

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390197

研究課題名(和文) 肝細胞癌の発生と進展におけるオートファジーの意義と制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of autophagy and its impact in the development and progression of hepatocellular cancer.

研究代表者

竹原 徹郎 (Takehara, Tetsuo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70335355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝炎の病態形成において、過剰脂肪酸は、肝細胞におけるオートファジーを抑制し、ERストレスの活性化を介して、肝細胞アポトーシスを誘導することを示した。さらに、肝細胞アポトーシス自然発症遺伝子改変マウスでは、肝細胞アポトーシスの持続が線維化・発癌を誘導したことから、脂肪肝炎ではオートファジー抑制による持続的肝細胞アポトーシスが、肝線維化・肝発癌に寄与することが示唆された。一方で、肝癌細胞では、分子標的薬ソラフェニブによりオートファジーが誘導され、オートファジーは細胞保護的に作用した。オートファジーはその抑制が発癌過程を促進する一方で、癌細胞に対しては逆に癌の進展を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim was to clarify the relationship between apoptosis and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis, and also in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC). Excess free fatty acids suppressed autophagic flux in hepatocytes and induced apoptosis by increasing endoplasmic reticulum stress. Hepatocyte-specific Mcl-1 knockout mice revealed that chronically increased hepatocyte apoptosis leads to liver fibrosis and cancer, suggesting that, in the pathogenesis of steatohepatitis, continuous hepatocyte apoptosis induced by autophagy impairment contributes to hepatic fibrogenesis and carcinogenesis. Finally, sorafenib, a multikinase inhibitor for the treatment of HCC, enhanced autophagic activity, which then inhibited apoptosis in hepatoma cells. In conclusion, autophagy may be a double-edged sword in the liver cancer development and progression; the promotion promotes the survival of the cancer cells while the restraint promotes the outbreak of cancer.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：オートファジー 肝細胞癌 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

オートファジー(自食作用)は、細胞が不要な蛋白やオルガネラを隔離膜という2重膜で包み込み(オートファゴソームの形成)、ライソソームと融合することにより(オートライソソーム)内容物を非特異的に分解する過程である。一般的には、飢餓時に細胞応答とされ、細胞のエネルギー需要の補完に寄与すると考えられている。一方で、障害された蛋白やオルガネラの排除を介して細胞の恒常性を維持する役割や、逆に、細胞そのものを消化・除去するという細胞死における意義もあるとされている(programmed cell death-type II)。オートファジーは神経変性疾患や心疾患などの種々の病態との関連が示唆されているが、癌においてはその発生・進展を促進する、あるいは抑制するという、相反する機能が報告されている。オートファジー誘導遺伝子である beclin1 がいくつかの癌で欠損していることと、同遺伝子のヘテロ欠損マウスが癌を自然発症することから、オートファジーは癌抑制的な働きがあると考えられている(Qu X, et al., J Clin Invest 2003)。また、一方で、癌細胞は種々のストレスに対してオートファジーを誘導し、これにより細胞死が誘導される、あるいは抑制されると報告されている。肝癌においてはラット発癌モデルでオートファジーが低下していること、ヒト肝癌において Beclin 1 の発現が低下している症例がありそのような症例では悪性度が高いことが報告され(Ding ZB, et al., Cancer Res 2008)。オートファジーの低下が肝癌の発生や進展に一定の役割を持つことが示唆されている。また、肝癌細胞で TGF-beta(Kiyono K, et al., Cancer Res 2009)による細胞死や COX-II 阻害剤(Gao M, et al., Cancer Res 2008)による細胞死がオートファジーを介して遂行されることを示唆する報告がある。

2. 研究の目的

アポトーシスは不必要な細胞を除去するシステムとして、オートファジーは栄養飢餓状態や不必要な細胞内小器官に対する細胞内分解システムとして、共に細胞内臓器や個体の恒常性維持に必須の生命現象である。

当研究室ではこれまで、アポトーシスを含む肝細胞死の分子機構に関して検討を進めており、肝細胞アポトーシスの持続が肝線維化を惹起することを見出し、肝炎における病態進展にアポトーシスが重要な役割を果たすことを示した。

また一方で、オートファジーは細胞の生存システムであるとともに、アポトーシス(Type 1 細胞死)とは異なる Type 2 の細胞死を誘導することがあると報告されている。さらに、オートファジーの誘導が細胞死に対して保護的に働くという側面もあり、アポトーシスとオートファジーには密接な関連が

