

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07135

研究課題名(和文)代謝ストレスにより誘導される新規肝がんモデルの作製と機能解析

研究課題名(英文)Development and functional analysis of a novel liver cancer model induced by metabolic stress

研究代表者

岡田 斉 (Okada, Hitoshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20280620

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)：近年、生活習慣病に強く関連する非アルコール性脂肪肝炎が原因とされる肝癌の割合が世界的に増加傾向にある。しかしながら、メタボリック症候群に伴う肝がん発症の分子機序の詳細、サブタイプ特異的な治療標的等、不明な点が残されている。MHC class 領域に存在するBAT3 (BAG6)に着目し、肝特異的 Bat3欠損マウスを用いて、高脂肪食摂取により誘導される肝がんの発症・進展におよぼすBat3欠損の影響を検討した。Bat3欠損により肝がんの発症・進展が促進された。また、網羅的遺伝子発現解析、質量分析により、MYC、EGF経路の活性化を伴う肝がんであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ウイルス性感染や自己免疫性肝炎よりも、生活習慣病に起因する非アルコール性脂肪肝炎に起因する肝癌の割合が世界的に増加傾向にある。しかしながらメタボリック症候群に伴う肝がん発症の分子機序の詳細、サブタイプ特異的な治療標的等、不明な点が多い。本研究の成果はNASHに伴う肝癌発症・進展にBAT3が重要な役割を果たすことが示唆され、今後の治療標的開発につながることで強く予想される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, there's been a global increase in liver cancers linked to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), more associated with lifestyle diseases than with viral infections or autoimmune hepatitis. Many details, like the molecular mechanisms of liver cancer associated with metabolic syndrome and specific therapeutic targets, remain unclear. We analyzed the effects of liver-specific Bat3 deficiency in mice on liver cancer development and progression induced by a high-fat diet. Bat3 deficiency accelerated liver cancer, suggesting it involved activation of the MYC and EGF pathways, as shown by genetic analysis and mass spectrometry. Analysis of a human liver cancer database also revealed cases with BAT3 mutations.

研究分野：癌、細胞死、エピジェネティクス

キーワード：肝がん メタボリック症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は肝癌の大部分を占め、近年、ウイルス感染や自己免疫性肝炎よりも、生活習慣病に強く関連する非アルコール性脂肪肝炎が原因とされる肝癌の割合が世界的に増加傾向にある。また、ヒト肝がんの分子サブタイプ分類では TP53 変異/MYC 機能の亢進を示すタイプ、CTNNB1 遺伝子変異を有するタイプ、メタボリック症候群に伴うタイプの 3 群に分類され、転移、治療応答性の違いが報告されている (Harding et al. *Clin Cancer Res* 2019, Pfifer et al. *Nature* 2021, Pinyol et al. *J Hepatol* 2021)。しかしながら、非アルコール性脂肪肝炎による肝癌発症機序の詳細、サブタイプ特異的な治療標的等、未解明な点が残されている。

BAT3 (BAG6) は、human major histocompatibility complex (MHC) 領域の網羅的シーケンスの過程で、ヒト染色体 6 番の MHC classIII 領域に存在する BAT1-BAT5 と命名された遺伝子クラスター内に存在する機能不明な遺伝子として同定された (Science 1989; PNAS 1990)。BAT3 の生物学的機能は長い間不明であったが、Kornbluth 博士の研究グループにより、BAT3 による分子シャペロンとアポトーシス制御機能が示された (EMBO J. 1999, 2001)。この報告に続き、BAT3 が TP53 機能、プロテアソーム機能、分子シャペロン、免疫応答に関与するという一連の報告が我々と (Genes Dev. (2007), J Cell Biol. (2008), Cell death & Disease (2011), Nature Medicine (2012))、他のグループから為された。これまでの我々の予備実験結果から、BAT3 が肝臓における代謝制御、炎症反応の制御を介して肝がん発症に重要な役割を果たしていることが強く示唆される。

また、BAT3 変異はヒト大腸がん、肺がん、炎症性疾患のリスクファクターとなる可能性が報告されている。しかしながら、これまでに個体レベルでの肝臓に関する詳細な検討は行われていない。独自に樹立したマウスモデルを用いて、BAT3 の個体レベルでの機能解析に焦点を当て、BAT3 の機能異常が個体レベルでの肝がん発症にどのような影響を与えるかを明らかにする。

