

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17017

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪肝炎による腸管免疫・癌微小環境動態と大腸癌への影響の解明

研究課題名（英文）The dynamics of Mucosal immunity and Cancer Microenvironmental on of Nonalcoholic Steatohepatitis Dynamics as the Effects on Colorectal Cancer

研究代表者

関 晃裕 (Seki, Akihiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00733859

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）：非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は大腸癌のリスクであることが報告されている。大腸癌の発生および進展には腸管における免疫細胞と癌微小環境の関与が示唆されるが、NASHによる腸管の免疫動態と癌微小環境への影響は解明されていない。本研究では、NASHが大腸癌の発生と進展に与える影響の解明のため、NASHマウスを用いsyngenic大腸癌モデルマウスを作成し、腫瘍進展の相違を検討した。また、免疫細胞の分画・局在、遺伝子発現を解析することにより、NASHマウスにおける腸管免疫の特徴と大腸癌への影響を解明した。これらによりNASHにおける腸管免疫の動態変化が大腸がんの増大に寄与す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

NASHマウスの腸管に移植した大腸癌細胞株はwildマウスへの移植と比較し、腫瘍径および腫瘍重量の有意な増大を認め、NASHマウスの腸管組織においてT細胞、顆粒球、マクロファージの増加を認めた。NASHマウスの腸管では大腸癌がより進展し、これには腸管における免疫動態の変化が寄与する可能性が示唆された。本研究成果であるNASHにおける腸管の免疫動態と大腸癌に与える影響の解明は、NASH患者の増加に伴い増加が予測される大腸癌に対する新たな予防法確立の基盤を創造しうる重要な社会的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is on the rise due to changes in lifestyle, and it's also been linked to an increased risk of colorectal cancer. While the impacts of NASH on the immune cells and the cancer microenvironment has not been fully understood.

To investigate, we conducted a study using C57BL/6 mice and NASH mice to create a syngenic colon cancer model and examined differences in tumor development and progression. Additionally, we analyzed immune cell fractions and localization, as well as gene expression in the intestinal tract and tumor tissues using techniques like immunohistochemical staining (IHC), flow cytometry (FCM), and DNA microarray.

Our findings revealed increased numbers of T cells, granulocytes, and macrophages in the intestinal tissues of NASH mice compared to wild type mice. This suggests that altered immune dynamics in the intestinal tract of NASH mice may contribute to the heightened colorectal carcinogenesis observed.

研究分野：消化器内科

キーワード：NASH 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

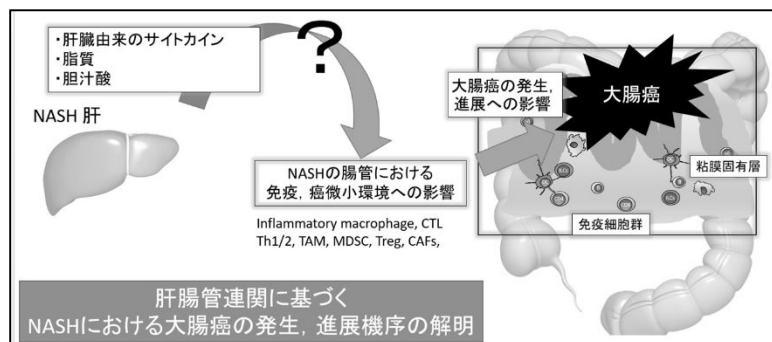
非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は生活習慣の変化に伴い近年増加し、本邦において患者数は約 100 万人に及ぶ。NASH は肝細胞における脂肪沈着と持続する炎症を背景に線維化が進行し肝硬変・肝不全に至るが、根本的な治療は開発されていない。NASH の病態は肝臓内に留まらず、肝臓における脂質代謝やサイトカイン産生を介して肝臓外の炎症を惹起しインスリン抵抗性や動脈硬化を悪化させ、心臓、骨格筋をはじめとした全身臓器に影響を与えることが知られる(Tilig H, et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017)。

