

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16991

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝疾患を背景とする肝発癌におけるB細胞活性化因子の役割

研究課題名(英文)The role of B cell-activating factor for hepatocarcinogenesis induced by non-alcoholic steatohepatitis.

研究代表者

中村 由子(NAKAMURA, Yoshiko)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40867256

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)：本研究では、B細胞活性化因子(BAFF)の脂肪肝由来肝発癌における役割をBAFFノックアウト(KO)マウスを用いて解析した。ジエチルニトロサミン単回腹腔内投与し高脂肪食下で、脂肪肝と肝癌を合併したマウスモデルを作成した。肝腫瘍はBAFF-KOで数が多く、サイズも大きかった。腫瘍部のPCNA染色陽性細胞面積や細胞周期に関する遺伝子発現もBAFF-KOでより多く腫瘍増殖が亢進していることが示唆された。肝臓非実質細胞のFACS解析では、BAFF-KOでより骨髄由来抑制細胞や制御性T細胞の割合が多かった。これらからBAFFは免疫抑制系細胞への作用を有し、脂肪肝由来肝癌に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年ウイルス性肝癌が減少傾向を示す一方で、耐糖能異常や脂質異常症など肥満関連代謝異常を合併した非アルコール性脂肪性肝疾患を背景とする肝癌が全世界的に増加している。脂肪肝症例から発癌例を抽出すること並びにその治療戦略を確立する必要がある。また様々な癌種においてT細胞を標的とした免疫治療が標準治療の一つとなっているが、申請者はBAFFが脂肪性肝疾患における免疫異常と発癌を繋ぐ重要な因子の一つではないかと考えている。肝発癌のメカニズムと治療法の確立は重要であり、本研究成果は脂肪性肝疾患のみならず肥満関連疾患などの領域にも波及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the role of B cell-activating factor (BAFF) in fatty liver disease-induced hepatocarcinogenesis was analyzed using BAFF-knockout (BAFF-KO) mice. We established mouse model with steatosis and hepatocellular carcinoma by single intraperitoneal administration of Diethylnitrosamine (DEN) and feeding with high fat diet. Both of the number and the size of tumors were larger in the livers of BAFF-KO mice than in those of wild-type mice, in accordance with the results of PCNA-staining and gene expression related to cell cycles. Additionally, liver nonparenchymal cells analysis showed that BAFF-KO mice had significantly more percentages of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells than wild-type mice. These findings suggest that BAFF may contribute to immunosuppressive cells functions and subsequent hepatocarcinogenesis in fatty liver disease.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝癌 非アルコール性脂肪性肝炎 B細胞活性化因子 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ウイルス性肝癌が減少傾向を示す一方で、耐糖能異常や脂質異常症など肥満関連代謝異常を合併した非アルコール性脂肪肝疾患を背景とする肝癌が全世界的に増加している。脂肪肝症例から発癌例を抽出すること並びにその治療戦略を確立する必要がある。

申請者らは、代謝異常や脂肪性肝疾患の臨床病態解析に取り組む中で、B細胞の生存、分化や活性化に關与するサイトカインであるB細胞活性化因子 (B cell-activating factor: BAFF) がインスリン抵抗性を誘導するアディポカインであることを見出した (Hamada M, Abe M, et al. Obesity. 2011; 19: 1915.)。また高脂肪食摂取BAFFノックアウト (BAFF-KO) マウスはC57BL/6野生型に比し内臓脂肪組織の炎症と線維化が軽減し、内臓脂肪蓄積能が増すことを報告した (Nakamura Y, Abe M, et al. Sci Rep. 2019; 9: 977.)。更に我々は、高脂肪食摂取BAFF-KOマウスはC57BL/6/J野生型に比して肝脂肪化が軽減する一方で、血清BAFF濃度が増加するBAFF-Receptorノックアウト (BAFF-R-KO) マウスでは肝脂肪化が増悪することをも報告した (Kawasaki K, Abe M, et al. Lab Invest 2013; 93: 311.)。

マウスモデルのみならず、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 患者では、肝線維化の進展に伴い血清BAFF濃度が増加していることを見いだした (Miyake T, Abe M, et al. Hepatol Int 2013; 7: 539.)。これらの背景から BAFF が肥満に伴う内臓脂肪の質のみならず肝脂肪化と肝線維化に重要な役割を果たしていることが示唆される。

近年様々な癌種においてT細胞を標的とした免疫治療が標準治療の一つとなっているが、申請者は BAFF が脂肪性肝疾患における免疫異常と発癌を繋ぐ重要な因子の一つではないかと考えている。肝発癌のメカニズムと治療法の確立は重要であり、脂肪性肝疾患の発癌に対する BAFF の関とおよびその機序は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は脂肪性肝疾患の肝発癌に焦点をあてて解析を行うことで、現在までの研究成果と合わせて脂肪性肝疾患の病態における BAFF の役割についての基礎的研究の基盤を築くことである。最終的には BAFF を標的とした発癌予防および脂肪性肝疾患の治療法の開発に繋げたい。

