

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03372

研究課題名(和文) NASHにおける肝発癌機構の解明と抗酸化nano-medicineによる発癌抑止

研究課題名(英文) Elucidation of hepatocarcinogenesis mechanism in NASH and inhibition of hepatocarcinogenesis by antioxidative nanoparticles

研究代表者

鈴木 英雄 (Suzuki, Hideo)

筑波大学・プレジジョン・メディシン開発研究センター・客員教授

研究者番号：00400672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化レドックス粒子(RNPO)は、悪玉活性酸素種を選択的に消去し顕著な抗酸化作用を発揮することより、NASHモデルのSqstm1:Nrf2遺伝子二重欠失(DKO)マウスにおける肝線維化と肝発癌を抑止した。ヒト慢性肝疾患におけるNRF2の発現と細胞内局在を解析した結果、NRF2の肝細胞における染色強度は、肝炎症、線維化と有意に関連し、それらの高度な症例ではNRF2の染色強度が低下していた。また、核局在・濃染が高度の症例では、炎症・線維化が高度であった。RNPOはNRF2の発現低下により生体の抗酸化作用が低下した個体において、肝炎症・線維化の進展を抑止する生体材料として有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗酸化レドックス粒子(RNPO)は環境応答能を有する抗酸化剤を含むナノ粒子である。本研究では、悪玉ROSsに対して優れた選択的消去能を発揮して、NASHモデルにおいて肝炎症・線維化を抑止することが実験的に解明できた。また、RNPOには腸内細菌叢の多様性を回復させ、Gut-Liver axisを介して、肝障害を引き起こす有害な種々の腸管由来の生物学的因子の影響を軽減するポテンシャルがあることも解明できた。今後のNASHに対する予防・治療のための新薬候補となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral administration of antioxidative nanoparticles (RNPO) inhibited liver fibrosis and prevented HCC development in p62/Sqstm1 and Nrf2 double knockout (DKO) mice through exerting potent anti-oxidative actions and suppressing inflammation by scavenging ROS. In the immunohistochemistry of Nrf2 in chronic liver diseases, hepatic inflammation and fibrosis were more severe in the low-intensity NRF2 group than in the high-intensity NRF2 group. The dense staining of NRF2 in the nuclei of non-tumor hepatocytes positively correlated with liver inflammation and fibrosis. Taken together, RNPO may be a potent biomaterial which attenuates aggravation of chronic liver diseases in the individuals associated with decreased antioxidative defense action.

研究分野：健康応用科学

キーワード：NASH RNP p62 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦では肝癌死亡者が年間約 3 万人に上る. 近年では肥満, 糖尿病を随伴する nonalcoholic steatohepatitis(NASH)由来の肝癌死の比率が増加している(Cancer 2020). NASH は肝以外に複数の臓器が関連して発症・進展する慢性肝疾患である. NASH からの発癌メカニズムに関しては, 多方面からのアプローチが展開されている.

(2) NASH 発症と肝発癌には Gut-Liver axis が存在する(Hepatology 2009).腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)は NASH 肝発癌に深く関与することが想定されている. Dysbiosis は高 LPS 血症を引き起こす(Diabetes 2008). 肝発癌を誘導する腸内細菌の役割では, LPS が toll-like receptor 4 (TLR4)のリガンドとして肝発癌のプロモーションさせることが報告されている(Cancer Cell 2012).

(3) 近年の肝癌ゲノム解析では, 生体側の抗酸化ストレス応答の障害が肝発癌に関与すると示唆される(Nat Genet 2014). Nrf2 は LPS の炎症シグナル活性化を抑制する生体因子である(J Clin Invest 2006). 加齢による Nrf2 機能の減弱は生体における酸化ストレス産物を増加させる(Free Radic Biol Med 2015).

(4) Kelch-like ECH-associated protein1 (KEAP1) -nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) システムは, 酸化ストレスに対する主要な生体防御機構である. しかしながら, ヒト慢性肝疾患の肝炎・線維化など病態進展における NRF2 の発現挙動や肝細胞癌進展における役割は, 検体採取の困難性や症例集積の困難性などにより詳細は明らかではない.

