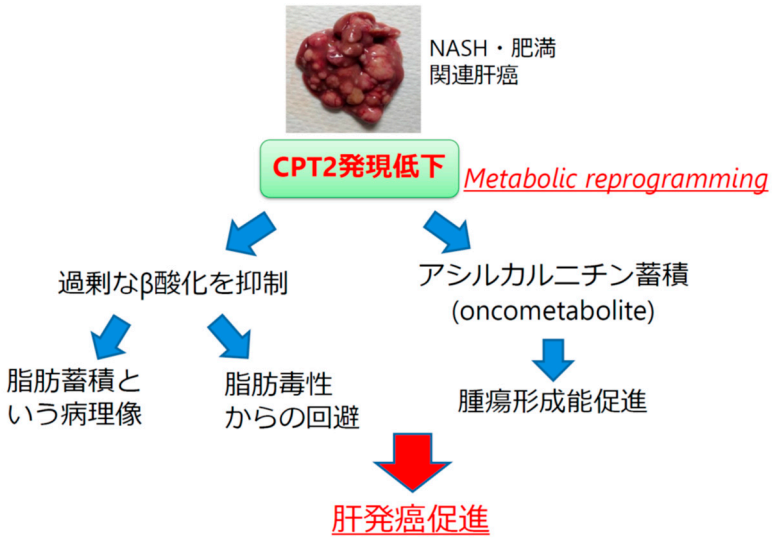
87　肥満関連肝癌に特異的な代謝変化に基づく新規治療戦略	中川　勇人

【目的】最近癌細胞は周囲の環境に適応しかつ自身の成長に有利な状況を作り出すため、正常細胞とは異なった固有の代謝変化、いわゆる“metabolic reprogramming”が生じていることが明らかとなり、新たな治療標的として注目されている。そこで本研究では、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）・肥満関連肝癌に特異的に生じている脂質代謝リプログラミングに着目し、その病態における意義を明らかにする。

【方法】肝化学発癌剤 Diethylnitrosamine（DEN）投与後に通常食および高脂肪食を与えたマウスから、それぞれ非癌部・癌部組織を採取し、メタボローム解析を行った。さらに細胞株を用いてその病態における意義を明らかにするとともに、ヒト検体を用いた検証を行った。

【結果】メタボローム解析の結果、肥満関連肝癌では脂肪酸 β 酸化の中間代謝産物アシルカルニチンが著明に蓄積しており、それはアシルカルニチンをアシル CoA に分解し β 酸化を誘導する酵素 carnitine palmitoyltransferase（CPT）2 の発現が低下していることが原因であることを突き止めた。マウス DEN 由来肝癌細胞株 Dih10 を用いて CPT2 をノックダウンすると飽和脂肪酸による細胞死が減弱したことから、肥満関連肝癌では CPT2 発現低下によって β 酸化を介した脂肪毒性から回避している可能性が考えられた。さらに Dih10 に肥満関連肝癌で顕著に蓄積していたアシルカルニチンである AC18：1 を添加すると、STAT3 活性化を介して sphere 形成能が亢進したことから、アシルカルニチン蓄積は CPT2 低下の surrogate marker でるだけでなく、直接的に発癌を促進する作用を持つことが示唆された。よって CPT2 の発現を回復させるような薬剤が、肝癌に対する治療薬として有望である可能性が示唆された。さらにアシルカルニチンは HCC を有する NAFLD 患者の血中において有意に上昇しており、AC18：1 にも同様の傾向がみられたことから、血清アシルカルニチンのバイオマーカーとしての有用性や病態への関与について、さらに検討する価値があると考えられた。

NASH・肥満関連肝癌に起きている metabolic reprogramming



87. 肥満関連肝癌に特異的な代謝変化に基づく新規治療戦略

中川　勇人

東京大学 医学部附属病院 消化器内科

Key words：肝細胞癌，非アルコール性脂肪肝炎，metabolic reprogramming

緒　言

近年肝炎ウイルスの関与のない肝細胞癌（hepatocecllular carcinoma：HCC）の割合が増加しており、背景には肥満人口の増加に伴う非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis：NASH）の罹患率上昇がある。加えて肥満はウイルス性肝炎からの発癌も促進することが知られている。しかしながら、肥満や NASH による発癌促進機構は未だ不明な点が多い。最近癌細胞は、周囲の環境に適応しかつ自身の成長に有利な状況を作り出すため、正常細胞とは異なった固有の代謝変化、いわゆる“metabolic reprogramming”が生じていることが明らかとなりつつあり、治療標的としても注目されている。一方、肥満や NASH を背景とした肝癌において、癌細胞に脂肪が蓄積し NASH 類似の組織像を示す Steatohepatitic HCC（SH-HCC）という亜型が比較的高頻度（約 30%）にみられることがわかってきた。興味深いことに、我々はこれまでいくつかの NASH・肥満関連肝癌マウスモデルを樹立し報告してきたが、いずれのモデルにおいても腫瘍部に強い脂肪沈着があり、SH-HCC に似た組織像を呈していた［1］。よって SH-HCC は NASH・肥満関連肝癌固有の代謝変化を反映し、発癌促進機構解明の鍵を握るのではないかと仮説を立て、本研究を行った［2］。

