

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08395

研究課題名(和文) マイオカインdecorinによるNASH関連肝癌抑制効果の検討

研究課題名(英文) Effects of myokine decorin on NASH-related hepatocellular carcinoma

研究代表者

川口 巧 (Kawaguchi, Takumi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：00320177

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)：NASHは、肝硬変や肝癌の主な成因である。これまでに、我々は、マイオカインの一種であるdecorinの低下が肝癌患者の独立予後危険因子であることを明らかにしてきた。本研究の目的は、decorinがNASH関連肝癌におよぼす影響を検討することである。我々は、decorinが肝癌細胞の細胞数を減少させることを明らかにした。さらに、decorinが肝癌細胞株の代謝におよぼす影響を解析した結果、decorinはペントースリン酸経路に対して抑制的に作用することが明らかとなった。本研究により、decorinは肝癌細胞のワールブルグ効果を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、運動誘発性マイオカインであるdecorinがNASH関連肝癌に対して抑制的に作用することを明らかにしたことである。また、その機序にはペントースリン酸経路が関わることを明らかにしたことである。本研究により、運動療法が肝癌に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。現在、国際的に脂肪肝に関連する肝癌患者が増加している。運動療法が脂肪肝の改善だけでなく、肝癌の予防にも重要であることが示され、本研究の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：NASH is a major causative factor for hepatocellular carcinoma (HCC). We have shown that decreased levels of decorin, a myokine, is an independent prognostic risk factor in patients with HCC. The aim of this study was to investigate the effect of decorin on NASH-related HCC. We found that decorin decreases the number of HCC cells. Furthermore, we analyzed the effects of decorin on the metabolism of HCC cell line and found that decorin has an inhibitory effect on the pentose phosphate pathway. These findings suggest that decorin exerts an antitumor effect by suppressing the Warburg effect in HCC cells.

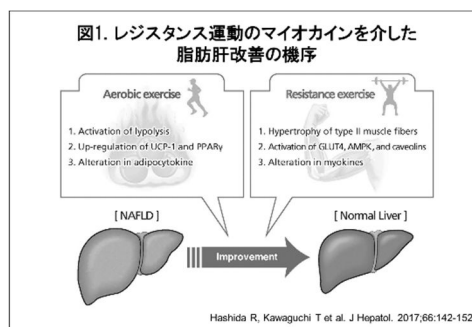
研究分野：消化器病学

キーワード：Decorin 肝癌 運動 ペントースリン酸経路 ワールブルグ効果 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

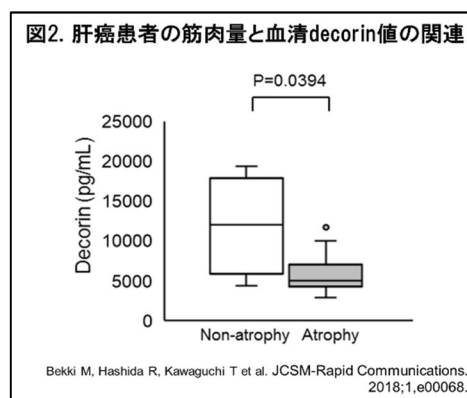
非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、患者数が増加しているだけでなく、肝硬変や肝癌の主な成因となっている。NASH の発症や病期進展には様々な要因が関わるが、アジア諸国に多い非肥満 NASH 患者では骨格筋量の低下が高頻度に認められる。骨格筋はインスリンの標的臓器であり、骨格筋量の低下はインスリン抵抗性を惹起し、NASH の病期進展や肝発癌に関わる。

申請者らはこれまでに、肝疾患と代謝異常の関連について一貫した研究を行うとともに¹⁻⁵、2009 年から慢性肝疾患患者の予後改善を目指した運動療法の開発に取り組んできた。これまでに、NASH 患者に運動療法を行うことでインスリン抵抗性が改善すること⁶、非肥満者では運動量の低下が肝線維化と関連すること、肝癌患者では筋萎縮予防に運動療法と分岐鎖アミノ酸の補充が重要であることを明らかにしてきた。