(5) *Sqstm1:Nrf2* 遺伝子二重欠失(DKO)マウス(特許第 6020791 号)はヒトメタボリック症候群のモデルである(*Exp Anim* 2018). NASH と肝癌を自然発症する. 過食による dysbiosis, LPS の産生増大, 腸管のバリア機能低下, Kupffer 細胞(肝 M ϕ)の LPS 貪食能の減弱と過剰な炎症応答が重要な因子である. 余剰の LPS は肝星細胞の Toll-like receptor 4 の下流シグナル活性化により, NASH 発症と肝発癌を促進する.

(6) 研究協力者の長崎は高分子ポリマーに抗酸化剤を共有結合させた抗酸化 nano-medicine(RNP^o)を開発した(図 1). RNP^o は LPS と会合して M ϕ , 好中球が産生する ROSs を選択的に消去する.

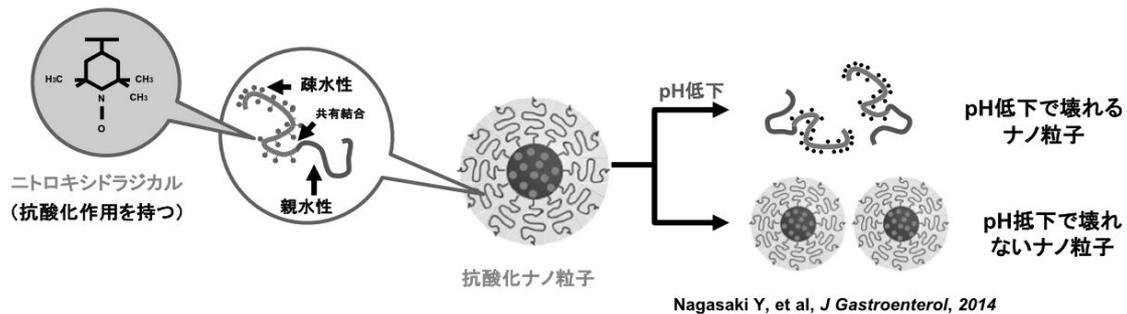


図 1 : 抗酸化ナノ粒子 (RNP^o)

2. 研究の目的

生体の抗酸化ストレス応答機能の減衰した DKO マウスに対して, 高脂肪/ショ糖食による高 LPS 血症の病態を増悪させ, NASH 発症と肝発癌の促進状態を誘導する. そして, 本 DKO マウスに対して RNP^o を長期間経口投与し, RNP^o が Gut-Liver axis のルートを通じて LPS による肝の炎症性障害を軽減し, NASH と肝発癌を抑制するかを検証する.

3. 研究の方法

(1) 通常食(NASH モデル), または, 60%高脂肪食(HCC モデル)を摂餌させた雄性の DKO マウスに対して, RNP^o を 26 週間, 自由飲水投与した(約 10 mg/日). 32 週齢でと殺し, 体組成, 血液生化学検査, 肝病理解析(steatosis activity fibrosis score; SAF score), 肝組織の炎症線維化因子の qPCR 解析, 肝組織の酸化ストレスおよび RNA シークエンスの解析, 更に, 糞便中の腸内細菌叢解析により, NASH 肝病態を比較解析した.

(2) 対象は肝切除手術により採取した, 非腫瘍部と癌部(肝細胞癌部, 大腸癌肝転移)を含む肝臓標本について, Hematoxylin-Eosin(H.E.), Masson's trichrome(MT)染色を行った. 肝脂肪化・炎症・線維化を, NASH は steatosis activity fibrosis (SAF) スコア, CH c は新犬山分類にて評価し, NRF2 について免疫組織学的解析を行った. NRF2 の染色強度と, NRF2 の核局在および核濃染 (NRF2 は核に移行して活性化)に着目し, 非腫瘍部および肝細胞癌部の肝病理組織との比較解析した.

4. 研究成果

(1) 通常食摂餌 DKO マウスの対照群(C)と RNP⁰ 投与群(R)では, mortality や体重変化, 解剖時の肝重量, 白色脂肪組織重量に差を認めなかった. 肝病理評価(SAF score)(図2)では, 脂肪化は S 群で高値である一方(C: 0.9 ± 0.1 , S: 1.4 ± 0.2), 炎症には差はなく(C: 1.2 ± 0.1 , S: 1.0 ± 0.0), 線維化は S 群で有意に抑制されていた(C: 1.1 ± 0.1 , S: 0.2 ± 0.1). 血液生化学による肝障害は, 両群間で有意な差を認めなかった. S 群では, *Tnf- α* , *Il-6*, *Trl4*, *Tlr9* などの肝炎症シグナルに関わる因子, *Tgf- β 1*, *Colla1*, *α -Sma* などの肝線維化に関わる因子が抑制されていた. また, 酸化ストレスマーカーである Malondialdehyde, Hexanoyl-lysine が S 群で有意に抑制されていた.