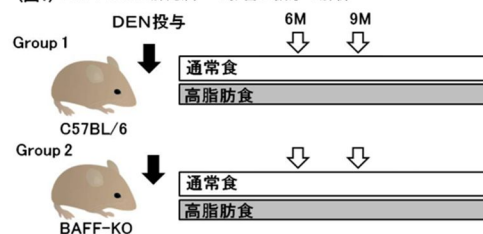
3. 研究の方法

まず肥満・糖尿病・脂肪肝を介した肝発癌モデルの作成と基盤となる解析を行い、その後は肝発癌の機序の解析を行う。

(1) ノックアウトマウスを用いた BAFF による肝発癌への影響と機序の解析

雄性 C57BL/6/J 野生型 (WT) をコントロールマウスとし雄性 BAFF-KO マウスを用いた。生後 2 週齢でジエチルニトロサミン (DEN 25 mg/kg) を単回腹腔内投与し、生後 6 週齢から通常食もしくは高脂肪食 (60%脂質) で飼育した (図 1)。経時的に肝臓を採取し、肝腫瘍合併率と肝組織像を検討する。また得られた肝組織で炎症・免疫異常、細胞周期に関する遺伝子発現を real time PCR で評価する。

(図1) BAFFによる肝発癌への影響と機序の解析



(2) ノックアウトマウスを用いた BAFF による肝発癌へ影響する免疫担当細胞の解析

(1) で作成した 6 ヶ月齢のモデルマウスの肝内浸潤細胞を FACS で解析した。具体的には CD3⁺CD4⁺

T 細胞、CD3⁺CD8⁺ T 細胞、CD19⁺B220⁺ B2 細胞、CD3⁺CD49b^{high} NK 細胞、CD3⁺CD49b^{low} NK T 細胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞、F4/80⁺マクロファージ (phenotype CD11b⁺ M2, CD11c⁺ M1)、CD11b⁺Gr-1⁺ 骨髄由来抑制細胞(myeloid-derived suppressor cell; MDSC)の割合を検討した。

4. 研究成果

(1) ノックアウトマウスを用いた肝発癌モデル作成と BAFF による肝発癌への影響と機序の解析 体重、肝重量の変化

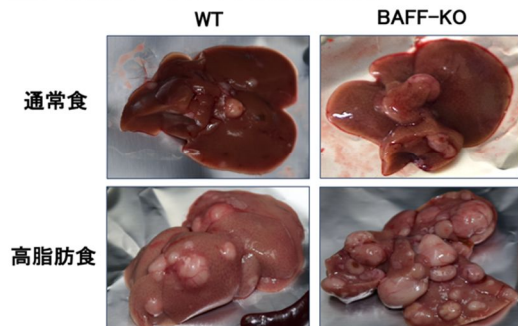
6 ヶ月齢の DEN 投与マウスの体重と肝重量を計測した。通常食下では体重、肝重量それぞれ WT 30.6g、1.42g、一方で BAFF-KO 33.5g、1.60g と、いずれも BAFF-KO で有意に増加を認めた(p=0.01, 0.003)。一方、高脂肪食下では体重、肝重量それぞれ WT 48.7g、2.56g、BAFF-KO 48.0g、2.21g と体重に有意差は認めないものの、肝重量は BAFF-KO で低かった(p=0.02)。

肝腫瘍の合併状況

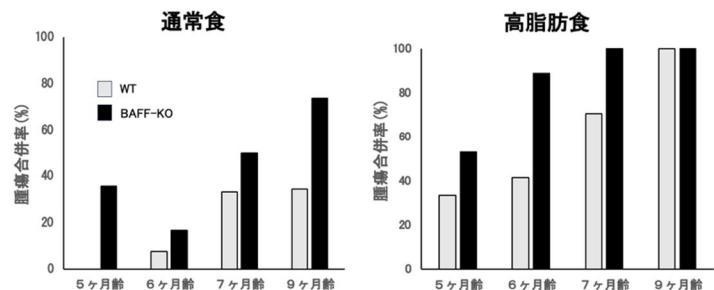
9 ヶ月齢の DEN 投与マウスの肝臓を観察した(図2)。高脂肪食飼育マウスは全例に肝腫瘍を認めた。認めた肝腫瘍は、WT、BAFF-KO いずれも高脂肪食飼育マウスは径が大きく、数も多かった。更に通常食、高脂肪食飼育いずれにおいても BAFF-KO マウスのものはより径が大きく、数も多かった。

