

炎症・ストレスによる多重並行ヒットと NASH 発癌

東京大学 医学部附属病院 消化器内科

中川 勇人

1. はじめに

近年肥満人口の増加と相まって、メタボリック症候群をベースにした炎症を伴う脂肪肝、いわゆる非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis; NASH) からの肝発癌が増加してきており、今後さらに増加することが予想される (1)。さらに近年の疫学研究から、肥満は NASH だけでなく、肝炎ウイルスによる肝線維化や発癌も促進することが明らかとなってきた (2)。しかしながら、肥満がどのように肝疾患を進展させるのかについては不明な点が多い。

肝発癌には慢性炎症がきわめて重要であることはよく知られている。高脂肪食 (high fat diet; HFD) を与えたマウスでは肝化学発癌剤ジエチルニトロサミン (DEN) による肝発癌が促進されるが、IL-6 や TNFR1 欠損マウスでは促進されないことが報告されており、肥満による肝発癌促進においても炎症性サイトカインが関与していることを明らかとなった (3)。しかし、この DEN+HFD モデルはヒト肝癌ではほぼ必須である背景肝の線維化が存在せず炎症も非常に軽微であるため、ヒト肝癌の微小環境を模倣できているとは言い難い。また本研究では IL-6 や TNF α がどのように肝発癌を促進しているのかについては、不明のままである。

また今までにいくつかの NASH マウスモデルが報告されているが、NASH に必須な要素である、肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝、肝臓への炎症細胞浸潤、肝線維化、さらに最終的な発癌までを模倣できるモデルは存在しない。このことは NASH の病態解明において、大きな障壁となっている。

そこで本研究では、著者らが最近報告した肝炎症発癌マウスモデルに、さらに改良を加えて肥満・NASH 関連肝発癌マウスモデルを作成し、その病態進展メカニズムの解明を行った。

2. 方法と結果

2.1 新規 NASH 肝癌モデルの作成

まず申請者らが開発した新規マウスモデルについて述べる。マウス肝癌モデルとして汎用されている発癌剤 DEN は生後 2 週齢のマウスに投与すると 8 か月後に HCC を発症するが、このモデルの欠点はヒト HCC では必須である背景肝の炎症反応や線維化がみられないことである。そこで申請者らは次のような新規炎症発癌マウスモデルを開発した。DEN 投与 5 か月後のマウスから肝細胞を分離すると、通常の肝細胞よりやや小型の aggregate した細胞集団を認め、それらを単離し、自然に肝炎を発症する MUP-uPA マウス (肝細胞で発現する Major urinary protein (MUP) プロモーター下に urokinase-type plasminogen activator (uPA) を発現する) の肝臓に経脾臓的に移植したところ、5 か月後に多数の HCC を認めた。一方、non-aggregated cells を移植したマウスでは、ごく少数の腫瘍を認めるのみであった。マイクロアレイの結果、aggregated cells は肝前駆細胞と HCC の中間的な発現プロファイルを持っており、この細胞集団は HCC progenitor cell (HcPC) を多く含んでいると考えられた。つ

まり前癌状態から簡便な方法で HcPC を分離し、炎症環境下に移植することによって HCC を作り出す新規モデルを開発した (4)。このモデルの利点は肝炎による発癌の promotion というヒト肝癌の重要なプロセスを模倣でき、且つドナーやレシピエントに異なる遺伝子改変マウスを使用することで、その遺伝子の癌細胞における役割と周囲の微小環境における役割を別々に解析できる点である。さらに興味深いことに、MUP-uPA マウスに HFD を与えると、NASH 類似の組織像を呈し、この環境下に前述の HcPC を移植したところ有意に腫瘍が増大し、この方法によって NASH 環境下における癌細胞発育促進メカニズムを解析できると考えられた。さらに 40 週齢まで HFD を与えると、自然に肝細胞癌を発症した。すなわち自然発癌モデルによって NASH 進展および HCC の initiation step を、そして移植モデルを用いて promotion, progression step を、というように NASH 発癌の様々なプロセスを詳細に解析することが可能となった。