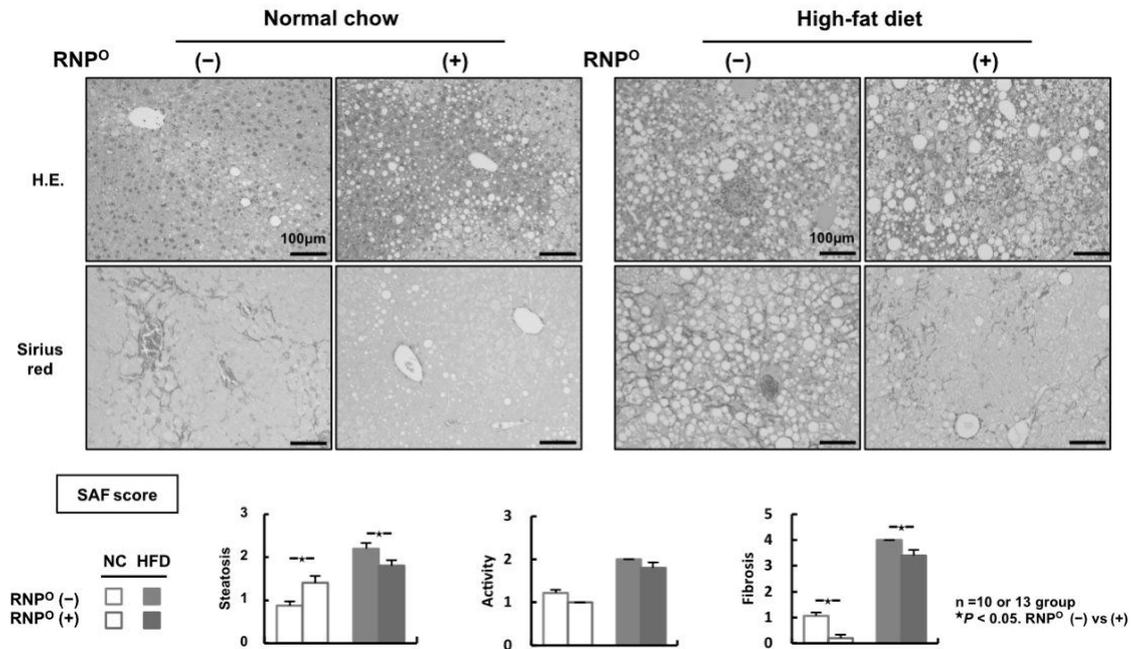


図2 : RNP⁰ 投与は肝線維化を抑制する

高脂肪食摂餌 DKO マウスでは, 対照群(HC)で 17 / 52 例(33%)に肝癌が認められたのに対し, RNP⁰ 投与群(HR)では明らかな肝癌発生は認められなかった(0 / 10 例)(図3). また, HR 群の線維化は有意に抑制されていた(HC : 4.0 ± 0.0 , HS : 3.4 ± 0.2). HR 群では, 肝臓における血清リポ多糖(LPS)濃度とLPS 結合タンパク質(LBP)の発現は, HC 群と比較して有意に低値であった(図4). また, 腸内細菌叢のゲノム解析では, HC 群と比較して HR 群の腸内細菌の種多様性(diversity)が増大しており(図5), LPS 産生菌やプロバイオティクス関連菌を含む腸内細菌叢の組成に変化が見られた.

(2) さらに, RNP⁰ は, 通常食群および高脂肪食群の両群で ER ストレスシグナル伝達遺伝子, HCC driver gene, および cancer pathway gene の発現を抑制した. 特に高脂肪食群において, PI3K-Akt シグナル伝達遺伝子の発現を減少させた.

