

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16163

研究課題名(和文)がん微小環境における肝星細胞と肝実質細胞の相互作用による腫瘍化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of tumorigenesis by the interaction between hepatic stellate cells and hepatocytes in the cancer microenvironment.

研究代表者

羅 智文(LOO, Tze mun)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞老化プロジェクト・研究員

研究者番号：40816998

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)：申請者はこれまでの研究から、脂肪肝内に老化した肝星細胞が肥満誘導性肝がんの発症に関わることを見出ししてきた。しかし、老化した肝星細胞が肝実質細胞の相互作用については未だ不明である。申請者は脂肪肝を模した環境で肝実質細胞と肝星細胞を培養した結果、脂質代謝に関わる遺伝子の発現が変化することを見出した。次に、申請者はこの細胞間の相互作用を明らかにするために、マウスの肝臓から肝星細胞と肝実質細胞を単離することを成功した。更に、肥満マウスの肝細胞内の脂質蓄積を抑制した結果、肝腫瘍の形成が抑制された。このことから、老化した肝星細胞が肝実質細胞の代謝を調節し、肝腫瘍の形成に促進ことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から、申請者は肥満誘導性肝がんモデルマウスの腫瘍部における肝実質細胞と肝星細胞が異なる脂質代謝の状態を呈していることを見出し、それらが肝腫瘍の脂質の蓄積を引き起こし、肝がんの発症を促すという知見を得ることができた。このことはがん微小環境内における細胞間の相互作用によるがんの発症の基本メカニズムの解明に繋がる成果である。また、本研究により申請者はマウスの脂肪肝から肝星細胞と肝実質細胞を単離する系を構築しており、より生体に近い状態で詳細な細胞の解析が可能になったことから、今後肥満誘導性肝がんに対して有効な治療法や予防法の開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have found that senescent hepatic stellate cells are involved in the development of obesity-induced liver cancer. However, the involvement of interaction between senescent hepatic stellate cells and hepatocytes remains unclear. We cultured hepatocytes and hepatic stellate cells in the environment that mimics a fatty liver and found that the expression of genes involved in lipid metabolism largely changed. Moreover, we successfully isolated hepatic stellate cells and hepatocytes from mouse fatty livers to investigate this cell-cell interaction. Furthermore, inhibiting lipid accumulation in the hepatocytes of obese mice suppressed the formation of liver tumors. These results suggest that aged hepatic stellate cells regulate the metabolism of hepatic parenchymal cells and promote the formation of liver tumors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：脂肪肝 代謝 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

最近の研究や疫学調査の結果から、肥満は心筋梗塞や糖尿病だけではなく、様々ながんの発症を促進することが指摘されている (Khandekar *et al.*, Nat. Rev. Cancer, 2011)。その中でも、過剰な栄養摂取によって引き起こされる非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) を伴った肝がんの発症頻度は、我が国においても年々増加傾向にある。そのため、NASH に対する効果的な予防法や治療法の開発が急務である。

申請者はこれまでに、NASH を伴った肝がんの発症において、肝臓の間質系細胞である肝星細胞の細胞老化が重要な役割を果たしていることを見出し報告してきた (Yoshimoto, Loo *et al.*, Nature, 2013)。「細胞老化」とは正常な細胞に様々な発がんストレスが加わった際に、異常を持った細胞の増殖を防ぐために誘導される不可逆的な増殖停止状態であり、生体が持つ重要ながん抑制機構として知られている。また最近の研究から、細胞老化を起こした細胞(老化細胞)は生体内で単に増殖を停止しているだけでなく、炎症性サイトカインやケモカイン、増殖因子など様々な炎症性蛋白質を高発現し細胞外へと分泌する Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる現象を起こすことが明らかになっている。申請者はこれまでに老化細胞が分泌する SASP 因子が周囲の細胞の腫瘍化を促進することを明らかにしてきた。更に、申請者は肥満によって改変された腸内細菌叢からデオキシコール酸 (Deoxycholic acid: DCA) が産生され、腸肝循環を介して肝星細胞に細胞老化を誘導し、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>: PGE<sub>2</sub>) を産生することで抗腫瘍免疫を抑制し、肝がんの進展を促進することを報告した (Loo *et al.*, Cancer Discovery, 2017)。しかし、肥満誘導性肝がんの腫瘍微小環境において、老化した肝星細胞がどのような機構を介して周囲の肝実質細胞に腫瘍化を促すのか、その分子機構の全容は未だに解明されていない。