また、NASH は腸管において大腸癌のリスクであることが報告されているが、その詳細機序は解明されていない (Wong VW et al. Gut. 2011)。大腸癌は日本人における有病率が近年著増し、死亡者数は年間 5 万人を超える。大腸癌の発症には腸管内の慢性炎症など持続する細胞障害により遺伝子異常が集積し進行する adenoma-carcinoma sequence が唱えられており、腸管の持続的な炎症に関わる炎症性マクロファージや好中球、CD4 陽性ヘルパー T 細胞(Th1/Th2)の動態が大腸癌の発症において重要とされる (Terzić J et al. Gastroenterology. 2010)。加えて、大腸癌の進展において免疫細胞群と間質細胞により構成される癌微小環境が注視されており、抗腫瘍免疫にかかわる Cytotoxic T lymphocyte (CTL)と免疫寛容に関わる Myeloid-derived suppressor cell (MDSC), Tumor associated macrophages (TAMs), Regulatory T cells (Tregs), 更に癌組織において間質を構成し免疫細胞の遊走に關与する活性化線維芽細胞である Cancer associated fibroblasts (CAFs)の動態が大腸癌の進展において重要であるとされる (H Kobayashi et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019)。

以上の背景より NASH による腸管免疫と癌微小環境に対する影響が、大腸癌の発症および進展において重要な役割を果たしているものと推測される。しかし、NASH の病態、特に NASH の肝臓における脂肪沈着、炎症および線維化と代謝産生物質が腸管の免疫細胞群と癌微小環境に与える影響の詳細は不明であり、これは NASH における大腸癌の発症と進展に対する新しい予防法確立に向けて解明されるべき課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は NASH における腸管の免疫細胞群と癌微小環境の動態の解明。NASH の肝臓における脂肪沈着、炎症および線維化と代謝産生物質が腸管に与える影響の解明。これにより NASH が大腸癌の発症と進展に与える影響の詳細を明らかとすることにある。



NASH における腸管と肝臓の相互連関において腸内細菌や粘膜由来の代謝物質が肝臓に与える影響についての検討は近年発展を認める。しかし、NASH における腸管の免疫動態と癌微小環境の詳細解明はなされておらず、肝臓の病態が腸管の免疫細胞を介し大腸癌へ与える影響の解析には独自性がある。NASH の肝臓における脂肪沈着、炎症、線維化が腸管に与える影響を解明し、更に近年 NASH に対する新たな治療として注目されている MSC が NASH の改善を介し、大腸癌に与える影響を明らかにすることで、NASH 患者の増加に伴い増加が予測される大腸癌に対する新たな予防法確立の基盤を創造しうる研究である。

3. 研究の方法

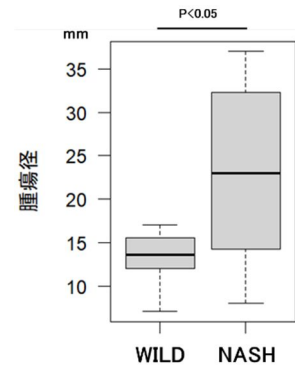
C57BL/6 マウスおよび同マウスに高脂肪動脈硬化飼料を給餌し作成した NASH マウスの腸管に C57BL/6 由来の大腸癌細胞株を移植し、syngenic 大腸癌モデルマウスを作成し、腫瘍進展の相違を検討した。また、それぞれの腸管および腫瘍組織において免疫組織化学染色 (IHC)、フローサイトメトリー (FCM)、DNA マイクロアレイ法を用い、免疫細胞の分画・局在、遺伝子発現を解析することにより、NASH マウスにおける腸管免疫の特徴と大腸癌への影響を解明した。

4. 研究成果

1) Syngeneic 大腸癌移植モデルの作成およびNASH モデルマウスにおける腫瘍増大への影響の評価。

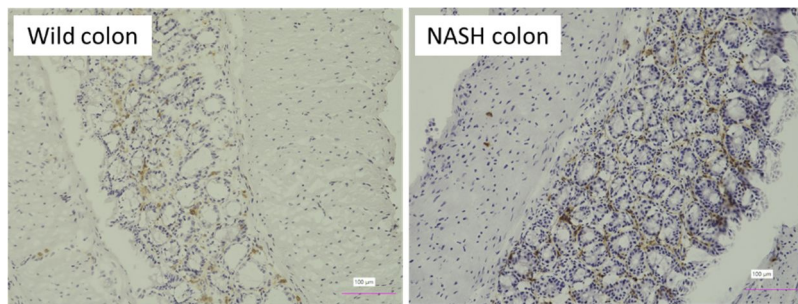
C57BL/6 マウスの腸管に C57BL/6 由来の大腸癌細胞株を移植し、syngeneic 大腸癌モデルマウスを作成した。基質としては BME(Basement Membrane Extract) を用いた。マウスは6週齢で解剖し、腫瘍サイズおよび最大腫瘍径を評価した。