2. 研究の目的

これまで BAT3 ががん抑制遺伝子として機能することが強く示唆されているが、BAT3 欠損の発がんへの影響を検証可能な個体モデルは報告が無い。申請者は、予備実験として肝特異的 Bat3 欠損を作成し、生化学的・分子生物学的手法を用いた解析を行い、肝がんが自然発症することを見出した (未発表)。近年、脂質代謝異常症が原因とされる肝がん症例が世界的に増加傾向にある。そこで本研究では、代謝性肝障害に関与する BAT3 シグナルの制御機構を解明する。

- (1) BAT3 の代謝ストレス下における役割の解明
- (2) 肝細胞における BAT3 の PI3K/Akt/mTOR 経路における役割の解明
- (3) 代謝異常の基盤となる遺伝子発現パターンの解明およびヒト肝がんとの比較解析

3. 研究の方法

独自に作成した、10 世代以上 C57BL6/J に戻し交配した、肝特異的 Bat3KO マウス (Bat3LKO: Bat3^{flox/flox}; Albumin-Cre) を用い、BAT3 の代謝ストレス下における役割を明らかにする。

- (1) BAT3 の代謝ストレス下における役割の解明

Bat3LKO、野生型マウスを正常食または高脂肪食で摂餌し、継続的な体重、随時血糖測定を行い、肥満と耐糖能異常の有無を比較検討する。また、インスリン負荷試験、ブドウ糖負荷試験、乳酸負荷試験を行い、BAT3 欠損が糖代謝に与える影響を調べる。同時に、各マウスの肝機能、

脂質代謝検査を含めた血清の生化学的解析を行い、肝細胞障害の有無、脂質代謝異常の有無を調べる。さらに、肝臓組織の病理組織学的及び生化学的解析を行い、各群における脂肪肝、炎症反応、繊維化の有無や程度を継時的に比較検討する。予備実験から Bat3 を欠損した MEF ではインスリンシグナルに異常を認めることから、特に糖質・脂質代謝異常に着目した解析を行う。

(2) 肝細胞における BAT3 の PI3K/Akt/mTOR 経路における役割の解明

BAT3 欠損 MEF で認められたインスリンシグナルの増強を、肝オルガノイドを使用し、検証する。Bat3LKO および野生型マウス由来の肝オルガノイドは、これまでの研究過程で樹立済みである。インスリンあるいは IGF-1 刺激後、IRS-1、IRS-2、PI3K/Akt の活性化を質量分析装置を用いて比較検討する。

(3) 代謝異常の基盤となる遺伝子発現パターンの解明およびヒト肝がんとの比較解析

Bat3LKO 肝がんモデルを用いて BAT3 欠損が肝がん発症・進展におよぼす影響の詳細を解析する。BAT3 が代謝制御を介してがん化防御機構として働くという我々のモデルを確立する。また、野生型および Bat3LKO の肝がんから RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行う。高脂肪食負荷時の遺伝子発現パターンと、既に取得済みの正常食摂取時の遺伝子発現パターンとを比較し、高脂肪食負荷時に BAT3LKO 肝がんでは特異的に影響を受ける遺伝子群を同定し、GSEA 解析などのパスウェイ解析を行う。マウス肝オルガノイドを用いて、遺伝子発現に差が見られた遺伝子の強制発現あるいはノックダウンを行い、機能的意義を調べる。また、阻害剤が入手可能なものについては阻害剤を使用する。ヒト肝がんはウイルス、非アルコール性脂肪肝炎、アルコール性肝障害など様々な原因により誘導される。ヒト肝がんデータベースを解析し、ヒト肝がんの病型特異的に共通して活性化あるいは不活性化されている遺伝子群を同定する。ヒト肝がんの遺伝子発現データと Bat3 欠損により誘導される肝がんの網羅的遺伝子発現解析により得られる遺伝子発現データとを比較解析することで、Bat3LKO マウスのヒト疾患モデルとしての有用性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) BAT3 の代謝ストレス下における役割の解明