近年、骨格筋は内分泌器官として認識されてきている。筋細胞より分泌されるホルモンはマイオカインと総称され、30 種類以上のマイオカインが同定されている。なかでも筋収縮により分泌されるマイオカイン “decorin” は高脂肪食給与マウスのインスリン抵抗性を改善する。また、decorin は TGF- β の直接阻害を介した抗線維化作用を有することや、EGFR/p21 を活性化し大腸癌細胞株や卵巣癌細胞株の増殖抑制作用も有することも報告されている。

我々はこれまでに、1) NASH 患者に運動療法を行うことでマイオカインが変化しインスリン抵抗性改善に関わること⁶、2) レジスタンス運動の NASH 改善メカニズムにはマイオカインが関わること (図 1)⁷、3) 肝癌患者の筋肉量に最も関連するマイオカインが decorin であること (図 2)⁸、4) 血清 decorin 濃度の低下が肝癌患者の独立予後危険因子であることを明らかにしてきた。以上より、decorin は、NASH におけるインスリン抵抗性を改善しうるとともに、NASH 関連肝線維化や肝発癌に対しても抑制的に作用すると考えられるが、未だ decorin が NASH に合併する代謝異常や肝線維化、肝発癌におよぼす影響は明らかでない。



2. 研究の目的

本研究の目的は、decorin が NASH 関連肝癌におよぼす影響を検討することである。また、その機序についてオミクス解析を用いて網羅的に解析することである。

3. 研究の方法

(1) Decorin がヒト肝癌細胞株の細胞増殖におよぼす影響

ヒト培養肝癌細胞株に decorin を添加し、decorin の直接的な増殖抑制効果を検討する。

HepG2 細胞、HuH-7 細胞、Hep3B 細胞、HLF 細胞に対して、デコリン添加後 0 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後にトリパンプルー染色による生細胞数を計数する。

Decorin 添加後 0 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後にアポトーシスをアネキシン V 染色にて評価する。

Decorin 添加後 24 時間後に細胞周期をフローサイトメトリーにて評価する。

(2) Decorin が肝癌の代謝におよぼす影響

肝癌細胞株を用いて、オミクス解析により decorin が代謝におよぼす影響を網羅的に解析する。

Decorin が代謝産物におよぼす影響を、肝癌細胞株を用いてメタボローム解析にて網羅的に解析する。

4. 研究成果

(1) Decorin がヒト肝癌細胞株の細胞増殖におよぼす影響

Decorin 添加後 0 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後にトリパンプルー染色による生細胞数を計数した。

HepG2 細胞において、Control 群と Decorin 0.5 ng/mL, 5 ng/mL および 50 ng/mL 群の間に有意な細胞数の減少が認められた(図3)。Hep3B 細胞においても Control 群と Decorin 0.5 ng/mL, 5 ng/mL および 50 ng/mL 群の間に有意な細胞数の減少が認められた(図4)。一方、HLF 細胞においては、Control 群と Decorin 0.5 ng/mL, 5 ng/mL および 50 ng/mL 群の間に有意な細胞数の変化は認められなかった(図5)。

図3. DecorinがHepG2細胞数におよぼす影響

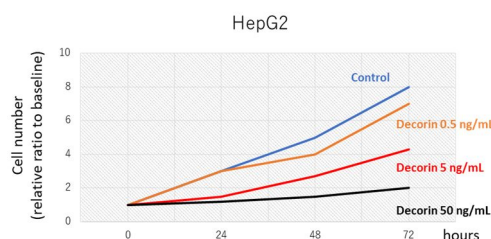


図4. DecorinがHep3B細胞数におよぼす影響

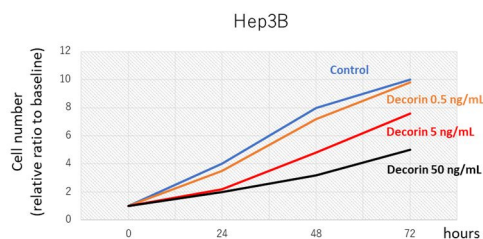
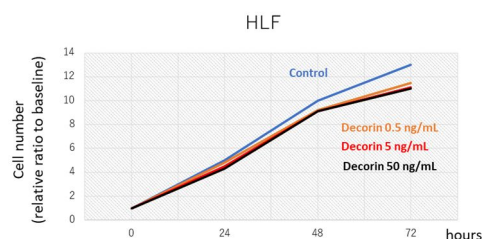


