

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02903

研究課題名(和文)肝細胞におけるp53活性化を起点とした肝前駆細胞由来発癌機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of hepatic progenitor cell-derived carcinogenic mechanism via p53 activation in hepatocytes

研究代表者

竹原 徹郎 (Takehara, Tetsuo)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肝疾患におけるp53の活性化は肝細胞死・細胞老化による慢性炎症を惹起し、肝前駆細胞を起源とする細胞非自律的な肝発癌を誘導することが示された。肝前駆細胞の造腫瘍性にはレチノイドシグナルの減弱が関与していることが示唆された。またレチノイド誘導体の非環式レチノイドによるレチノイド補充療法が発癌予防に有効であることが示された。本研究成果に基づき、慢性肝疾患に対する活性化p53を標的とした新規発癌予防法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肝疾患患者において活性化したp53が発がん予防の標的になる可能性が示されました。肝細胞がんはひとたび発症すると治療しても再発率が高いことが特徴で、本邦におけるがんの死因の第5位を占める難治がんです。これまで肝細胞がんの予防には、肝炎ウイルスに対する抗ウイルス療法など、慢性肝疾患の原因に対する治療以外に方法がありませんでしたが、本研究により新たな肝発がん予防法の開発に繋がる可能性があります。本研究に用いたペレチノインはこれまで肝細胞がんの発症を抑える効果が報告されている薬剤であり、p53の活性化した慢性肝疾患患者において初の「がん予防薬」になる可能性が期待できます。

研究成果の概要(英文)：Activation of p53 in chronic liver disease has been shown to induce chronic inflammation through hepatocyte death and cell senescence, leading to non-cell autonomous liver carcinogenesis originating from liver progenitor cells. It has been suggested that the tumorigenicity of liver progenitor cells is associated with attenuation of retinoid signaling. Additionally, retinoid supplementation therapy with non-cyclic retinoids has been shown to be effective in preventing carcinogenesis. Based on these research findings, the development of a novel cancer prevention method targeting activated p53 in chronic liver disease is expected.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝細胞癌 p53 細胞老化 肝前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

肝細胞は、慢性肝疾患において、多彩な傷害刺激に曝されており、ストレス応答の一つとして p53 が活性化している。研究代表者は、Kras 変異肝発癌モデルマウス (Alb-Cre Kras<sup>G12D</sup>; LiK マウス) において p53 の分解を誘導する Mdm2 を肝細胞特異的に欠損させて、p53 を蓄積・活性化させた (Alb-Cre Kras<sup>G12D</sup> Mdm2<sup>fl/fl</sup>; LiKM マウス)。その結果、Mdm2 欠損のない造腫瘍性を有する肝前駆細胞集団が出現し、その後 Mdm2 欠損のない肝癌がこの前駆細胞マーカー陽性細胞集団から発生してくることを見出した。このことは、ストレス刺激により p53 が活性化した肝細胞は、細胞間ネットワークを介して直接ストレス刺激を受けていない細胞から肝癌を惹起することを示唆している。しかし、p53 活性化肝細胞による肝前駆細胞誘導機序やその起源細胞、肝前駆細胞の癌化機構については不明である。

2. 研究の目的

上記のような背景をもとに、本研究課題では、慢性肝疾患における肝細胞の p53 活性化が、肝臓を構成する多彩な細胞との間で行われる細胞間情報伝達ネットワークを介して、肝前駆細胞由来肝発癌を惹起する機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

LiKM マウスの背景肝 (非癌部肝組織) を用いて RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を行い、発癌促進に寄与する gene signature の同定を試みた。また LiKM マウスに認められる肝前駆細胞をレーザーマイクロダイセクション法により肝組織より抽出し、RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を行った。さらに肝前駆細胞をオルガノイドとして単離し、造腫瘍性に寄与するゲノム不安定性について ex vivo での解析を行った。さらに、Mdm2 欠損により誘導された表現型が p53 依存的に生じていることを確認するため、肝細胞特異的 Mdm2・p53 欠損 Kras 変異肝発癌モデルマウス (Alb-Cre Kras<sup>G12D</sup> Mdm2<sup>fl/fl</sup> p53<sup>fl/fl</sup>; LiKMP マウス) を作製した。

