いることが明らかになり、これらアディポサイトカインの分泌異常がメタボリックシンドロームの様々な病態に関わっていることが明らかになっている。

(3) アディポネクチンはメタボリックシンドローム発症に抑制的に働く善玉のアディポサイトカインであり、肥満患者において血中濃度が低下し、内臓脂肪量と顕著な逆相関を呈する。また、肝臓において、アディポネクチンはインスリン感受性増強作用、抗炎症作用、脂肪酸酸化促進作用、脂肪酸合成抑制作用を有している。

(4) 私共は、これまでアディポネクチンの産生低下が NAFLD の発症・進展に促進的に働くことを、マウスモデルを用いて証明してきた。この過程で、アディポネクチン欠損が、マウス脂肪肝モデルにおいて早期の肝脂肪化及びそれに引き続く肝腫瘍形成に促進的に働くことが明らかになった。以上の結果より、アディポネクチンが直接的な抗肝腫瘍作用を有している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、アディポネクチンの直接的な抗肝腫瘍作用を検証するために、アディポネクチン欠損マウスを用いた肝腫瘍モデルを用いて低アディポネクチン血症と肝発癌について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) アディポネクチンの肝臓における酸化ストレスに与える影響を検証するために、マウス NASH/NAFLD モデルとして methionine-choline 欠乏 (MCD) 食による肝障害モデルを用いた。方法としては、アディポネクチン欠損 (KO) マウスに、MCD 食を与え、2週間後の酸化ストレスマーカーを測定した。対照には、WT マウスとして C57BL6J マウスを用いた。

(2) アディポネクチンによる肝臓における抗腫瘍効果を検証するために、マウス大腸癌細胞株細胞株を用いた肝転移モデルを用いた。KO マウスに大腸癌細胞株 MC-38 を脾臓経由で投与し、3週間後における肝臓での腫瘍形成を転移の有無を肝重量及び肝腫瘍数を評価した。対照には、WT マウスとして C57BL6J マウスを用いた。また、脾臓での腫瘍増殖も検討するために脾重量及び脾腫瘍径も両群で比較検討した。

(3) (2) の検討をさらに、①脾臓経由で投与直後に脾摘 (脾注+脾摘)、あるいは②肝臓に直接注射する (肝注) を行い、3週間後における肝臓での腫瘍形成を転移の有無

を肝重量及び肝腫瘍数・体積を評価した

## 4. 研究成果

### (1)

①MCD食投与下で KO マウスではWTマウスに比べ肝の脂肪化、炎症、線維化が進行していた。また TBARS が上昇し、GSH が低下していたことから酸化ストレスが増大していることがわかった。さらに KO マウスでは肝の catalase および superoxide dismutase (SOD1) とその上流の PPAR $\alpha$  および PPAR $\alpha$  の別の標的遺伝子である carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-I) の遺伝子発現が低下し肝の ROS 消去能低下と脂肪酸 $\beta$ 酸化能の低下が示唆された。

②MCD食投与下で KO マウスにおけるアデノウイルスによるアディポネクチン過剰発現はコントロールアデノウイルス発現に比べ肝の脂肪化、炎症、線維化が抑制され、さらに酸化ストレスの増大も抑制された。またこれらのマウスでは catalase, PPAR $\alpha$ , および CPT-I の遺伝子発現が布嚢に上昇していたこれらの結果より、アディポネクチンは、NASH/NAFLD 進行過程における酸化ストレス増大を負に制御していることが判明した。

### (2)

①KO マウスでは、WT マウスに比し、腫瘍移植後の肝重量では差がなかったが (1.595 $\pm$ 0.41g vs 1.853 $\pm$ 0.15g: WT vs KO) 個々のマウスにおける腫瘍数 (1mm 以上) は、WT マウスに比し KO マウスにおいて有意に増加していた。(6 $\pm$ 6.22 個 vs 16.25 $\pm$ 4.79 個: WT vs KO,  $p < 0.05$ )

②移植後の脾重量は、両群間で差を認めなかったが (2.805 $\pm$ 1.51g vs 3.52 $\pm$ 0.38g: WT vs KO) また、脾腫瘍径では WT マウスに比し KO マウスにおいて有意に増大していた。(17.8 $\pm$ 2.6g vs 23.5 $\pm$ 1.7g: WT vs KO,  $p < 0.05$ ) これらの結果より、肝臓においてアディポネクチンが抗腫瘍効果を持つ可能性が示唆された。

### (3)

①脾注+脾摘モデルにおいては、KO マウスでは、WT マウスに比し、腫瘍移植後の肝重量が有意に低下していた。(1.67 $\pm$ 0.38g vs 0.95 $\pm$ 0.35g: WT vs KO,  $p < 0.001$ ) また、腫瘍数 (1mm 以上) も有意に減少していた。(12.0 $\pm$ 4.4 個 vs 2.7 $\pm$ 3.1 個: WT vs KO,  $p < 0.05$ )