図5. DecorinがHLF細胞数におよぼす影響



Decorin 0 時間後および 24 時間後にアポトーシスをアネキシン V 染色にて評価した。

HepG2 細胞において、Control 群と Decorin 0.5 ng/mL, 5 ng/mL および 50 ng/mL 群の間においてアネキシン V 陽性細胞数に有意な変化は認められなかった。同様に、Hep3B 細胞および HLF 細胞においても Control 群と Decorin 0.5 ng/mL, 5 ng/mL および 50 ng/mL 群の間においてアネキシン V 陽性細胞数に有意な変化は認められなかった。

Decorin 0 時間後および 24 時間後の細胞周期をフローサイトメトリーにて評価した。

HepG2 細胞において、Decorin 5 ng/mL 群の G2/M は Control 群と比較して有意に高値であった (Control 群 19.3% vs. Decorin 5 ng/mL 群 43.2%)。また、Decorin 5 ng/mL 群では cyclin-dependent kinase 1 活性低下と cdc2 と cdc25c の発現低下を認めた。

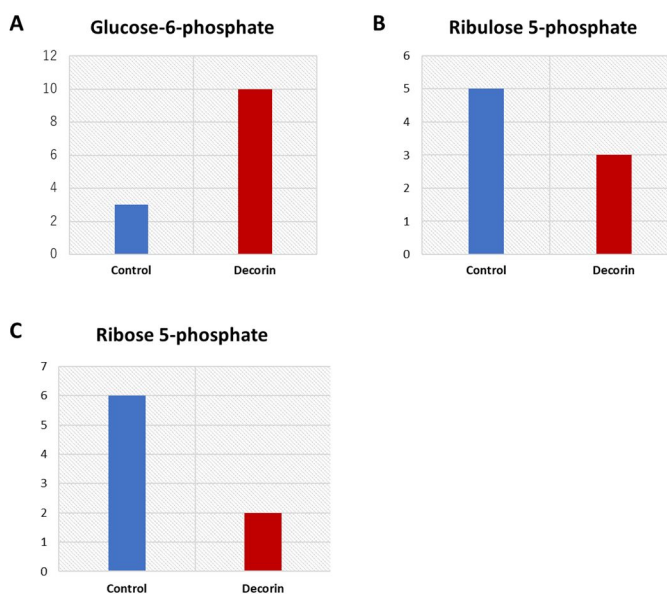
Hep3B 細胞においても、Decorin 5 ng/mL 群の G2/M は Control 群と比較して有意に高値であった (Control 群 10.5% vs. Decorin 5 ng/mL 群 38.1%)。一方、HLF 群では、Control 群と Decorin 5 ng/mL 群の間に G2/M の割合に有意な変化は認められなかった (Control 群 8.5% vs. Decorin 5 ng/mL 群 8.1%)。

(2) Decorin がヒト肝癌細胞株の代謝におよぼす影響

Decorin が代謝産物におよぼす影響を、HepG2 を用いてメタボローム解析にて網羅的に解析した。

Decorin 5 ng/mL 群の glucose-6-phosphate は Control 群と比較して高値であった(図 6A)。一方、Decorin 5 ng/mL 群の Ribulose 5-phosphate および Ribose 5-phosphate は Control 群と比較して有意に低値であった(図 6B, 6C)。

図6. DecorinがHepG2の代謝におよぼす影響



文献

- 1 Kawaguchi T, Sakisaka S, Sata M, Mori M, Tanikawa K. Different lobular distributions of altered hepatocyte tight junctions in rat models of intrahepatic and extrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 1999; 29: 205-16.
- 2 Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 13710-5.
- 3 Harada M, Kawaguchi T, Kumemura H, Sata M. Where is the site that ATP7B transports copper within hepatocytes? *Gastroenterology*. 2003; 125: 1911; author reply - 2.
- 4 Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR, Sata M. Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. *Hepatology*. 2011; 54: 1063-70.
- 5 Kawaguchi T, Shiraishi K, Ito T, Suzuki K, Koreeda C, Ohtake T, et al. Branched-chain amino acids prevent hepatocarcinogenesis and prolong survival of patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014; 12: 1012-8 e1.
- 6 Kawaguchi T, Shiba N, Maeda T, Matsugaki T, Takano Y, Itou M, et al. Hybrid training of voluntary and electrical muscle contractions reduces steatosis, insulin resistance, and IL-6 levels in patients with NAFLD: a pilot study. *J Gastroenterol*. 2011; 46: 746-57.
- 7 Hashida R, Kawaguchi T, Bekki M, Omoto M, Matsuse H, Nago T, et al. Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *J Hepatol*. 2017; 66: 142-52.
- 8 Bekki M, Hashida R, Kawaguchi T, Goshima N, Yoshiyama T, Otsuka T, et al. The association between sarcopenia and decorin, an exercise-induced myokine, in patients with chronic liver disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle Rapid Communications*. 2018; 1: e00068.