示唆される。

そこで本研究では、持続的肝細胞アポトーシスを主軸とする肝疾患病態進展とオートファジーとの関係性を明らかにすることを目的として、「肝疾患病態形成(オートファジーが、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)病態形成における肝細胞アポトーシスに与える影響)」「肝疾患病態進展(肝細胞アポトーシスの持続が肝発癌に与える影響)」「肝癌治療(分子標的薬剤ソラフェニブが肝癌細胞におけるアポトーシスとオートファジーに与える影響)」の3つの視点から検討を行った。

3. 研究の方法

< オートファジーが、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)病態形成における肝細胞アポトーシスに与える影響 >

細胞実験における NAFLD モデルとして、ヒト肝癌細胞株 HepG2 に飽和脂肪酸であるパルミチン酸を投与した際の ER ストレス・アポトーシス・オートファジーの解析を行った。また、遺伝子ノックダウン法、各種阻害剤処理などを用いたオートファジーの制御が脂肪酸負荷による肝細胞アポトーシスへ与える影響を評価した。

< 肝細胞アポトーシスの持続が肝発癌に与える影響 >

動物実験として、アポトーシス抑制遺伝子 Mcl-1 またはオートファジー必須遺伝子 Atg7 を肝細胞特異的に欠損させたマウスを作成して長期間飼育し、肝線維化および肝発癌に与える影響を解析した。

< 分子標的薬剤ソラフェニブが肝癌細胞におけるアポトーシスとオートファジーに与える影響 >

細胞実験として、ヒト肝癌細胞株 Huh7 にソラフェニブを投与した際のアポトーシス・オートファジーの解析を行った。また、遺伝子ノックダウン法、各種阻害剤処理などを用いたオートファジーの制御がソラフェニブ投与による肝癌細胞アポトーシスへ与える影響を評価した。

4. 研究成果

< オートファジーが、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)病態形成における肝細胞アポトーシスに与える影響 >

ヒト肝癌細胞株 HepG2 にパルミチン酸を投与すると、IRE1-JNK 及び PERK-CHOP 経路を含む ER ストレス蛋白の活性化を伴って Caspase-3/7 活性は上昇し、アポトーシスが誘導された。パルミチン酸投与により LC3-II 及び P62 蛋白の蓄積を認め、パルミチン酸はオートファジー後期段階を抑制した。オートファゴソームとライソソームの融合を負に制御する Rubicon タンパクは、パルミチン酸投与に伴い増加した。

またパルミチン酸投与時に、オートファジー必須遺伝子 Atg7 をノックダウンしオートファジーを抑制すると Caspase-3/7 活性値は更に上昇し、アポトーシスは亢進した。Rubicon をノックダウンすると、パルミチン酸投与によるオートファジー抑制は解除され、ER ストレス蛋白活性化及びアポトーシスは抑制された。

以上より、過剰脂肪酸は Rubicon 発現を増加させてオートファジーを抑制し、ER ストレス蛋白活性化亢進を介して肝細胞アポトーシスを誘導するメカニズムが示唆された。

< 肝細胞アポトーシスの持続が肝発癌に与える影響 >

アポトーシス抑制遺伝子 Mcl-1 を肝細胞特異的に欠損させ、持続的肝細胞アポトーシスを誘導したマウスでは、12 ヶ月齢で約 60%、18 ヶ月例で 100%に肝線維化を伴って肝発癌を認めた。これらのマウスでは酸化ストレス蓄積や炎症性サイトカインの発現亢進を認めており、抗酸化薬の投与により発癌率が有意に低下した。更に、Mcl-1 に加えて、アポトーシス促進遺伝子 Bak を欠損させたダブルノックアウトマウスでは、Mcl-1 単独ノックアウトマウスに比して肝細胞アポトーシスは抑制され、肝発癌率も有意に低下した。

また、オートファジー必須遺伝子 Atg7 を肝細胞特異的に欠損させオートファジーを抑制したマウスでは、持続的肝細胞アポトーシスを呈し、12 ヶ月例で 100%に肝線維化を伴って肝発癌を認めた。