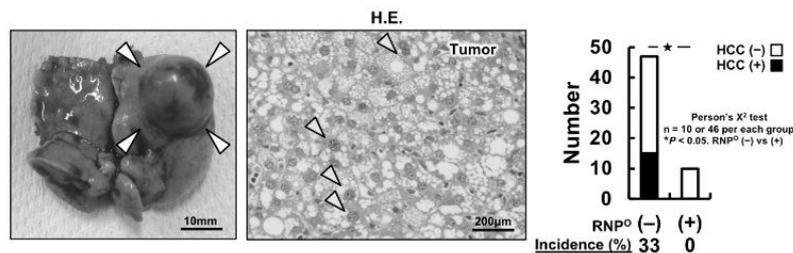


図3 : RNP⁰ 投与は肝癌発生を抑制する

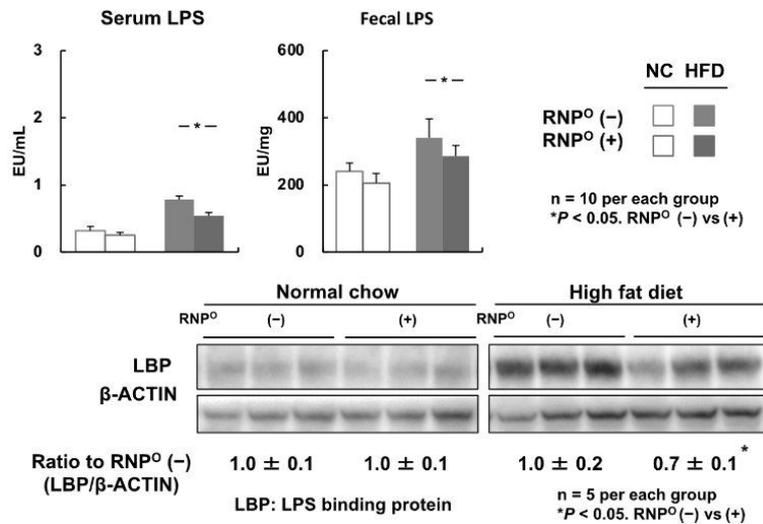


図4：RNP⁰投与はLPSを抑制する

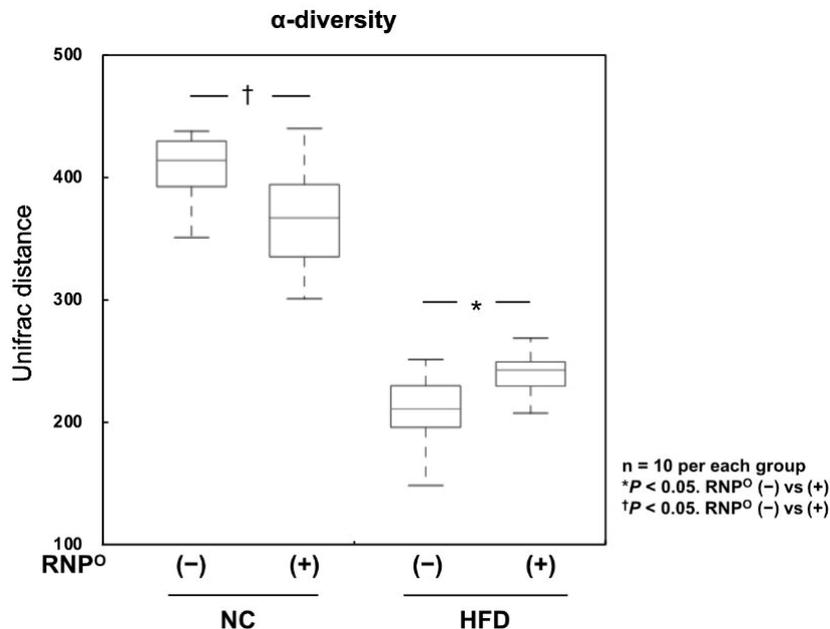


図5：RNP⁰投与は腸内細菌叢の種多様性を改善する

(3) NRF2 の非腫瘍部における肝細胞の染色強度は、慢性肝疾患(NASH および CHc)の非腫瘍部における病理学的肝炎、線維化と有意に関連し、肝の炎症や線維化の高度な症例では NRF2 の染色強度が低下していた(図6)。CRC と NASH の比較(低強度群 vs. 高強度群：炎症； $P = 0.003$ ，線維化； $P = 0.014$)においても、CRC と CHc の比較(低強度群 vs. 高強度群：炎症； $P = 0.031$ ，線維化； $P = 0.011$)においても、NRF2 の染色が低強度である群の方が高強度群よりも肝の炎症線維化が重症であった。このことは、肝細胞の細胞質における NRF2 の発現が、非腫瘍部における肝臓の炎症と線維化と逆相関していることを示している。また、非腫瘍部肝細胞の核における NRF2 の局在と核濃染(核移行)については、炎症(CRC と NASH； $R = 0.451$ ， $P < 0.001$ ，CRC と CHc； $R = 0.502$ ， $P < 0.001$)および線維化(CRC と NASH； $R = 0.566$ ， $P < 0.001$ ，CRC と CHc； $R = 0.548$ ， $P < 0.001$)と相関を認め、核局在および核濃染が高度の症例では、肝炎症・線維化が高度であった。

(4) 肝細胞癌部では、全例で NRF2 の核への局在を認めたが、癌の分化度や病期などの病態と、NRF2 の染色強度や核移行との相関は認めなかった。

(5) 考察として、本研究の結果より、RNP⁰ は肝における酸化ストレス、ER ストレスの発生を軽減し、肝線維化を抑制することより肝発癌を抑制するものと考えられた。また、RNP⁰ が腸内細菌叢の種多様性を改善し、腸から流入する LPS を減少させることにより、「腸-肝連関」の観点から、NASH のみならず肝癌に対しても予防効果があることを示した。

ヒト慢性肝疾患における NRF2 の発現と細胞内局在を解析した結果 ,NRF2 の肝細胞における染色強度は ,肝炎症 ,線維化と有意に関連し ,それらの高度な症例では NRF2 の染色強度が低下していた .RNP^o は NRF2 の発現低下により生体の抗酸化作用が低下した個体において ,肝炎症・線維化の進展を抑止する生体材料として有用であると考えられた .

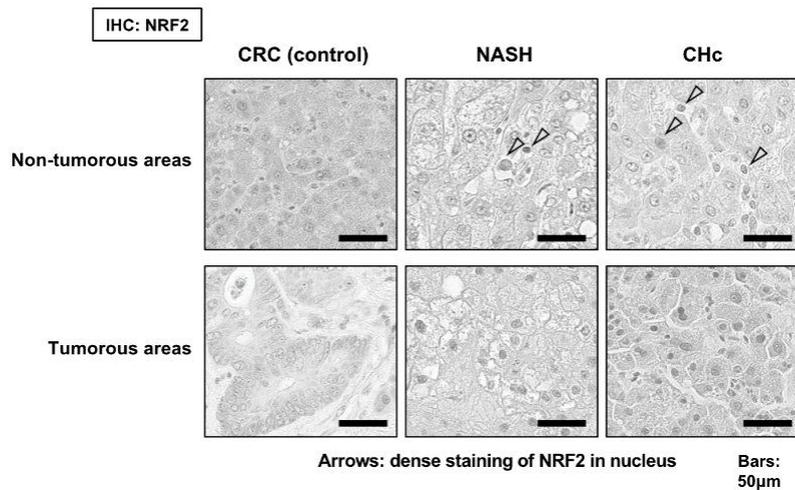


図 6 : 慢性肝疾患における NRF2 の免疫染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Yamanashi Y, Tanaka Y, Ogata Y, Toyoda Y, Oshida N, Okada K, Shoda J, Suzuki H	4. 巻 156
2. 論文標題 Hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 exacerbates non-alcoholic fatty liver disease by re-absorbing specific biliary oxysterols	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.113877	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 Miura I, Okada K, Ishii A, Warabi E, Watahiki T, To K, Shimano H, Ariizumi S, Shoda J	4. 巻 13