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hashida Ryuki, Nakano Dan, Yamamura Sakura, Kawaguchi Takumi, Tsutsumi Tsubasa, Matsuse Hiroo, Takahashi Hirokazu, Gerber Lynn, Younossi Zobair M., Torimura Takuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Association between Activity and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Data-Mining Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 799 ~ 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11080799	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 Fukunaga Shuhei, Nakano Dan, Kawaguchi Takumi, Eslam Mohammed, Ouchi Akihiro, Nagata Tsutomu, Kuroki Hidefumi, Kawata Hidemichi, Abe Hirohiko, Nouno Ryuichi, Kawaguchi Koutaro, George Jacob, Mitsuyama Keiichi, Torimura Takuji	4. 巻 22
2. 論文標題 Non-Obese MAFLD Is Associated with Colorectal Adenoma in Health Check Examinees: A Multicenter Retrospective Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5462 ~ 5462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115462	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 Hashida Ryuki, Matsuse Hiroo, Kawaguchi Takumi, Yoshio Sachiyo, Bekki Masafumi, Iwanaga Sohei, Sugimoto Takahiro, Hara Koji, Koya Shunji, Hirota Keisuke, Nakano Dan, Tsutsumi Tsubasa, Kanto Tatsuya, Torimura Takuji, Shiba Naoto	4. 巻 51
2. 論文標題 Effects of a low intensity resistance exercise program on serum miR 630, miR 5703, and Fractalkine/CX3CL1 expressions in subjects with No exercise habits: A preliminary study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 823 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13670	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 Shimose Shigeo, Koya Shunji, Kawaguchi Takumi, Hirota Keisuke, Yoshio Sachiyo, Niizeki Takashi, Matsuse Hiroo, Torimura Takuji	4. 巻 27
2. 論文標題 Impact of branched-chain amino acids and frailty on the management of lenvatinib-related fatigue in patients with hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Molecular Hepatology	6. 最初と最後の頁 616 ~ 619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3350/cmh.2021.0258	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 Kawaguchi Takumi、Torimura Takuji	4. 巻 28
2. 論文標題 Leaky gut-derived tumor necrosis factor- causes sarcopenia in patients with liver cirrhosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Molecular Hepatology	6. 最初と最後の頁 177 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3350/cmh.2021.0246	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中野 暖、川口 巧、鳥村 拓司
2. 発表標題 マイオカインdecorinが肝がん患者のサルコペニアと予後におよぼす影響
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 Takumi Kawaguchi, Akihiro Honda, Yoichi Sugiyama, Dan Nakano, Tsubsa Tsutsumi, Nobuhiro Tahara, Takuji Torimura, Yoshihiro Fukumoto
2. 発表標題 An Impact of Albumin-Bilirubin (ALBI) Score on Pulmonary Arterial Pressure in Patients with Chronic Liver Disease with Porto-pulmonary Hypertension (PoPH): A Data-mining Analysis
3. 学会等名 The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口 巧
2. 発表標題 NAFLD/NASHにおける運動療法のSystematic Reviewとハイブリッドトレーニングの有効性
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堤 翼, 土橋 仁, 川口 巧
2. 発表標題 運動療法が肝硬変患者のフレイルにおよぼす影響
3. 学会等名 第27回日本門脈圧亢進症学会総会
4. 発表年 2020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 分担者	中野 暖 (Nakano Dan) (40723987)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	
研究 分担者	橋田 竜騎 (Hashida Ryuki) (40754841)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	

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