更に C57BL/6 マウスおよび同マウスに高脂肪動脈硬化飼料を給餌し作成した NASH マウスの腸管に同様に大腸癌細胞株を移植し、syngeneic 大腸癌モデルマウスを作成し、腫瘍進展の相違を検討した。NASH マウスの腸管に移植した大腸癌細胞株は wild マウスへの移植と比較し、腫瘍径および腫瘍重量の有意な増大を認めており、NASH の腸管における大腸癌の増大が示唆された。

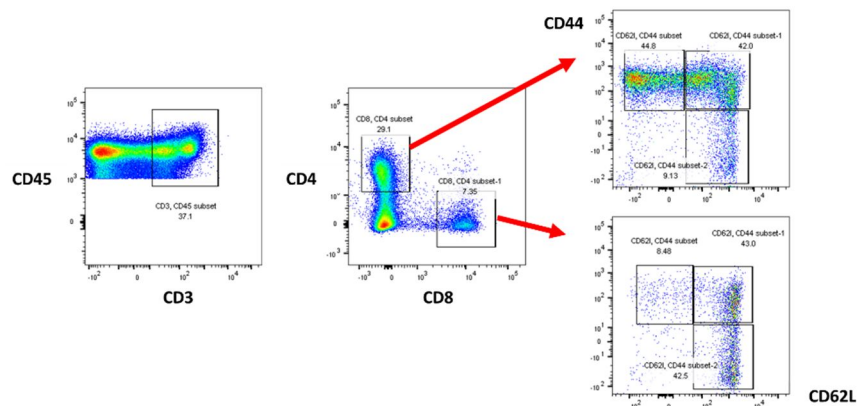


2) Syngeneic 大腸癌移植モデルの腸管局所環境における免疫細胞の動態の評価。

IHC では NASH モデルマウスの腸管において、CD45 陽性細胞数、CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数、CD11b 陽性細胞数が増加していることを見出した。一方で、F4/80 陽性細胞数や Gr-1 陽性細胞数などにおいては明らかな違いは認めなかった。



更に FCM を用いて、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞における effector memory T cell (EMT), central memory T cell (CMT) さらに naïve T 細胞 (nT) について検討を行った。CD4 陽性細胞においては EMT が NASH の腸管において有意に割合が多く、CD8 陽性細胞におい



ても同様の傾向を示した。更に、T 細胞の機能を検討するためにこれらの細胞における PD1 の発現について検討を行ったところ、NASH の腸管における EMT では CD4、CD8 いずれにおいても PD-1 の発現率が有意に高い傾向にあった。

また、NASH および wild の腸管より RNA を抽出し、microarray により網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、発がんおよび/または分化に関与する転写調節因子として機能する可能性が報告されている Trim29 遺伝子や、細胞増殖・分化あるいは細胞死のような多彩な細胞機能調節に関与する Atf3 など遺伝子発現に違いを認めた。

これらにより NASH は腸管における免疫動態の変化を介して大腸癌の増大に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究成果により NASH における腸管の免疫動態と大腸癌に与える影響を明らかとしたことは、NASH 患者の増加に伴い増加が予測される大腸癌に対する新たな予防法確立の基盤を創造しうる重要な社会的意義を持つ。