②肝注モデルにおいては、KO マウスでは、移植後の肝重量は、(1.597 $\pm$ 0.133g vs 1.097 $\pm$ 0.112g: WT vs KO,  $p < 0.001$ ) また、肝腫瘍体積が有意に減少していた。(382 $\pm$ 128 mm<sup>3</sup> vs 78 $\pm$ 63 mm<sup>3</sup>: WT vs KO,  $p < 0.05$ ) これらの結果より、脾注モデルと違

い、脾注+脾摘モデル及び肝注モデルでは、アディポネクチンは肝腫瘍増大を促進している可能性が示唆された。

以上(1) - (3)をまとめると、アディポネクチンは移植肝腫瘍モデルにおいて、抗腫瘍作用を有している可能性が示唆された。その分子機構として、アディポネクチンの酸化ストレス抑制作用の関与も示唆された。また、異なった移植モデルによっては、アディポネクチンが腫瘍増大促進作用も有している可能性も示唆され、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Inoue Y, Kiso S, 他 22 人 Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *J Viral Hepat.* 2010; 17(5):336-44. 査読あり
- ② Imai Y, Kiso S, 他 12 人 Reduced risk of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in aged patients with chronic hepatitis C is limited to sustained virological responders. *J Viral Hepat.* 2010 17(3): 185-91. 査読あり
- ③ Yamada T, Watabe K, Kiso S, Tsutsui S, 他 8 人 Adiponectin deficiency enhanced the severity of cerulein-induced chronic pancreatitis in mice. *J Gastroenterol.* 2010; 45(7):742-9. 査読あり
- ④ Ogiyama H, Kiso S, Tsutsui S, 他 11 人 Lack of adiponectin promotes formation of cholesterol gallstones in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 399(3):352-8. 査読あり
- ⑤ Nishida T, Tsutsui S, 他 10 人 Phase I trial of gemcitabine dose escalation with concurrent radiotherapy for patients with locally advanced pancreatic cancer. *Pancreatol.* 2010;10(1):60-5. 査読あり
- ⑥ Kondo J, Tsutsui S, 他 13 人 Roles of double-balloon endoscopy in the diagnosis and treatment of Crohn's disease: a multicenter experience. *J Gastroenterol.* 2010 Jul;45(7):713-20. 査読あり
- ⑦ Yamamoto S, Tsutsui S, Hayashi N. Esophageal intramural pseudodiverticulosis: a rare cause of esophageal stricture. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8(7):A28. 査読あり
- ⑧ Hashizume H, Kiso S, 他 5 人 Werner syndrome as a possible cause of non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Pathol.* 2009; 62(11):1043-5. 査読あり
- ⑨ Ezaki H, Yoshida Y, Kiso S, 他 12 人 Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adiponectin knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 378(1):68-72. 査読あり
- ⑩ Kamada Y, Yoshida Y, Kiso S, 他 4 人 Transplantation of basic fibroblast growth factor-pretreated adipose tissue-derived stromal cells enhances regression of liver fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296(2):G157-67 査読あり
- ⑪ Kurokawa M, Kiso S, 他 22 人 Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis. *Hepatol Res.* 2009; 39(5):432-8 査読あり
- ⑫ Kurashige N, Kiso S, 他 17 人 Factors contributing to antiviral effect of adefovir dipivoxil therapy added to ongoing lamivudine treatment in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *J Gastroenterol.* 2009; 44(6):601-7. 査読あり
- ⑬ Kamada Y, Yoshida Y, Kiso S, 他 8 人 Visceral obesity and hypoadiponectinemia are significant determinants of hepatic dysfunction: An epidemiologic study of 3827 Japanese subjects. *J Clin Gastroenterol.* 2009; 43(10):995-1000. 査読あり
- ⑭ Nakamoto T, Watabe K, Kiso S, Tsutsui S, 他 8 人 A novel therapeutic strategy with anti-CD9 antibody in gastric cancers. *J Gastroenterol.* 2009; 44(9):889-96. 査読あり
- ⑮ Kurashige N, Kiso S, 他 20

人Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance. *J Gastroenterol.* 2009; 44(8):864-70 査読あり