Bat3LKO、対照マウスを正常食、高脂肪食で摂餌し、肝臓組織の病理組織学的及び生化学的解析を行い、比較した。Bat3LKO マウスに高脂肪食を摂餌すると、Bat3LKO では脂肪肝の進行が促進される傾向を示した（未発表）。また、以前の解析より、Bat3LKO マウスに高グルコース食を摂餌すると、Bat3LKO マウスでは肝臓内にグリコーゲンが貯留していた。これらの結果から、このことは Bat3 欠損が肝細胞における代謝ストレスを誘導する可能性を強く示唆している。

(2) 肝細胞における BAT3 の PI3K/Akt/mTOR 経路における役割の解明

Bat3LKO と野生型マウス胎児から樹立した線維芽細胞 MEF をインスリン処理し、Akt のリン酸化レベルの解析を行ったところ、Bat3 欠損 MEF では、Akt のリン酸化が亢進していた。従って、Bat3 はインスリンシグナルに抑制的に働くことが示唆された。この差異の詳細を明らかにする目的で、樹立した MEF から調整したタンパク質サンプルを質量分析装置を用いて解析したところ、野生型と比較して、核酸代謝、TP53 シグナル、リン酸化、炎症反応等に関わるタンパク質の量が優位に上昇していることを見出した。ヒト肝がんでは TP53 変異を有するサブタイプが

報告されていることから、Bat3LKO における肝癌発症との関連が示唆された。また、炎症性反応に関わるシグナルの活性化が認められ、Bat3 欠損そのものが、直接的にそれらの炎症反応を制御する可能性が示され、個体レベルでの機能解析のための基礎的データとなることが示唆された（未発表）。また、今後、肝オルガノイドの質量分析装置データとの統合解析を行い、Bat3 欠損により誘導される肝癌の機能解析に繋げる。

（3）代謝異常の基盤となる遺伝子発現パターンの解明およびヒト肝がんとの比較解析

高脂肪食摂取により誘導される肝癌モデルを用いて、BAT3 欠損が肝癌の発症・進展におよぼす影響を検討した。実験開始から 30 週後の肝重量を比較すると、Bat3LKO の肝臓が有意に増加していることが明らかとなった（ $n=12$, $p=0.0301$ ）。また、肝癌の腫瘍数、腫瘍径ともに、Bat3LKO で大きな傾向を示した。従って、Bat3 は高脂肪食摂取により誘導される肝癌を抑制することが示唆された。次に Bat3 の腫瘍抑制機序を明らかにする目的で、野生型および Bat3LKO の肝癌から RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った。パスウェイ解析を行なったところ、WOO-LIVER_CANCER_RECURRENCE, CHANG_LIVER_CANCER_SUBCLASS_PROLIFERATION, BORLAK_LIVER_CANCER_EGF, LEE_LIVER_MYC のエンリッチメントを認め、KRAS, PTEN-AKT, CDKN2A, TP53 との関連が強く示唆された。ヒト肝がんで高頻度に変異を認める遺伝子として TP53, CTNNB1, LRP1B, TTN, PTCHD1, MYH15, FBN1, MUC5B, FRAS1 が知られているが、公的データベースの解析により、BAT3 に変異を認めるヒト肝がんでは、PTCHD1 の変異が高頻度に起こることが明らかとなった（Log ration: 5.86, p-value: $1.73e-8$, q-value: $2.952e-4$ ）。また、BAT3 変異を有するヒト肝がんでは Hepatocellular Carcinoma plus Intrahepatic Cholangiocarcinoma の割合が多い傾向を認めた（未発表）。

