

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590970

研究課題名(和文)肝細胞のアポトーシスが肝発癌を誘発する機序の解明

研究課題名(英文)Continuous hepatocyte apoptosis induces HCC in the liver

研究代表者

疋田 隼人(Hikita, Hayato)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：20623044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：透過性亢進を介して、細胞内のROSを上昇させた。肝細胞アポトーシスが持続しているマウス肝臓では肝再生の亢進や線維化進展とともに酸化ストレスの蓄積も認められた。さらに長期飼育によって高頻度でC>A/G>T変異の多い肝腫瘍が発生した。抗酸化剤投与による酸化ストレスの軽減は、持続的肝細胞アポトーシスや肝再生の亢進、肝線維化進展を改善させなかったが、発癌率を有意に低下させた。以上より、肝細胞アポトーシス刺激はROSを発生させ、酸化ストレスの蓄積を介した肝発癌を誘導することが示唆された。酸化ストレス抑制が、肝細胞アポトーシス持続肝からの発癌抑制治療となると期待された。

研究成果の概要(英文)：Activation of the mitochondrial pathway of apoptosis increased oxidative stress in hepatocytes and tBid released ROS from mitochondria. Hepatocyte-specific Bcl-xL or Mcl-1 KO mice coursed continuous hepatocyte apoptosis with increase of reciprocal regeneration, fibrosis, inflammation cytokines and oxidative stress. They also developed liver tumorigenesis. Bak, Bax or Bid deficiency attenuated hepatocytes apoptosis, oxidative stress and tumorigenesis rate in Mcl-1KO mice. An antioxidant did not affect the levels of hepatocyte apoptosis, reciprocal regeneration, fibrosis and inflammation cytokines but attenuated oxidative stress and decreased incidence rates of HCC. These results indicated that continuous hepatocyte apoptosis induced accumulation of oxidative stress in their liver which resulted in liver carcinogenesis. This study supports a concept that antioxidant therapy may be useful for suppressing liver carcinogenesis in patients with chronic liver disease.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝細胞死 肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

日本における死因で最大のものは癌による死亡である。その中でも肝癌は第4位の死亡原因であり年間3万5千人が亡くなっている。日本における肝癌の発症は、C型慢性肝炎、B型慢性肝炎、アルコール性肝障害や非アルコール性脂肪肝炎など各種慢性肝炎を背景として発症する。しかしながら、慢性肝炎の存在が肝癌を発症させる機序については未だ不明な点が多い。一方、これら種々の慢性肝炎では共通して数多くの肝細胞アポトーシスが認められる。アポトーシスは自らの細胞を死に至らしめる機構であるため、DNAなどに障害を受け癌化した細胞の排除に有用で、一般的には肝発癌を抑制する機構として重要であると理解されている。しかし最近、マウスの肝細胞にアポトーシスを誘導させるだけで肝発癌が認められることが報告された(Weber A, et al. Hepatology 2010)。申請者も、アポトーシス抑制蛋白質であるBcl-xLやMcl-1の肝細胞特異的ノックアウトマウス(Alb-Cre Bcl-xL fl/fl, Alb-Cre Mcl-1 fl/fl)では肝細胞のアポトーシスを多数認めると報告したが(Hikita H, et al. Hepatology 2009 Dec, Hikita H, et al. Hepatology 2009 Oct)、いずれのマウスでも長期飼育にて高率に肝腫瘍形成を認めることをすでに確認していた。これらの結果は、肝細胞におけるアポトーシスの持続自体が肝発癌の誘発因子であることを示唆している。しかし、アポトーシスの持続が発癌を誘発する機構は依然不明である上に、アポトーシスの抑制が結果的に肝発癌に対して抑制的に働くのかも検証する必要があった。

## 2. 研究の目的

ウイルス性肝炎や非アルコール性脂肪肝炎など慢性肝炎からの肝発癌は非常に高率であるが、発癌機構は未だ不明な点が多い。一方、各種慢性肝炎には共通して数多くの肝細胞アポトーシスが認められる。そこで、本研究課題では肝細胞アポトーシスが肝発癌を誘発する分子機序を解明し、慢性肝炎からの肝発癌予防に役立つ新規治療法を開発することを目的として研究を行う。

## 3. 研究の方法

[1] 持続的に肝細胞アポトーシスを認めるマウスの解析  
持続的に肝細胞のアポトーシスを多数認めるマウス(肝細胞特異的 Bcl-xL ノックアウトマウス(Alb-Cre Bcl-xL fl/fl)及び肝細胞特異的 Mcl-1 ノックアウトマウス(Alb-Cre Mcl-1 fl/fl))を用いて、炎症性サイトカイン、肝再生や線維化の程度、酸化ストレス(HO-1やNQO1の発現や8-OHdGなど)を検討した。また長期飼育での発癌率の変化を解析する。さらに形成された発癌の遺伝子変異をエクソームシーケンスを行い検討することで、発癌誘導機序を検討した。