また慢性肝疾患患者の肝組織を用い、LiKM マウスにおいて認められた gene signature と p53 の関連について臨床検体での検証を行った。

4. 研究成果

**肝細胞における p53 活性化による細胞死・細胞老化と慢性炎症および肝前駆細胞の誘導**

LiKM マウスでは p53 およびその標的遺伝子である p21 陽性肝細胞を多数認め、肝細胞における p53 の活性化を確認した (図 1)。背景肝組織を用いた RNA シークエンスにおいて、LiKM マウスでは LiK マウスに比し細胞死・細胞周期・DNA 修復に関連する gene signature の亢進を認め、p53 の機能的活性化が示唆されるとともに、炎症関連の gene signature の亢進を認めた。また LiKM マウスは LiK マウスに比し血清 ALT 値が有意に高く、肝障害の存在が示唆された。

LiKM マウスの背景肝では肝細胞のアポトーシスおよび細胞老化が生じるとともに、著明な炎症細胞浸潤を認めた (図 1)。また肝組織において炎症性サイトカイン・ケモカインの発現上昇を認めたが、これは肝細胞に特異的であり、非実質細胞分画においては発現上昇は認められなかったことから、肝細胞の senescence-associated secretory phenotype (SASP) による変化であると考えられた。さらに LiKM マウスの肝細胞は leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM) など、肝前駆細胞の増殖・活性化を促進する因子を高発現していた。これらのことから、p53 の活性化した肝細胞が種々の液性因子を分泌し、慢性炎症を誘導するとともに肝前駆細胞の活性化を促していることが明らかとなった。

LiKM マウスにおいてさらに肝細胞特異的に p53 を欠損させると (LiKMP マウス)、LiKM マウスにおいて認められた肝障害、肝細胞アポトーシス、細胞老化、炎症細胞浸潤、肝前駆細胞は全て消失し、肝発癌も抑制された (図 1)。このことから、LiKM マウスで生じた表現型は全て p53 依存的に生じていることが示された。

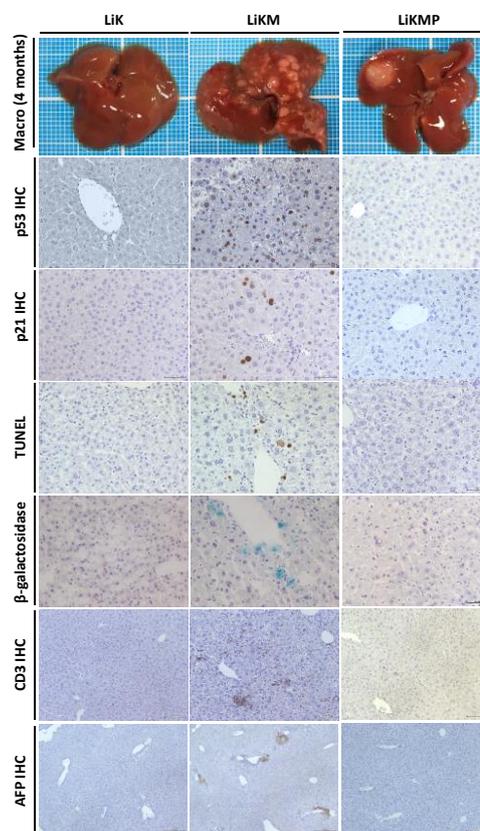


図 1. LiKM マウスにおける p53 依存的な肝細胞死・細胞老化・炎症細胞浸潤と肝発癌

## ・肝前駆細胞におけるレチノイドシグナルの減弱とレチノイド誘導体による発癌抑制

LiKM および LiK マウスより肝前駆細胞をオルガノイドとして単離すると、LiKM マウスの肝臓は高いオルガノイド形成能を認めた。さらに LiKM マウス由来のオルガノイドは免疫不全マウスへ移植すると、造腫瘍性を示した。造腫瘍性の獲得に関与する因子について探索するため LiKM および LiK マウス由来オルガノイド構成細胞の染色体解析を行うと、LiKM 由来オルガノイドは核型異常を呈する細胞の割合が多く、染色体不安定性を有することが明らかとなった (図 2)。