2. 論文標題 p62/Sqstm1 rescue in muscle retards the progression of steatohepatitis in p62/Sqstm1-null mice fed a high-fat diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 993995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.993995	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 Watahiki T, Okada K, Miura I, To K, Tanaka S, Warabi E, Kanno N, Yamagata K, Gotoh N, Suzuki H, Ariizumi S, Tsuchiya K, Nagasaki Y, Shoda J	4. 巻 11
2. 論文標題 Antioxidative Self-Assembling Nanoparticles Attenuate the Development of Steatohepatitis and Inhibit Hepatocarcinogenesis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11101939	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 T.Takayama, H.Suzuki, K.Okada, S.Akiyama, T.Narasaka, K.Maruo, T.Sakamoto, E.Seo, K.Tsuchiya	4. 巻 61
2. 論文標題 The Optimal Cut-off of the Latex Immunoassay (LZ Test) for Helicobacter pylori Infection Based on the Stool Antigen Test and Helicobacter pylori-associated Gastritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 2103-2109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.8659-21	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 Mukherjee P, Miyazawa A, Fukuda S, Yamashita T, Lukmanto D, Okada K, El-Sadek I A, Zhu L, Makita S, Oshika T, Yasuno Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Label free functional and structural imaging of liver microvascular complex in mice by Jones matrix optical coherence tomography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Reps	6. 最初と最後の頁 20054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98909-6	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 -