2.2 NASH 進展における小胞体ストレスの役割

次に MUP-uPA マウスに脂肪肝から NASH へ進展させる何らかの 2nd hit が存在すると考え、その原因を探索した。MUP-uPA マウスで肝細胞死が起きる原因はよくわかっていないが、電子顕微鏡で見ると小胞体 (Endoplasmic reticulum stress; ER) が著明に拡張していることが報告されており (5)、この ER の拡張はヒト NASH の重要な所見である ballooning hepatocyte においても共通してみられる所見である。そこで本マウスでみられる小胞体の障害が単純性脂肪肝から NASH へ進展するカギとなっているのではないかと考えた。まず 5 週齢の MUP-uPA マウスの肝臓における ER ストレスマーカーを調べたところ、著明に発現が増加しており、本マウスでは非常に強い ER ストレスが蓄積していることがわかった。しかし、MUP-uPA マウスでは uPA の発現レベルが高い細胞は死に、次第に発現レベルが肝細胞に置き換わるため、16 週齢ではこれらのマーカーは著明に減少していた。一方で高脂肪食 MUP-uPA マウスは高い ER stress が保持されており、電子顕微鏡でも ER の著明な障害が確認された。すなわち uPA による ER ストレスが減弱してくるのに対して、高脂肪食に伴う ER ストレスが次第に増加し、それらが synergistic に高い ER ストレスを維持していると考えられた。

肝脂肪化は ER ストレスの原因となる一方で、近年 ER ストレスも肝脂肪化を引き起こしうることが報告されている。そこでまず、5 週齢の MUP-uPA マウスで検討したところ、自然に軽度の脂肪蓄積が生じていることがわかった。しかしながら 16 週齢になると uPA の発現低下に伴い肝脂肪含有量も減少した。一方、高脂肪食 MUP-uPA マウスでは 16 週齢ですでに著明な脂肪蓄積が認められ、同週齢の高脂肪食 WT マウスと比べても、有意に増加していた。それに伴い、肝組織中の酸化ストレスのレベルも上昇していた。次いで MUP-uPA マウスで脂肪化が亢進するメカニズムを検討したところ、脂肪合成に重要な mature SREBP1 の核移行が著明に亢進していることがわかった。さらに SREBP1 活性化と NASH の病態は、ER ストレス低減剤のタウロデオキシコール酸投与および分子シャペロン GRP78 の過剰発現によって有意に改善され、ER ストレスによる SREBP1 活性化が肝脂肪化との悪性サイクルを形成し、病態進展に寄与しているものと考えられた。この現象は初代肝細胞でも確認された。今度は逆に野生型マウスに HFD を与えて軽度の脂肪肝を誘導した後、ER ストレス誘導剤の Tunicamycin を投与したところ、36 時間後には肝臓が蒼白になって著明に膨れ上がり、組織学的には著明な肝細胞の ballooning とアポトーシスが生じていた。すなわち、ER ストレスと過栄養状態は、synergistic に肝細胞の ballooning を惹起することがわかった。

2.3 NASH 肝臓における TNF シグナルの役割

次に本マウスモデルにおける炎症性サイトカインの役割を検討した。高脂肪食 MUP-uPA マウスでは特に TNF α の発現が著明に増加しており、主にマクロファージから分泌されていた。そこで TNF α の病態進展への関与を調べるため、TNFR1 欠損 (TNFR1KO) マウスと MUP-uPA マウスを交配させることで TNFR1KO/MUP-uPA マウスを作成し、高脂肪食を投与したところ、TNFR1KO/MUP-uPA マウスは MUP-uPA マウスに比べ、NASH の病態が有意に改善し、また発癌についても有意に抑制された。