[2] 持続的に肝細胞アポトーシスを認めるマウスのアポトーシス抑制効果及び酸化ストレス抑制効果の解析

Mcl-1 ノックアウトマウスで認める炎症性サイトカインやケモカインの上昇、肝再生や線維化進展、酸化ストレスの蓄積や肝発癌がアポトーシスの抑制で改善するかを検討した。アポトーシスを抑制する方法として、遺伝子改変によるアポトーシス抑制を行った。すなわち、アポトーシス促進遺伝子(Bid, BakおよびBax)をノックアウトすることで肝細胞のアポトーシスは抑制されることをすでに報告している(Hikita H, et al. Hepatology 2009 Oct, Hikita H, et al. Hepatology 2009 Dec)。そこで、BidやBak, Baxを欠損したMcl-1 ノックアウトマウスを作成し、解析を行った。また、Mcl-1 ノックアウトマウスで認める酸化ストレスの蓄積が肝発癌などに与える影響を検討するために、Mcl-1 ノックアウトマウスに抗酸化剤であるNアセチルシステイン(NAC)を持続投与した。

[3] アポトーシス刺激が酸化ストレスを上昇させる機構の解析

肝細胞株にBcl-xL阻害剤を投与すると、アポトーシスが誘導されることはすでに報告している(Hikita H, et al. Hepatology 2010)。そこで、この方法で肝細胞株にアポトーシス刺激を与え、細胞内のReactive Oxygen Species (ROS)を測定した。また肝細胞におけるアポトーシスはミトコンドリアの外膜の破壊が重要である。このミトコンドリアへの刺激がROSの発生源になっていないかを検討するために、マウス肝臓より単離したミトコンドリアにアポトーシス促進蛋白質であるtBIDを添加して刺激した際のROSの発生の程度を検討した。

## 4. 研究成果

[1] 持続的に肝細胞アポトーシスを認めるマウスの解析  
肝細胞特異的 Bcl-xL ノックアウトマウス及び肝細胞特異的 Mcl-1 ノックアウトマウスは、持続的な肝細胞アポトーシスとともに肝再生の亢進、TNF- $\alpha$ やMCP-1の上昇、肝線維化の進展を伴い、1.5年でそれぞれ88%、100%と高率に肝細胞癌を認めた。酸化ストレスマーカーであるHO-1やNQO1の発現や8-OHdG陽性細胞数の上昇も認めたことから、酸化ストレスの上昇が示唆された。アポトーシス持続マウスで観察された癌部と非癌部をそれぞれHiSeqにてエクソームシーケンスを行い、Virmidにて一塩基置換について検討した。1腫瘍あたり54-101個の1塩基変異を認め、うち17.8%がアミノ酸置換を伴う置換であった。変異パターンはC>A/G>Tのトランスバージョンの頻度が高く、遺伝子変異の原因として酸化ストレスの

重要性が示唆された。

[2] 持続的に肝細胞アポトーシスを認めるマウスのアポトーシス抑制効果及び酸化ストレス抑制効果の解析

Mcl-1 ノックアウトマウスから、アポトーシス促進蛋白質である Bak を欠損させると、肝細胞アポトーシスの持続が改善するとともに、線維化も改善され、代償的な肝再生も抑制された。また、TNF- $\alpha$  や MCP-1 などの炎症性のサイトカイン、ケモカインの上昇も抑制した。1 年の時点で非癌部肝組織における 8-OHdG 陽性細胞数も減少したことから、酸化ストレスの蓄積も軽減していることが明らかとなった。さらに 1 年での肝腫瘍形成は、64 (14/22)% から 0 (0/7)% へと有意に減少した。別のアポトーシス促進蛋白質である Bax や Bid の欠損でも同様に、持続肝細胞アポトーシスの改善とともに、酸化ストレスの蓄積の軽減、肝腫瘍形成率の低下を認めた。

次に酸化ストレスの蓄積が肝発がんに与える影響を検討するために、Mcl-1 ノックアウトマウスに抗酸化剤 NAC を持続投与し、発がんに与える影響を検討した。NAC を投与しなかった Mcl-1 欠損マウスは 1 年で 64% に発がんを認めた。一方で、NAC を持続投与された Mcl-1 欠損マウスは、肝細胞アポトーシスの程度、線維化の程度、肝再生やサイトカインの上昇に関しては変化を認めなかったが、8-OHdG 陽性細胞数の低下とともに 1 年における発がん率は 35% と、有意に抑制された。