本研究で得られたマウスモデル、公的データベース、生化学的知見等から、BAT3 欠損が、生活習慣病あるいはメタボリック症候群に伴う脂質代謝異常症が誘因となる肝がんの発症に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。分子機序の一端は明らかになったが、特に治療標的開発に関しては未解明である。我々が開発したマウスモデル、肝オルガノイド、網羅的遺伝子発現解析結果および質量分析結果は今後の研究開発に大きく資するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Dash Suman, Ueda Takeshi, Komuro Akiyoshi, Amano Hisayuki, Honda Masahiko, Kawazu Masahito, Okada Hitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 MYC/Glutamine Dependency Is a Therapeutic Vulnerability in Pancreatic Cancer with Deoxycytidine Kinase Inactivation-Induced Gemcitabine Resistance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 OF1 ~ OF14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-22-0554	査読の有無 無
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 Ueda Takeshi, Kanai Akinori, Komuro Akiyoshi, Amano Hisayuki, Ota Kazushige, Honda Masahiko, Kawazu Masahito, Okada Hitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 KDM4B promotes acute myeloid leukemia associated with AML1 ETO by regulating chromatin accessibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.2021-00030	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 Guo Jianping, Cheng Ji, Zheng Nana, Zhang Xiaomei, Dai Xiaoming, Zhang Linli, Hu Changjiang, Wu Xueji, Jiang Qiwei, Wu Depei, Okada Hitoshi, Pandolfi Pier Paolo, Wei Wenyi	4. 巻 8
2. 論文標題 Copper Promotes Tumorigenesis by Activating the PDK1 AKT Oncogenic Pathway in a Copper Transporter 1 Dependent Manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 2004303 ~ 2004303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202004303	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 該当する

1. 著者名 Zhu Chen, Dixon Karen O., Newcomer Kathleen, Gu Guangxiang, Xiao Sheng, Zaghouani Sarah, Schramm Markus A., Wang Chao, Zhang Huiyuan, Goto Kouichiro, Christian Elena, Rangachari Manu, Rosenblatt-Rosen Orit, Okada Hitoshi, Mak Tak, Singer Meromit, Regev Aviv, Kuchroo Vijay	4. 巻 7
2. 論文標題 Tim-3 adaptor protein Bat3 is a molecular checkpoint of T cell terminal differentiation and exhaustion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd2710	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 該当する

1. 著者名 Yi Sun-Ju, Jang You-Jee, Kim Hye-Jung, Lee Kyubin, Lee Hyerim, Kim Yejin, Kim Junil, Hwang Seon Young, Song Jin Sook, Okada Hitoshi, Park Jae-II, Kang Kyuho, Kim Kyunghwan	4. 巻 9
2. 論文標題 The KDM4B/CCAR1/MED1 axis is a critical regulator of osteoclast differentiation and bone homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41413-021-00145-1	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 該当する

1. 著者名 Dash Suman, Ueda Takeshi, Komuro Akiyoshi, Honda Masahiko, Sugisawa Ryoichi, Okada Hitoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Deoxycytidine kinase inactivation enhances gemcitabine resistance and sensitizes mitochondrial metabolism interference in pancreatic cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Death and Disease	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-024-06531-x	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 Takasaki Teruaki, Hamabe Yasuyuki, Touchi Kenta, Khandakar Golam Iftakhar, Ueda Takeshi, Okada Hitoshi, Sakai Kazuko, Nishio Kazuto, Tanabe Genzoh, Sugiura Reiko	4. 巻 2024
2. 論文標題 ACA-28, an ERK MAPK Signaling Modulator, Exerts Anticancer Activity through ROS Induction in Melanoma and Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2024/7683793	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古室暁義、岡田 斉
2. 発表標題 The role of histone demethylase UTX in the development of invasive breast cancer
3. 学会等名 第94回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田 健、岡田 斉
2. 発表標題 骨髄球系細胞の形質転換におけるタンパク質NEDD化制御異常の役割
3. 学会等名 第95回 日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本多賢彦、岡田 斉
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いたVgl12発現量が及ぼす筋代謝への影響の解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古室 暁義, 上田 健, 岡田 斉
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素UTXの欠損による乳がん細胞の浸潤能はBET阻害剤で抑制される
3. 学会等名 第80回 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田 健, 古室 暁義, 天野 恭志, 本多 賢彦, 岡田 斉
2. 発表標題 オンコメタボライトによる毒性を回避する機構
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野 恭志, 古室 暁義, 本多 賢彦, 上田 健, 岡田 斉
2. 発表標題 炎症性腸疾患関連大腸がんにおけるSirt1-NAD+経路の機能解析
3. 学会等名 第25回 日本がん分子標的治療学会学術集会
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			
カナダ	The Campbell Family Institute	Ontario Cancer Institute	University of Toronto	他1機関
米国	Harvard Medical School	Brigham and Women's Hospital	Broad Institute of MIT	他4機関
韓国	Chungbuk National University	Korea Research Institute		