1. 著者名 Okada K, Watahiki T, Horie M, Takayama T, Aida Y, To K, Shida T, Ishige K, Suzuki H, Nishiyama H, Shoda J	4. 巻 100
2. 論文標題 The prevalence and clinical implications of pancreatic fat accumulation identified during a medical check-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e27487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000027487	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 Uchida F, Oh S, Shida T, Suzuki H, Yamagata K, Mizokami Y, Bukawa H, Shoda J	4. 巻 18
2. 論文標題 Exercise practice induces beneficial effects on periodontal disease conditions - Oral microbiota and saliva analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Environ Res & Public Health	6. 最初と最後の頁 3470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18073470	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 Okada K, Watahiki T, Horie M, Takayama T, Aida Y, To K, Shida T, Ishige K, Suzuki H, Nishiyama H, Shoda J	4. 巻 100
2. 論文標題 The prevalence and clinical implications of pancreatic fat accumulation identified during a medical check-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine in Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 e27487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000027487	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 Miura I, Komine S, Okada K, Wada S, Warabi E, Uchida F, Oh S, Suzuki H, Mizokami Y, Shoda J	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevention of non-alcoholic steatohepatitis by long-term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Reps	6. 最初と最後の頁 e14859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14859	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10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 陶経緯、岡田浩介、綿引隆久、正田純一、鈴木英雄
2. 発表標題 腸管上皮細胞のNrf2はデキストラン硫酸ナトリウム誘発マウス大腸炎を防御する
3. 学会等名 第64回日本消化器病学会大会 (JDDW2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山敬子、鈴木英雄、岡田浩介、秋山慎太郎、奈良坂俊明、坂本琢、土屋 輝一郎
2. 発表標題 ヘリコバクターピロリ未感染予測式による未感染診断精度の妥当性の検討
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木英雄、高山敬子、齋藤洋子
2. 発表標題 胃がんX線検診の隔年実施の妥当性の検討
3. 学会等名 第64回日本消化器病学会大会 (JDDW2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦征, 岡田浩介, 石井亜紀子, 正田純一
2. 発表標題 骨格筋のp62は筋-肝連関を介して脂肪性肝炎の炎症・線維化を抑制する
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦征, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 骨格筋のNrf2は筋-肝連関を介してマウスNASHの肝炎症・線維化を抑制する
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦征, 岡田浩介, 石井亜紀子, 綿引隆久, 陶経緯, 正田純一
2. 発表標題 骨格筋のNrf2は筋-肝連関を介してNASHの発症を抑制する
3. 学会等名 第26回日本肝臓学会大会 (JDDW2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Okada K, Watahiki T, Shoda J
2. 発表標題 p62/SQSTM1 in hepatocytes plays a protective role against the development of steatohepatitis in mice
3. 学会等名 第25回日本肝臓学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) はp62およびNrf2遺伝子二重欠失マウス脂肪性肝炎の線維化を抑制する
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿引 隆久, 岡田 浩介, 正田 純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) は脂肪性肝炎モデルにおける肝線維化と発癌を抑制する
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 陶 経緯, 綿引 隆久, 岡田 浩介, 石毛 和紀, 鈴木 英雄, 有泉 俊一, 山本 雅一, 正田 純一
2. 発表標題 NASH進行とNASH肝癌におけるautophagy調節因子p62の役割
3. 学会等名 第25回日本肝臓学会大会
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
研究 分担者	磯辺 智範 (Isobe Tomonori) (70383643)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岡田 浩介 (Okada Kosuke) (80757526)	筑波大学・附属病院・病院講師 (12102)	
研究分担者	正田 純一 (Shoda Junichi) (90241827)	筑波大学・医学医療系・客員教授 (12102)	

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