

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08307

研究課題名（和文）肝細胞癌における間質細胞オートファジーを介した癌微小環境の制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of regulatory mechanism of cancer microenvironment through stromal cell autophagy in hepatocellular carcinoma

研究代表者

疋田 隼人（Hikita, Hayato）

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20623044

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）：肝がん細胞は肝星細胞のオートファジーを亢進させた。また肝星細胞のオートファジー亢進は、GDF15の発現を増加させ、肝癌細胞の増殖を促進させたGDF15分泌促進を介した肝星細胞と肝がん細胞の細胞間相互作用による肝癌進展機序を明らかにした。

肝癌細胞では、STAT3の活性化によりCTGFが発現増強し分泌が亢進した。CTGFは肝星細胞、マクロファージ、類洞内皮細胞、T細胞の各種IL-6ファミリー分子の分泌を亢進させた。IL-6ファミリー分子は肝癌細胞のSTAT3を発現亢進させ、細胞増殖を亢進させた。CTGF-IL-6ファミリー分子を介した肝癌微小環境による肝癌進展機序の存在を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌微小環境による肝癌進展機序が明らかとなった。肝癌細胞だけでなく、間質細胞も肝癌の増殖に大きな影響を与えており、本研究課題の遂行で明らかとなった分子機序を治療標的とすることで、新たな肝癌治療の開発も期待される。本研究成果の社会的な意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：Hepatoma cells enhanced autophagy of hepatocytes stellate cells (HSCs). The enhanced autophagy of HSCs increased the expression of GDF15, which promoted the proliferation of hepatoma cells, indicating a mechanism of hepatocarcinoma progression through cell-cell interaction between hepatoma cells and HSCs via enhanced GDF15 secretion.

In hepatoma cells, STAT3 activation enhanced CTGF expression and secretion, and CTGF enhanced secretion of various IL-6 family molecules in HSCs, macrophages, sinusoidal endothelial cells, and T cells; IL-6 family molecules upregulated STAT3 expression and cell proliferation in hepatoma cells. We elucidated the existence of a mechanism of HCC progression by the microenvironment mediated by CTGF-IL-6 family molecules.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝癌 肝癌微小環境 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は周辺の間質細胞に影響し、自身の増殖に有利な微小環境を形成する。申請者は、肝星細胞を肝癌細胞と共培養すると、肝星細胞のオートファジーは亢進し、肝癌細胞の増殖が促進することを見出した。また、この肝星細胞のオートファジーを抑制すると、肝癌細胞の増殖促進効果は共培養実験でも共接種によるゼノグラフト実験でも減弱した。このことから、肝癌細胞と肝星細胞の間には、肝星細胞のオートファジー機構を介した相互作用機序が存在することが示唆される。

一方、肝癌の間質細胞としては、肝星細胞だけでなく、マクロファージや血管内皮細胞など様々な細胞が存在する。これらの細胞も肝星細胞と同様に肝癌微小環境の中では肝癌細胞に影響する可能性がある。

そこで申請者は、肝癌細胞が周辺細胞を介して、肝癌の微小環境を整えていると考え、本申請課題を立案した。

2. 研究の目的

本研究課題は、肝癌細胞による肝星細胞・マクロファージのオートファジー変化を介した微小環境制御機構を明らかにすることを目的とする。本研究課題の遂行により、肝癌の癌細胞と間質細胞の相互作用およびその腫瘍進展における意義が明らかとなる。本研究課題では、肝星細胞特異的なオートファジー抑制/促進マウスに発癌させて解析を行うことで、肝星細胞のオートファジーを介した多細胞間コミュニケーションが腫瘍進展に与える影響も検討する。また、星細胞以外の肝癌に存在する様々な間質細胞にも着目し、微小環境内の複雑な相互作用を紐解くことを目指す。

3. 研究の方法

< 1. 培養細胞を用いた検討 >

肝癌細胞 肝星細胞などの間質細胞

非接触培養や肝癌細胞を培養したコンディションメディウム(CM)を用いた培養実験、Transwellを用いた共培養や直接共培養による実験により、肝癌細胞が間質細胞に与える影響を検討する。

肝星細胞などの間質細胞 肝癌細胞

単独培養した肝星細胞、肝癌細胞と共培養した肝星細胞、肝星細胞と肝癌細胞と共培養したAtg7 KD肝星細胞をRNA-Seqにて網羅的な発現比較を行い、肝星細胞オートファジー依存的な腫瘍増殖促進因子の候補を明らかにする。得られた因子をそれぞれKD/ノックアウト(KO)し、肝癌細胞との共培養および共接種によるゼノグラフト腫瘍で腫瘍増殖が抑制されるか検証し、星細胞による癌細胞増殖促進作用機序を同定する。また、この機序に星細胞の活性化が関与しているかどうかを検討する。