次に腫瘍合併率の経時的変化を検討した(図3)。まず通常食飼育下で5 ヶ月齢の WT は0%、BAFF-KO は35%、9 ヶ月齢の WT は34%、BAFF-KO は74%のマウスで腫瘍を合併していた。次に高脂肪食飼育下で6 ヶ月齢の WT は41%、BAFF-KO は89%のマウスで腫瘍を合併しており、有意に BAFF-KO マウスで高い腫瘍合併率であった。

(図2) DEN投与マウス 9ヶ月齢の肝臓像



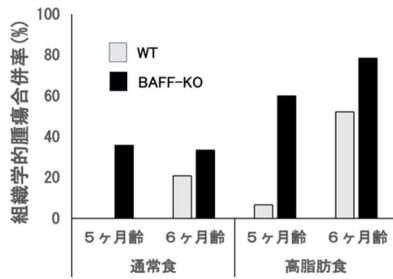
(図3) DEN投与マウス 肝腫瘍合併率の経時的変化



肝腫瘍の組織学的検討

ランダムに得られた肝臓 HE 染色標本で組織学的な肝腫瘍の有無を評価した(図4)。通常食飼育マウスの5 ヶ月齢では WT で組織学的な腫瘍の合併は認めなかった一方で、BAFF-KO では36%に腫瘍性病変が発生していた。また高脂肪食飼育マウスの5、6 ヶ月齢ではそれぞれ WT で7%、52%、BAFF-KO で60%、78%と BAFF-KO で腫瘍性病変をより多く合併していた。次に、細胞増殖を評価する目的で高脂肪食飼育マウス肝臓を PCNA 染色付加した。腫瘍内の PCNA 陽性面積(中央値)は BAFF-KO マウスで1.285%、WT マウスで0.681%と有意に多い結果であった(p=0.02)。これらのことから、BAFF-KO マウス肝臓では WT に比して腫瘍増殖が促進していることが示唆された。

(図4) 組織学的肝腫瘍合併率の変化



腫瘍部の遺伝子発現

6ヶ月齢の高脂肪食餌マウスから得た腫瘍部での細胞周期に関する遺伝子発現を解析した。BAFF-KO マウス腫瘍部ではWT に比し、CDK6、Cyclin D1、Cyclin E1 の発現が有意に亢進していた。Rb1 に差は認めなかった。また血管増殖因子に関しては、HGF や FGF1、VEGF に有意な差は認めなかった。M2 マクロファージマーカーである CD206 や Arg1 は BAFF-KO で亢進している傾向がえられた。

(2) ノックアウトマウスを用いた BAFF による肝発癌へ影響する免疫担当細胞の解析

BAFF-KO マウス肝臓には、WT に比して有意に B2 細胞の割合が少なかった ($p < 0.001$)。また CD8 細胞は有意に多く ($p < 0.05$)、CD4 陽性細胞に有意差は認めなかった。一方で、MDSC や制御性 T 細胞は BAFF-KO マウスで有意に多く浸潤していた。

以上の結果から、本研究では高脂肪食が DEN 誘発性肝発癌を進展させることを、また BAFF がその肝発癌を抑制している可能性が示された。その機序として免疫担当細胞の解析結果から、BAFF の MDSC や制御性 T 細胞といった免疫抑制系細胞への作用が想定される。現在、組織浸潤した MDSC のさらなる詳細な解析を進行している。また BAFF の免疫抑制系細胞への直接的な影響を *in vitro* 系で検討している。今後も引き続きマウスモデルでの解析を進めていくとともに、臨床例での解析もあわせて行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kanemitsu-Okada K, Abe M, Nakamura Y, Miyake T, Watanabe T, Yoshida O, Koizumi Y, Hirooka M, Tokumoto Y, Matsuura B, Koizumi M, Hiasa Y. | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Role of B Cell-Activating Factor in Fibrosis Progression in a Murine Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci . | 6. 最初と最後の頁 2509 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24032509. | 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部雅則、中村由子、兼光梢、三宅映己、渡辺崇夫、吉田理、徳本良雄、廣岡昌史、松浦文三、日浅陽一 |
| 2. 発表標題 B細胞活性化因子の非アルコール性脂肪性肝疾患の病態への影響 |
| 3. 学会等名 第7回肝臓と糖尿病・代謝研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Abe M, Nakamura Y, Kanamitsu K, Miyake T, Sunago K, Yukimoto A, Watanabe T, Koizumi Y, Yoshida O, Tokumoto Y, Hirooka M, Hiasa Y |
| 2. 発表標題 B-cell activating factor promotes lipid synthesis in murine hepatocytes |
| 3. 学会等名 APASL Single Topic Conference Molecular and Cell Biology of the Liver: Recent Evolution to Clinical Application (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中村由子 |
| 2. 発表標題 B細胞活性化因子の非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスにおける肝脂肪化への影響 |
| 3. 学会等名 第38回Cytoprotection研究会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|