近年、生体内に存在する様々な種類の脂質の代謝が、生体の恒常性維持に重要であることや、脂質の代謝異常はアレルギーやがんの発症などに関与していることが明らかになりつつある (Moral *et al.*, Immune Netw., 2017; Long *et al.*, Am. J. Cancer Res., 2018)。更に、脂質代謝の異常はがん細胞の増殖や細胞老化の誘導に関わることも報告されている (Duman *et al.*, Cell Metab., 2019)。申請者はこれまでの研究において、肥満によって肝がんが誘導された腫瘍部内の肝実質細胞に脂質が蓄積しているだけでなく、普通食摂取マウスに DCA を投与し肝星細胞に細胞老化を誘導した肝臓においても、肝実質細胞に過剰な脂質が蓄積し肝がんを発症していることを見出した。つまり、老化した肝星細胞が何らかの機構で肝実質細胞の脂質代謝を変調させ異常な脂質が蓄積し、がん化を誘導していることが示唆される。事実、脂質の一種である、コレステロールエステルの蓄積が膵がん細胞の増殖を促進することが報告されている (Yue *et al.*, Cell Metab., 2014)。また近年、膵がんの腫瘍微小環境に存在する間質細胞が分泌した代謝産物を介してがん細胞の増殖を促進することも報告されている (Sousa *et al.*, Nature, 2017)。そこで、申請者は NASH を伴った肝がんの発症過程において、細胞老化を起こした肝星細胞が肝実質細胞の脂質代謝異常を引き起こすことで、肝がんの発症を促進する可能性を検討する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は細胞老化を起こした肝星細胞と肝実質細胞の相互作用を明らかにし、代謝異常による肝がんの発症メカニズムを解明し、新たな肝がんの予防法や治療法の開発に繋げることである。

### 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、申請者まずはヒト肝がん細胞株とヒト肝星細胞株でDCAとパルミチン酸が存在し、脂肪肝を模した環境下における遺伝子発現や脂質代謝の変化を調べた。次に、申請者は肥満マウスの肝臓由来の老化した肝星細胞と肝実質細胞の単離回収を検討し、その方法を構築した。更に、申請者は腫瘍内に蓄積した脂質が肝腫瘍の形成に関わるのかを調べるため、脂質の分解を促す化合物をマウスに投与し腫瘍形成能の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### ● 肝星細胞と肝実質細胞における脂質代謝の変化

前述のように、申請者はこれまでの研究において、肥満によって肝がんが誘導された腫瘍部内の肝実質細胞だけでなく、普通食摂取マウスにDCAを投与し肝星細胞に細胞老化を誘導した肝臓においても、肝実質細胞に過剰な脂質が蓄積していることを見出した。このことから、肝実質細胞における脂質代謝が異常をきたしていることが考えられた。そのため、申請者はDCAまたはパルミチン酸が存在し、脂肪肝を模した環境下でヒト肝がん細胞株とヒト肝星細胞株を培養した。その結果、脂肪酸合成関連遺伝子の発現がヒト肝星細胞株において著しく上昇することに対して、ヒト肝がん細胞株における脂肪酸合成関連遺伝子の発現には変化が観察されなかった。このことから、肝星細胞で産生された脂質が何らかの経路を介して肝実質細胞に輸送され、脂質の蓄積を引き起こすのではないかと考えられる。

#### ● 脂肪肝から肝星細胞と肝実質細胞の単離

申請者はこれまでに、肝臓の間質細胞である肝星細胞が細胞老化を起こし、PGE<sub>2</sub>を介して免疫細胞の抗腫瘍作用を抑制し、肝がんの進展を促進することを明らか

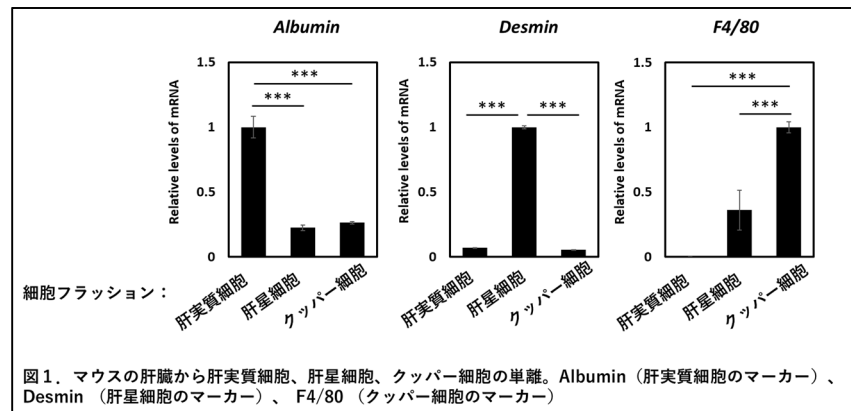


図1. マウスの肝臓から肝実質細胞、肝星細胞、クッパー細胞の単離。Albumin (肝実質細胞のマーカー)、Desmin (肝星細胞のマーカー)、F4/80 (クッパー細胞のマーカー)