- ①⑥ Fukushima J, Yoshida Y, Tsutsui S, Kiso S, 他 11 人 Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. *Hepatol Res.* 2009; 39(7):724-38. 査読あり
- ①⑦ Oze T, Yoshida Y, Kiso S, 他 25 人 Pegylated interferon alpha-2b (Peg-IFN alpha-2b) affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat.* 2009; 16(8):578-85. 査読あり
- ①⑧ Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, 他 25 人 Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat.* 2009; 16(8):586-94. 査読あり
- ①⑨ Ishii S, Watabe K, 他 7 人 Restoration of gut motility in Kit-deficient mice by bone marrow transplantation *J Gastroenterol* 2009;44(8):834-41 査読あり
- ②⑩ Kurashige N, Kiso S, 他 19 人. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatol Res.* 2008;38(5):450-6. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① Yoshida Y, Kizu T, Tsubakio M, Chatani N, Hamano M, Takemura T, Ezaki H, Kamada Y, Kiso S, Hayashi N. Gab1 scaffolding adaptor protein is required for stem/progenitor cell mediated liver regeneration in mice. (AASLD 2010 Boston, MA, USA, Hynes

Convention Center, 平成 22 年 11 月 1 日、Parallel session 口頭発表)

- ② 吉田雄一、木曾真一、林紀夫 アダプター蛋白Gab1 は、肝再生過程における肝幹/前駆細胞の増殖分化に関する (第 14 回日本肝臓学会大会、パシフィコ横浜、平成 22 年 10 月 14 日、ワークショップ 16 : 肝胆膵疾患と組織幹細胞/progenitor cell : 病態解析と治療戦略 口頭発表)
- ③ 吉田雄一、木曾真一、林 紀夫 肝再生における肝幹/前駆細胞の関与 : アダプター蛋白Gab1 の重要性について (第 46 回日本肝臓学会総会、ホテルメトロポリタン山形、平成 22 年 5 月 28 日 移植・再生医療ワークショップ 2、肝再生医学—臨床応用を目指した研究の新展開 口頭発表)
- ④ 吉田雄一、木曾真一、林 紀夫 肝幹/前駆細胞を介した肝再生におけるアダプター蛋白質Gab1 の意義 (第 96 回日本消化器病学会総会、パシフィコ横浜 平成 22 年 4 月 23 日、ワークショップ 6 消化器幹細胞研究の進歩—病態から治療へ、口頭発表)
- ⑤ Yoshida Y, Saji Y, Takemura Y, Ezaki H, Fukushima J, Kamada Y, Kiso S, Hayashi N. Gab family scaffolding adaptor proteins mediate signals required for liver regeneration through MAPK/ERK activation. (AASLD 2009 Boston, MA, USA, Hynes Convention Center, 平成 21 年 11 月 2 日、口頭発表)
- ⑥ 吉田雄一、佐治雪子、鎌田佳宏、竹村貴代、江崎久男、福島寿一、松本 仁、木曾真一、林 紀夫 肝再生及び肝不全におけるアダプター蛋白Gab1 の役割

(第 13 回日本肝臓学会大会、国立京都国際会館、平成 21 年 10 月 15 日、ポスター)

- ⑦ 吉田雄一、佐治雪子、竹村貴代、江崎久男、福島寿一、松本仁、鎌田佳宏、井倉 技、筒井秀作、木曾真一、林紀夫 Gabファミリーアダプター蛋白のマウス肝再生過程における役割の解析 (第 45 回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、平成 21 年 6 月 4 日 口頭発表)
- ⑧ 江崎久男、木曾真一、吉田雄一、佐治雪子、鎌田佳宏、松本仁、福島寿一、和田朗、井倉技、竹村貴代、木原進士、船橋徹、下村伊一郎、田村信司、林紀夫 アディポネクチン欠損マウスにおける 70% 部分肝切除後の肝再生遅延と脂肪酸代謝障害について 第 44 回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、ワークショップ、平成 20 年 6 月 6 日 口頭発表)
- ⑨ 松本仁、三善英知、木曾真一、鎌田佳宏、吉田雄一、小澤健太郎、小川智、林紀夫 分子 シ ャ ペ ロ ン Oxygen-regulated protein150 (ORP150) は肝癌細胞株において脂肪酸負荷による小胞体ストレスに起因するアポトーシスを抑制する 第 44 回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、ワークショップ、平成 20 年 6 月 6 日 口頭発表)
- ⑩ 鎌田佳宏、木曾真一、佐治雪子、吉田雄一、松本仁、福島寿一、江崎久男、竹村貴代、和田朗、田村信司、林紀夫 Adipose tissue derived stromal cells (ADSC)を用いた肝再生療法開発へ向けた検討. 第 44 回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、ワークショップ、平成 20 年 6 月 6 日 口頭発表)

[その他]

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表

吉田 雄一 (YOSHIDA YUICHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30457014

### (2) 研究分担者

木曾 真一 (KISO SHINICHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40335352

渡部 健二 (WATABE KENJI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：50379244

筒井 秀作 (TSUTSUI SYUSAKU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10359846