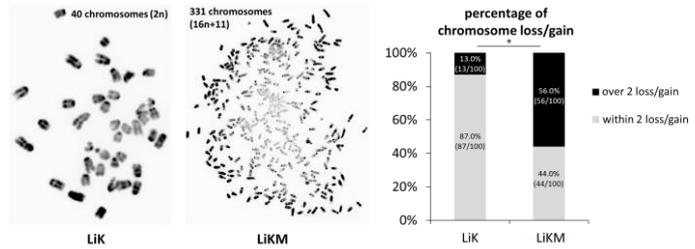


図 2. LiKM マウス由来オルガノイドにおける核型異常

さらに肝細胞と比較した肝前駆細胞の特性について明らかにするため、LiKM マウスの肝前駆細胞および肝細胞をそれぞれ AFP 免疫染色陽性・陰性細胞として肝組織よりレーザーマイクロダイセクション法により単離し、RNA シークエンスによる Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行った。その結果、AFP 陽性肝前駆細胞では、AFP 陰性細胞に比しレチノール代謝シグナルの減弱を認めた (図 3)。

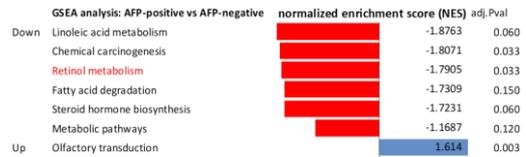


図 3. LiKM マウス AFP 陽性肝前駆細胞におけるレチノール代謝シグナルの減弱

レチノイドシグナルの減弱は初期の発癌過程において一般に認められる代謝異常である。肝臓においてもレチノイドシグナルが抑制された状態においては発癌を来しやすいことが知られている。そこでレチノイドの補充により肝前駆細胞のレチノイドシグナルの活性化を促すことで、LiKM マウスの肝発癌を予防できる可能性があると考えた。レチノイド誘導体の非環式レチノイド (ACR) を LiKM マウス由来オルガノイドおよび肝前駆細胞株に添加すると、胆管系マーカーの発癌低下を認め、細胞増殖の減弱を認めたことから、ACR が肝前駆細胞の分化を誘導することが示唆された。ACR を LiKM マウスに投与すると肝前駆細胞の出現・拡大が抑制され、肝発癌が著明に抑制された (図 4)。

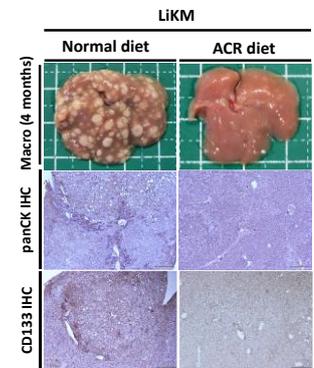


図 4. LiKM マウスにおける ACR による肝前駆細胞増殖抑制および発癌抑制効果

## ・慢性肝疾患臨床検体における p53 の活性化と慢性炎症・肝前駆細胞・肝発癌の関連

p53 と肝細胞アポトーシス・細胞老化、慢性炎症、肝前駆細胞、肝発癌との関連について、臨床検体を用いた検証を行った。慢性肝疾患患者 182 例と正常肝症例 (背景肝疾患のない転移性肝癌症例) 23 例で肝生検組織中の p21 遺伝子の発現を比較すると、慢性肝疾患患者のほうが高発現しており、p53 シグナルの活性化が示唆された。また慢性肝疾患患者において p21 の発現はアポトーシス、細胞老化・SASP、肝前駆細胞関連遺伝子の発現と正の相関を認めた。C 型慢性肝疾患患者 144 例において、p21 を高発現する症例は低発現症例に比し累積肝発癌率が有意に高かった (図 5)。