にしてきた。しかし、老化した肝星細胞がどのような機構を介して周囲の肝実質細胞の腫瘍化を誘導するのかについてはまだ不明である。そこで、申請者が細胞老化を起こした肝星細胞と肝実質細胞の相互作用を明らかにするため、申請者はマウスの肝臓から肝星細胞と肝実質細胞を同時に単離回収できる方法の構築を試みた。その結果、マウスの肝臓から肝星細胞と肝実質細胞を同時に単離し、回収することに成功した(図1)。更に、肥満誘導性肝がんモデルマウスの腫瘍部から肝星細胞と肝実質細胞を単離し、別々にin vitroで培養することができた。これによって、より生体に近い状態で細胞間の相互作用を解析することができるシステムの構築に成功した。

#### ● 肝実質細胞における脂質の蓄積と肝がんの発症

次に、申請者は肝腫瘍に蓄積した脂質が肝腫瘍の形成を促進するのかを調べるため、脂質の分解を促進できる化合物を肥満誘導性肝がんモデルマウスに投与した。その結果、化合物を摂取したマウスにおいて肝腫瘍の形成が抑制された(未発表データ)。これらの結果

から、肝腫瘍内に蓄積された脂質が肝腫瘍の形成を促進することが示唆された。

## 考察

今回の研究から、申請者は肥満誘導性肝がんモデルマウスの腫瘍部の肝実質細胞に脂質が著しく蓄積されていることを観察したことから、肝実質細胞における脂質の代謝に異常をきたしていることが示唆された。また、申請者は脂肪肝を模した環境下でヒト肝がん細胞株とヒト肝星細胞株を培養した結果、脂肪酸合成関連遺伝子の発現がヒト肝星細胞株にのみ著しく上昇することを見出した。そして、肝実質細胞における脂質の蓄積を抑制し、肝腫瘍の形成が抑制されたことから、脂質の蓄積が肝がんの発症には重要であることが示唆されている。更に、間質細胞が周囲の細胞の代謝状態を制御することが報告されていることから、申請者は肝星細胞で産生された脂質が何らかの経路を介して肝実質細胞に輸送され、脂質の蓄積を引き起こし、肝がんの発症を促進すると考えている。そこで、申請者はより生体に近い状態で各種類の細胞を解析するため、マウスの肝臓から肝星細胞と肝実質細胞を単離する方法を構築し、培養することを成功した。今後は、本研究で構築した実験系を用いて、細胞間の相互作用に着目した解析を行い、新たな肥満誘導性肝がんの肝がんの予防法や治療法の開発に繋げることを目指している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ryota Yamagishi, Fumitaka Kamachi, Masaru Nakamura, Shota Yamazaki, Tomonori Kamiya, Masaki Takasugi, Yi Cheng, Yoshiki Nonaka, Yoshimi Yukawa-Muto, Le Thi Thanh Thuy, Yohsuke Harada, Tatsuya Arai, Tze Mun Loo, Shin Yoshimoto, Tatsuya Ando et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Gasdermin D-mediated release of IL-33 from senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	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） なし	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 羅 智文、菅原 祥、高橋暁子	4. 巻 2
2. 論文標題 SASP因子の機能解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 老年内科	6. 最初と最後の頁 610～618
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 Hitomi Kazuhiro, Okada Ryo, Loo Tze Mun, Miyata Kenichi, Nakamura Asako J., Takahashi Akiko	4. 巻 21
2. 論文標題 DNA Damage Regulates Senescence-Associated Extracellular Vesicle Release via the Ceramide Pathway to Prevent Excessive Inflammatory Responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3720～3720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21103720	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 Wakita Masahiro, Takahashi Akiko, Sano Osamu, Loo Tze Mun, Imai Yoshinori, Narukawa Megumi, Iwata Hidehisa, Matsudaira Tatsuyuki, Kawamoto Shimpei, Ohtani Naoko, Yoshimori Tamotsu, Hara Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 A BET family protein degrader provokes senolysis by targeting NHEJ and autophagy in senescent cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15719-6	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 暁子、宮田 憲一、羅 智文、菅原 祥
2. 発表標題 The Analysis of Epigenetic alteration in cellular senescence and cancer : 細胞老化とがんにおけるエピゲノム異常の解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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