< 2. マウスモデルを用いた検討 >

肝星細胞特異的にオートファジーが抑制される肝星細胞特異的に Atg7 欠損マウス (GFAP-Cre Atg7 fl/fl, Lrat-Cre Atg7 fl/fl) マウスを用いて、ストレプトゾトシン接種後高脂肪食負荷による NASH 発癌もしくはジエチルニトロサミン投与による化学発癌を誘導する。上記検討による候補因子を肝星細胞特異的に欠損させたマウスを作製し、NASH 発癌や化学発癌刺激を行う。形成された腫瘍径や腫瘍内遺伝子発現を比較検討し、生体における腫瘍抑制効果を明らかにする。

< 3 . 臨床検体を用いた検討 >

ヒト肝切除検体を用いて、非腫瘍部および腫瘍部に存在する肝星細胞などを二重蛍光免疫染色によって比較検討する。また、十症例程度の検体では、切除時にシングルセルに分離しシングルセル RNA-seq を行うことで、肝癌細胞、星細胞、マクロファージなど構成細胞ごとの遺伝子発現を定量的に比較検討する。

4 . 研究成果

1) 肝星細胞のオートファジーを介した肝癌促進機構の解明

肝星細胞と肝癌細胞を共培養すると肝星細胞のオートファジーは促進し、肝癌細胞の増殖が促進した。この肝星細胞による肝癌細胞増殖促進効果は、肝星細胞の Atg7 を欠損させてオートファジーを抑制すると、減弱した。肝癌細胞と肝星細胞を免疫不全マウスに共接種して作製したゼノグラフト腫瘍は、肝癌細胞だけを接種して作製したゼノグラフト腫瘍より増大速度は速く、接種する肝星細胞の Atg7 を欠損すると腫瘍増大速度は低下した。肝星細胞特異的 Atg7 欠損マウスを作製して NASH 発癌を誘導したところ、コントロールマウスに比して腫瘍個数や最大腫瘍径は有意に小さく、腫瘍部の Ki67 陽性癌細胞数も減少した。培養細胞を用いた網羅的な遺伝子発現解析の結果、肝癌細胞との共培養によって肝星細胞から GDF15 が発現増大し、肝星細胞の Atg7 を欠損させると GDF15 増大が減弱することを見出した。そこで、肝星細胞の GDF15 を欠損させて肝癌細胞と共培養すると、肝星細胞との共培養による肝癌増殖促進効果は抑制された。ゼノグラフト腫瘍でも接種する肝星細胞の GDF157 を欠損すると腫瘍増大速度は低下した。肝星細胞特異的 GDF15 欠損マウスを作製して NASH 発癌を誘導したところ、コントロールマウスに比して最大腫瘍径は有意に小さく、腫瘍部の Ki67 陽性癌細胞数も減少した。

ヒト臨床サンプルでは、非腫瘍部に比して腫瘍部で GDF15 の発現は有意に上昇していた。免疫染色にて間質細胞が GDF15 陽性となる症例は、非癌部では約 2 割であったが癌部では約 5 割と高く、GDF15 陽性の間質細胞数も癌部で有意に多かった。

以上より、肝星細胞のオートファジー亢進を介した GDF15 の発現増加は肝癌の発育進展に寄与することを明らかにした。

2) 肝癌間質細胞を介した肝癌発育進展機構の解明

肝癌で活性化が認められる STAT3 は in vitro において肝癌細胞の増殖を促進することが知られているが、in vivo における役割は明らかでない。そこで、肝癌における STAT3 活性化の機序および STAT3 が肝発癌・増大進展に及ぼす影響について肝癌微小環境に着目して検討した。

肝発癌モデルとして肝細胞特異的 Kras 変異マウスである KrasG12D マウスを用いた。同モ

デルの肝細胞において、STAT3 および connective tissue growth factor (CTGF) を欠損させた。KrasG12D マウスでは組織学的に肝細胞癌に類似した肝癌が形成され、癌部では p-STAT とその標的遺伝子、IL-6 ファミリー分子(IL-6, IL-11, LIF, OSM, CLCF1)の発現上昇を認めた。また癌部ではCTGF が高発現しており、各種 IL-6 ファミリー分子、STAT3 標的遺伝子の発現と正の相関を示した。癌組織のシングルセル RNA シークエンスにおいて、IL-6 ファミリー分子は主に肝星細胞、マクロファージ、類洞内皮細胞、T 細胞などの間質細胞が発現していた。STAT3 を肝細胞特異的に欠損した KrasG12D マウスでは癌部において p-STAT および CTGF の発現が低下し、腫瘍の増大進展が抑制された。

IL-6 ファミリー分子の刺激により肝癌細胞の p-STAT、CTGF の発現が上昇し、細胞増殖が亢進した。また CTGF の刺激により各種間質細胞において IL-6 ファミリー分子の発現が上昇した。KrasG12D マウスにおいて CTGF を肝細胞特異的に欠損させると、癌部において IL-6 ファミリー分子、p-STAT3 の発現が低下し、腫瘍の増大進展が抑制された。

ヒト肝細胞癌の scRNA-seq においても IL-6 ファミリー分子は間質細胞を中心に発現していた。The Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータベースを用いた解析において、CTGF の発現は各種 IL-6 ファミリー分子および STAT3 標的遺伝子の発現と正の相関を示した。