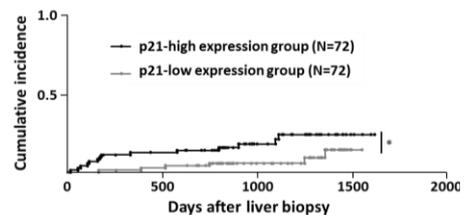


図 5. C 型慢性肝疾患 144 例における肝組織中 p21 発現量別累積肝細胞癌発生率

以上の結果から、慢性肝疾患における p53 の活性化は肝細胞死・細胞老化による慢性炎症を惹起し、肝前駆細胞を起源とする細胞非自律的な肝発癌を誘導することが示された (図 6)。肝前駆細胞の造腫瘍性にはレチノイドシグナルの減弱が関与していることが示唆され、ACR によるレチノイド補充療法が発癌予防に有効であることが示された。本研究成果に基づき、慢性肝疾患に対する活性化 p53 を標的とした新規発癌予防法の開発が期待される。

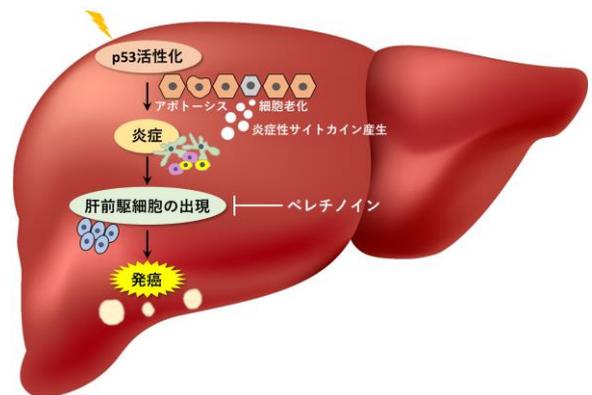


図 6. 慢性肝疾患における p53 活性化による発癌促進機序

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 Makino Yuki, Hikita Hayato, Fukumoto Kenji, Sung Ji Hyun, Sakano Yoshihiro, Murai Kazuhiro, Sakane Sadatsugu, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Kondo Jumpei, Kobayashi Shogo, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 82
2. 論文標題 Constitutive Activation of the Tumor Suppressor p53 in Hepatocytes Paradoxically Promotes Non-Cell Autonomous Liver Carcinogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2860 ~ 2873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-4390	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Jihyun Sung, Hayato Hikita, Yuki Makino, Seiya Kato, Yoichi Sasaki, Kenji Fukumoto, Kazuhiro Murai, Kunimaro Furuta, Akira Nishio, Takahiro Kodama, Tomohide Tatsumi and Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Activation of hepatocyte p53 triggers acute liver failure with multiple organ injury.
3. 学会等名 AASLD2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 疋田隼人、牧野祐紀、竹原徹郎
2. 発表標題 肝細胞のP53活性化による肝発癌促進機構
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayato Hikita, Yuki Makino, Kenji Fukumoto, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Sustained hepatocyte p53 activation induces non-cell autonomous liver carcinogenesis
3. 学会等名 APASL Oncology 2022 in Takamatsu (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野祐紀 疋田隼人 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 Yuki Makino, Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Constitutive activation of hepatocyte p53 paradoxically promotes liver carcinogenesis derived from hepatic progenitor cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Makino, Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Activation of tumor suppressor p53 in hepatocytes paradoxically promotes liver carcinogenesis derived from hepatic progenitor cells.
3. 学会等名 SH International Liver Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Makino Hayato Hikita Tetsuo Takehara
2. 発表標題 CTGF is an intercellular mediator to stimulate hepatic stellate cells and promote hepatic fibrosis
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 陽一、疋田 隼人、牧野 祐紀、小玉 尚宏、阪森 亮太郎、巽 智秀、竹原 徹郎
2. 発表標題 肝類洞内皮細胞が産生する CTGF による肝星細胞の活性化と線維化進展
3. 学会等名 第35回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

がん抑制遺伝子の働き過ぎでもがんに ~ 肝臓における新たな発がんメカニズムの解明 ~  
<https://www.med.osaka-u.ac.jp/activities/results/2022year/takehara2022-6-16>

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	巽 智秀  (Tatsumi Tomohide)  (20397699)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	疋田 隼人  (Hikita Hayato)  (20623044)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師   (14401)	

	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
研究協力者	牧野 祐紀  (Makino Yuki)  (60771334)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)   (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
---------	---------