1. 著者名 Takata Noboru, Ishii Kiyoko, Takayama Hiroaki, Nagashimada Mayumi, Kamoshita Kyoko, Tanaka Takeo, Kikuchi Akihiro, Takeshita Yumie, Matsumoto Yukako, Ota Tsuguhito, Yamamoto Yasuhiko, Yamagoe Satoshi, Seki Akihiro, Sakai Yoshio, Kaneko Shuichi, Takamura Toshinari	4. 巻 11
2. 論文標題 LECT2 as a hepatokine links liver steatosis to inflammation via activating tissue macrophages in NASH	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 not available
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80689-0	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 Ho Tuyen Thuy Bich, Nasti Alessandro, Seki Akihiro, Komura Takuya, Inui Hiroyuki, Kozaka Takashi, Kitamura Yoji, Shiba Kazuhiro, Yamashita Taro, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Kawaguchi Kazunori, Wada Takashi, Honda Masao, Kaneko Shuichi, Sakai Yoshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Combination of gemcitabine and anti-PD-1 antibody enhances the anticancer effect of M1 macrophages and the Th1 response in a murine model of pancreatic cancer liver metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e001367 ~ e001367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2020-001367	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 Sakai Yoshio, Fukunishi Shinya, Takamura Masayuki, Inoue Oto, Takashima Shinichiro, Usui Soichiro, Seki Akihiro et.al	4. 巻 9
2. 論文標題 Regenerative Therapy for Liver Cirrhosis Based on Intrahepatic Arterial Infusion of Autologous Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Regenerative (Stem) Cells: Protocol for a Confirmatory Multicenter Uncontrolled Clinical Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JMIR Research Protocols	6. 最初と最後の頁 e17904 ~ e17904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2196/17904	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 Chen Han, Nio Kouki, Yamashita Taro, Okada Hikari, Li Ru, Suda Tsuyoshi, Li Yingyi, Doan Phuong Thi Bich, Seki Akihiro et.al	4. 巻 not available
2. 論文標題 BMP9 ID1 signaling promotes EpCAM positive cancer stem cell properties in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 not available
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12963	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 Torres Joana, Hu Jianzhong, Seki Akihiro, et. al	4. 巻 69
2. 論文標題 Infants born to mothers with IBD present with altered gut microbiome that transfers abnormalities of the adaptive immune system to germ-free mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 42~51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2018-317855	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 -

〔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 Akihiro Seki , Norihiko Ogawa, Alessandro Nasti, Tuyen Thuy Bich Ho, Yoshio Sakai, Taro Yamashita
2. 発表標題 Mesenchymal stem cells restore NASH by ameliorating ER stress in the local environment of the liver.
3. 学会等名 APASL 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小川 憲彦, 関 晃裕, 山下 太郎
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞によるNASHの肝局所環境における小胞体ストレス軽減を介した治療効果の検討
3. 学会等名 日本消化器関連学会週間 (JDDW) 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 The mesenchymal stromal cells ameliorated NASH cirrhosis by attenuating ER stress from hepatic stellate cells.
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Eishiro Mizukoshi
2. 発表標題 MESENCHYMAL STROMAL CELLS RESTORE THE NASH BY AMELIORATING ER STRESS OF HEPATOCYTES DERIVED FROM HEPATIC STELLATE CELLS.
3. 学会等名 AASLD2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 晃裕, 酒井 佳夫, 金子周一
2. 発表標題 間葉系幹細胞治療によるNASH肝細胞におけるJAG1・NOTCHシグナルを介した修復機構
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 晃裕, 酒井 佳夫, 金子 周一
2. 発表標題 肝非実質細胞・液性因子を介する脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝硬変修復治療機序
3. 学会等名 第57回肝臓学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 関 晃裕, 酒井 佳夫, 金子 周一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎マウスの小胞体ストレスと脂肪組織由来間質細胞投与による治療効果機序の検討
3. 学会等名 第107回消化器病学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 関 晃裕, 酒井 佳夫, 金子 周一
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞によるNotchシグナルを介した非アルコール性脂肪肝炎に対する治療効果機序
3. 学会等名 第21回JDDW
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Alessandro Nasti, Masatoshi Yamato, Kosuke Ishida, Hiroyuki Inui, Tuyen Thuy Bich Ho, Kazunori Kawaguchi, Takashi Wada, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Adipose tissue-derived stromal cells of steatohepatitis mice are useful for treatment of fibrosis-progressive NASH
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting Digital Experience 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 関 晃裕, 酒井 佳夫, 金子 周一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎マウスの小胞体ストレスと脂肪組織由来間質細胞投与による治療効果機序の検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------