以上より肝癌において STAT3 は CTGF と IL-6 ファミリー分子を介した腫瘍間質反応により活性化し、肝癌の増大進展を促進する可能性が示唆された。

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 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Makino Yuki, Hikita Hayato, Kato Seiya, Sugiyama Masaya, Shigekawa Minoru, Sakamoto Tatsuya, Sasaki Yoichi, Murai Kazuhiro, Sakane Sadatsugu, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Kobayashi Shogo, Eguchi Hidetoshi, Takemura Nobuyuki, Kokudo Norihiro, Yokoi Hideki, Mukoyama Masashi, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 15
2. 論文標題 STAT3 is Activated by CTGF-mediated Tumor-stroma Cross Talk to Promote HCC Progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 99 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.09.006	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 Sakane S, Hikita H, Shirai K, Myojin Y, Sasaki Y, Kudo S, Fukumoto K, Mizutani N, Tahata Y, Makino Y, Yamada R, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T.	4. 巻 7
2. 論文標題 White Adipose Tissue Autophagy and Adipose-Liver Crosstalk Exacerbate Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.07.008.	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 Myojin Y, Hikita H, Sugiyama M, Sasaki Y, Fukumoto K, Sakane S, Makino Y, Takemura N, Yamada R, Shigekawa M, Kodama T, Sakamori R, Kobayashi S, Tatsumi T, Suemizu H, Eguchi H, Kokudo N, Mizokami M, Takehara T.	4. 巻 160
2. 論文標題 Hepatic Stellate Cells in Hepatocellular Carcinoma Promote Tumor Growth Via Growth Differentiation Factor 15 Production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology .	6. 最初と最後の頁 1741-1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.12.015.	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 Nozaki Y, Hikita H, Tanaka S, Fukumoto K, Urabe M, Sato K, Myojin Y, Doi A, Murai K, Sakane S, Saito Y, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Persistent hepatocyte apoptosis promotes tumorigenesis from diethylnitrosamine-transformed hepatocytes through increased oxidative stress, independent of compensatory liver regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83082-7.	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 Mizutani N, Hikita H, Saito Y, Myojin Y, Sato K, Urabe M, Kurahashi T, Shiode Y, Sakane S, Murai K, Nozaki Y, Kodama T, Sakamori R, Yoshida Y, Tatsumi T, Takehara T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Gab1 in livers with persistent hepatocyte apoptosis has an antiapoptotic effect and reduces chronic liver injury, fibrosis and tumorigenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	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) 10.1152/ajpgi.00370.2020.	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 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 足田隼人、竹原徹郎
2. 発表標題 癌微小環境による肝癌進展機序に着目した新規肝発癌バイオマーカー
3. 学会等名 第42回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足田隼人、加藤聖也、竹原徹郎
2. 発表標題 肝癌細胞のSTAT3活性化における間質細胞とのクロストーク
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牧野祐紀 足田隼人 竹原徹郎
2. 発表標題 慢性肝疾患における肝細胞のp53活性化による肝前駆細胞の出現と肝発癌
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 明神悠太、疋田隼人、竹原徹郎
2. 発表標題 肝星細胞と肝癌細胞の細胞間相互作用の解明
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野祐紀 疋田隼人 竹原徹郎
2. 発表標題 CTGFとIL-6ファミリー分子を介した腫瘍-間質クロストークによるSTAT3活性化と肝癌の増大進展
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 明神悠太、疋田隼人、竹原徹郎
2. 発表標題 血清GDF15はC型慢性肝疾患の新規発癌予測バイオマーカーである
3. 学会等名 第25回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 明神悠太、疋田隼人、竹原徹郎
2. 発表標題 肝癌微小環境における肝星細胞のオートファジーを介したGDF15の意義
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 明神悠太、疋田隼人、小玉尚宏、牧野祐紀、阪森亮太郎、巽智秀、溝上雅史、江口英利、竹原徹郎
2. 発表標題 肝星細胞がオートファジー依存的に分泌するGDF15は肝細胞癌の進展に寄与する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuta Myojin, Hayato Hikita, Masaya Sugiyama, Takahiro Kodama, Yuki Makino, Ryoko Yamada, Tasuku Nakabori, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Masashi Mizokami, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Hepatic stellate cell autophagy promotes HCC progression via GDF15
3. 学会等名 The Digital International Liver Congress of the European Association for the Study of the Liver (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuta Myojin, Hayato Hikita, Masaya Sugiyama, Takahiro Kodama, Yuki Makino, Ryoko Yamada, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Masashi Mizokami, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 GDF15 secreted by hepatic stellate cells accelerates HCC progression in an autophagy-dependent manner
3. 学会等名 The Liver Meeting Digital Experience (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>肝がん進展に関わる新たな分子を発見 https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2020/20201224_2</p>

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	阪森 亮太郎 (Sakamori Ryotaro) (10644685)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師 (14401)	
研究分担者	巽 智秀 (Tatsumi Tomohide) (20397699)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	

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