[3] アポトーシス刺激が酸化ストレスを上昇させる機構の解析

マウス肝細胞株や初代培養肝細胞に Bcl-xL 阻害剤を投与すると、カスパーゼの活性とともに細胞内 ROS は上昇し、アポトーシス刺激の持続は酸化ストレスの原因となり得ることが示唆された。また、野生型マウス肝臓からミトコンドリアを単離し、アポトーシス促進蛋白 tBid を投与すると、cytochrome c の放出とともに上清中の ROS が上昇した。一方で、Bak/Bax 欠損マウス肝臓から単離したミトコンドリアでは、cytochrome c の放出や、ROS の上昇は認めなかった。よって、アポトーシス刺激は、Bak/Bax 依存的にミトコンドリア外膜の透過性亢進を誘導するが、その際に ROS も放出され、持続的なアポトーシス刺激により酸化ストレスの蓄積の一因になると考えられた。

以上より本研究では、肝細胞アポトーシス刺激は ROS を発生させ、酸化ストレスの蓄積を介した肝発癌を誘導することが示唆された。酸化ストレスの抑制が、肝細胞アポトーシスが持続する肝臓からの発癌抑制治療となることが期待された。

## 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 2 件)

[1] 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.

[2] 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.

〔学会発表〕(計 15 件)

[1] Hayato Hikita, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Tsukasa Kawaguchi, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Takahiro Kodama, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2013) The 2nd JSGE International Topic Conference. Antioxidant has a therapeutic potential for HCC driven by chronic liver injury. Kagoshima, Japan, Mar, 22 - 23. (oral presentation)

[2] 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) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)

[3] 正田隼人, 巽智秀, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞障害が誘導する酸化ストレスと肝発癌. 第 54 回日本消化器病学会総会. 神戸, 10 月 10- 12 日.

[4] 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) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. 第 71 回日本癌学会学術総会. 札幌, 9 月 19-21 日.

[5] 疋田隼人, 巽智秀, 小玉尚宏, 清水聡, 重川稔, 田中聡司, 法水淳, 宮城琢也, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞のアポトーシスによる酸化ストレス発生と肝発癌 第 47 回日本肝臓学会総会. 金沢, 6月7 - 8日

[6] 疋田隼人, 巽智秀, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞アポトーシスの持続によるマクロファージの活性化と肝発癌. 第 98 回日本消化器病学会総会. 東京, 4月19 - 21日.

[7] 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, November, 2 - 5.

[8] Hayato Hikita, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Kawaguchi Tsukawa, Satoshi Shimizu, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi and Tetsuo Takehara (2013) The rheostat regulating hepatocyte apoptosis by BH3-only proteins in developing and adult liver. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Reserch of Hepatic Cells. Osaka, Japan, September 26 - 27.

[9] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Tsukasa Kawaguchi, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tetsuo Takehara. (2013) Continuous apoptosis in hepatocytes induces oxidative stress and leads to liver carcinogenesis. The 17th International Symposium on Cell of the Hepatic Sinusoid. Osaka, Japan, September 23 - 25.

[10] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Yoshito Hayashi, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Masahiko Tsujii, Tetsuo Takehara (2013) Continuous apoptosis in hepatocytes induces liver tumors with DNA hypermethylation but not p53 or beta-catenin mutation. 第 7 2 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日

[11] 疋田隼人, 巽智秀, 宮城琢也, 阪森亮太郎, 清水聡, 斎藤義修, 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.

[12] 疋田隼人, 巽智秀, 中堀輔, 斎藤義修, 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

[13] 疋田隼人, 巽智秀, 竹原徹郎 (2014) 肝細胞アポトーシスが惹起するミトコンドリア障害は、酸化ストレスを介して肝発癌を誘導する第 50 回日本肝臓学会総会 東京 5月29-30日

[14] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Minoru Shigekawa, Yoshito Hayashi, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tetsuo Takehara. Activation of mitochondrial apoptotic pathway increases oxidative stress in hepatocytes leading to liver carcinogenesis 日本癌学会第 73 回総会 横浜 2014 年 9 月 25-27 日

[15] Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. Activation of mitochondrial pathway of apoptosis in hepatocytes increases oxidative stress in hepatocytes leading to liver tumorigenesis. The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Boston USA. 11月7-11日

〔図書〕(計 4 件)

[1] 疋田隼人, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞アポトーシスの持続は肝発癌を誘導する, 消化器内科編集委員会, 消化器内科, 科学評論社, 54: 734-738.

[2] 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.

[3] 疋田隼人, 竹原徹郎. 酸化ストレス上昇による肝発癌. (2015) 最新肝癌学. 日本臨牀 (174-176) 増刊号.

[4] 疋田隼人, 竹原徹郎. 肝細胞アポトーシス持続による肝癌誘導. (2015) 最新肝癌学. 日本臨牀 (193-197) 増刊号.

〔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](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/research_a.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

疋田 隼人 (Hayato Hikita)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教 (常勤)

研究者番号: 20623044

(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