上記の結果から、TNF α が本マウスの病態進展に重要な役割を果たすことが明らかとなったが、発癌プロセスという点では、NASH の病態を改善させたことの結果なのか、腫瘍進展に直接寄与しているのか区別できない。そこで前述の NASH 環境下における HCC の promotion・progression プロセスへの TNF α の役割を詳細に解析するため、次のような 2 つのモデルを作成した。

①腫瘍細胞への直接的な TNF α の役割を検討するため、2 週齢の TNFR1KO マウスに DEN を投与して 5 か月後に HcPC を分離し、MUP-uPA マウスに移植し高脂肪食を与える。この方法によって腫瘍細胞でのみ TNFR1 を KO した状態にできる。

②微小環境における TNF α の役割を解析するため、TNFR1KO/MUP-uPA マウスに WT マウス由来 HcPC を移植するモデルを作成し、同様の検討を行う。すなわち、全身では TNFR1 が KO された状態であるが、腫瘍細胞では TNFR1 が発現した状態とできる。

移植 5 か月後、②の実験では依然として高脂肪食による腫瘍促進傾向が認められたのに対して、①の実験では高脂肪食を投与しても腫瘍の増大が認められなかった。この実験結果から promotion、progression step においては、腫瘍細胞の TNFR1 が重要、すなわち、TNF α は直接腫瘍細胞に作用して増殖を促進することが明らかとなった。

次にそのメカニズムを調べるため、まず腫瘍細胞の細胞増殖とアポトーシスを評価したところ、WT の HcPC (WT-HcPC) を移植したマウスでは高脂肪食投与によって細胞増殖が亢進するのに対して、TNFR1KO の HcPC (TNFR1KO-HcPC) を移植したマウスではほとんど変化がないことがわかった。一方で高脂肪食は腫瘍細胞のアポトーシスには影響を与えなかった。そこで腫瘍内の増殖シグナルを調べたところ、WT-HcPC では高脂肪食によって ERK、STAT3、JNK などのシグナルが強く活性化していたのに対し、TNFR1KO-HcPC では通常食と差がなかった。加えて WT-HcPC では高脂肪食により腫瘍細胞内の NF- κ B が著明に活性化し、腫瘍内での炎症性サイトカイン・ケモカインの発現亢進と炎症細胞浸潤の増加がみられたが、TNFR1KO-HcPC では通常食時と同等であった。また TNF 阻害剤 Enbrel 投与によっても、高脂肪食による肝臓増大は有意に抑制された。さらに HcPC において NF- κ B の上流因子 IKK β を欠損させたところ、高脂肪食によるケモカイン上昇と腫瘍促進効果はキャンセルされた。これらの結果から、NASH 環境下における肝臓増大には、TNF-IKK 経路を介した tumor-associated inflammation が寄与していることが明らかとなった。

3. まとめ

①NASH 発癌の様々なプロセスを詳細に解析することができる、独創的なマウスモデルを確立した。

②小胞体ストレスと高栄養は協調的に肝細胞の ballooning を惹起し、NASH の病態を悪化させることがわかった。

③肥満・NASH による肝臓の促進には、TNF-IKK 経路が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

謝辞

本研究は、アステラス病態代謝研究会研究助成の援助を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

4. 発表論文

Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, Zhong Z, Valasek MA, Seki E, Hidalgo J, Koike K, Kaufman RJ, Karin M. ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell*. 2014 Sep 8;26(3):331-43.

参考文献

- 1) White DL, Kanwal F, El-Serag HB.: Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012 Dec;10(12):1342-1359.e2.
- 2) Ohki T, Tateishi R, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Yamashiki N, Yoshida H, Kanai F, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M.: Obesity is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Apr;6(4):459-64.
- 3) Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, Osterreicher CH, Takahashi H, Karin M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010 Jan 22;140(2):197-208.
- 4) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):384-96.
- 5) Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell*. 1991 Jul 26;66(2):245-56.