以上より、持続的肝細胞オートファジー抑制は肝細胞アポトーシスを惹起し、酸化ストレス蓄積を介して肝発癌を誘導する可能性が示唆された。

< 分子標的薬剤ソラフェニブが肝癌細胞におけるアポトーシスとオートファジーに与える影響 >

ヒト肝癌細胞株 Huh7 にソラフェニブを投与すると、LC3-II 蛋白の増加および P62 蛋白の減少を認め、またオートファジー阻害剤であるクロロキンを添加すると LC3-II 蛋白の発現量は更に増加したことから、ソラフェニブはオートファジーを促進させた。

次に、オートファジー必須遺伝子 Atg7 をノックダウンしオートファジーを抑制すると、ソラフェニブ投与に伴う Caspase-3/7 活性値は更に上昇し、アポトーシスは亢進した。Atg7 ノックダウンの代わりにオートファジー阻害剤クロロキンを添加する実験においてもオートファジーの抑制はソラフェニブ投与によるアポトーシスを亢進させた。

以上より、ソラフェニブは、肝癌細胞に対しオートファジーを誘導し、このオートファジー増強により肝癌細胞は細胞死から逃れていることが示された。ソラフェニブ治療におけるオートファジーの抑制が有用な肝癌

治療戦略と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Saito Y, Tanaka S, Shigekawa M, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. (2013) The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. *J. Biol. Chem.* 288: 30009-30018. 査読有.

Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. (2012) Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol.* 57: 92-100. 査読有.

Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. (2012) Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 131: 548-557. 査読有.

[学会発表](計9件)

Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2013) The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. The crosstalk between apoptosis and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. Washington, USA, November, 2 - 5.

Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. (2013) The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Oxidative stress induced by continuous hepatocyte apoptosis drives liver carcinogenesis independently of regeneration and DNA methylation status. Washington, USA,

Novemver, 2 - 5.

田中聡司、疋田隼人、齋藤義修、清水聡、阪森亮太郎、宮城琢也、巽智秀、竹原徹郎 (2013) NAFLD/NASH 病態形成における、飽和脂肪酸・不飽和脂肪酸によるオートファジーとアポトーシスの制御に関して。第49回肝臓学会総会 東京, 6月6-7日。

疋田隼人、巽智秀、宮城琢也、阪森亮太郎、清水聡、齋藤義修、田中聡司、竹原徹郎 (2013) 肝細胞アポトーシスが発生する酸化ストレスの肝発癌に与える影響。第49回肝臓学会総会 東京, 6月6-7日。

田中聡司、疋田隼人、齋藤義修、清水聡、阪森亮太郎、宮城琢也、巽智秀、竹原徹郎。(2013) NASH 肝障害・肝発癌の病態形成における、オートファジー抑制を介した持続的アポトーシスの寄与 第17回日本肝臓学会大会 東京 10月9-10日

疋田隼人、巽智秀、中堀輔、齋藤義修、田中聡司、清水聡、阪森亮太郎、宮城拓也、竹原徹郎 (2013) 慢性肝障害からの肝発癌におけるバイオマーカーの検討 第17回日本肝臓学会大会 東京 10月9-10日

Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara (2012) The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. Boston, USA, Novemver, 9 - 13. Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Wei Li, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara (2012) The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Bid and Bim are essential regulators involving the intrinsic pathway of apoptosis in hepatocytes in the absence of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. Boston, USA, Novemver, 9 - 13.

Satoshi Tanaka, Hayato Hikita¹, Satoshi Aono, Tsukasa Kawaguchi, Kaori Mukai, Satoshi Shimizu, Takahiro Kodama, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara (2012) The 63rd Annual Meeting of the American

Association for the study of Liver Disease. Differential roles of palmitic acid and oleic acid in regulation of apoptosis and autophagy in non-alcoholic fatty liver disease. Boston, USA, Novemver, 9 - 13.

〔図書〕(計2件)

[1]疋田隼人、竹原徹郎。(2014) 肝細胞死の研究と進歩。林紀夫、日比紀文、上西紀夫、下瀬川徹。Annual Review 消化器 2014。中外医学社, 179-186.

[2] 竹井謙之、竹原徹郎, 持田 智。Hepatology Practice 2 NASH・アルコール性肝障害の診療を極める。(2013) 文光堂, 1-399.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等:

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/research_a.html

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

巽 智秀 (Tatsumi Tomohide)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20397699

(3) 連携協力者

疋田 隼人 (Hikita Hayato)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号: 20623044

田中 聡司 (Tanaka Satoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生