方法および結果

1.　マウス肥満関連肝癌組織を用いたメタボローム解析（Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: LC-MS）

生後 2 週齢のマウスに肝化学発癌剤 Diethylnitrosamine（DEN）を投与した後、高脂肪食を与えると肝発癌が促進されることが知られている［3］。そこで DEN 投与後に通常食および高脂肪食下で飼育した 8 か月齢のマウスの癌部・非癌部組織（通常食非腫瘍部：ND-NT、通常食腫瘍部：ND-HCC、高脂肪食非腫瘍部：HFD-NT、高脂肪食腫瘍部：HFD-HCC）を採取し、Human Metabolome Technologies 社にてメタボローム解析（LC-MS）を行い、肥満関連肝癌に起きている代謝変化を脂溶性物質の観点から網羅的に解析した。その結果、様々な炭素数のアシルカルニチン（脂肪酸がミトコンドリア内膜に運搬される際、アシル CoA とカルニチンが結合して生成される化合物）が癌部で増加しており、さらに高脂肪食負荷によって際立って増加していた（図 1）。

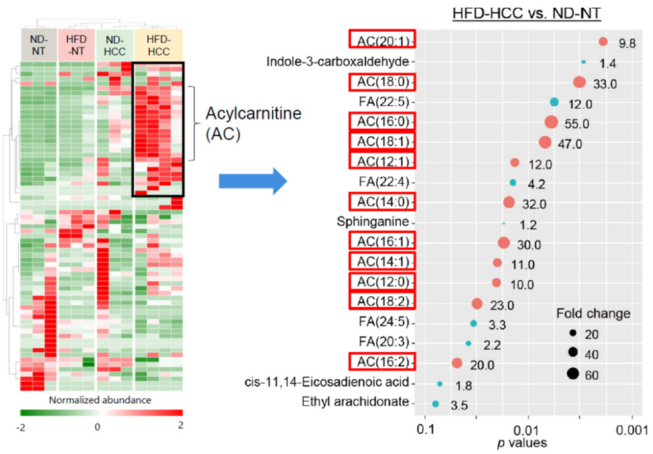


図 1. マウス肝癌組織を用いたメタボローム解析（LC-MS による脂質分析）

2. アシルカルニチン代謝に関連する酵素の発現解析

次に肥満関連肝癌でアシルカルニチンが蓄積する原因を調べるため、アシルカルニチン代謝に関連する遺伝子の発現を調べた。肥満関連肝癌では脂肪酸からアシル CoA を生成する酵素 long-chain acyl-CoA synthethase 4 や、アシル CoA とカルニチンを結合させアシルカルニチンを生成する酵素 carnitine palmitoyltransferase（CPT）1A の発現が亢進している一方で、ミトコンドリア内でアシルカルニチンからカルニチンとアシル CoA に分解する酵素 CPT2 の発現が低下していた。すなわち癌部では、アシルカルニチンを合成する経路が活性化している一方、分解が低下しており、細胞内にアシルカルニチンが蓄積しやすい状況になっていることがわかった。中でも CPT2 の発現低下は、他の NASH・肥満関連肝癌モデルでも共通して認められる所見であり、それは転写因子 PPARα の発現低下に起因していた。また CPT2 の発現はヒト HCC 組織においても有意に低下しており、特に SH-HCC において顕著であった（図 2）。

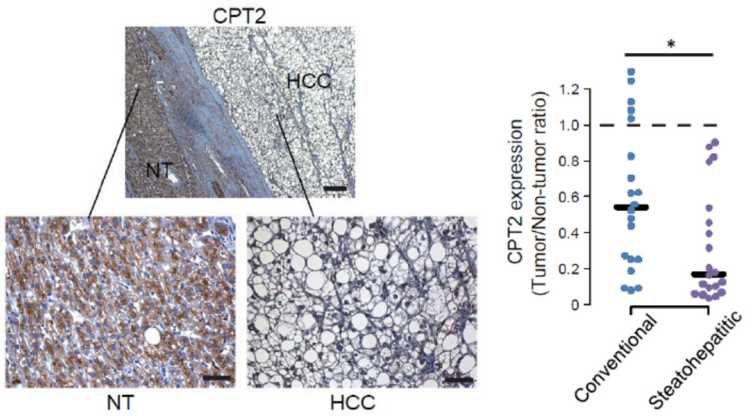


図 2. ヒト肝細胞癌組織における CPT2 の発現

左図：CPT2 免疫染色（scale bar：上段 200μm、下段 50μm）

右図：非癌部と癌部における CPT2 発現比を conventional HCC と SH-HCC の間で比較

(*, $p < 0.05$, Student's t-test)

3. 肥満関連肝癌における CPT2 発現低下の意義

一般に癌では β 酸化が亢進しており、その増殖に利用しているとされることが多いが、肥満関連肝癌ではむしろ CPT2 発現低下によって β 酸化が抑制されていることがわかった。その理由を突き止めるため、Dih10 細胞で CPT2 をノックダウン（KD）しそのフェノタイプを解析した。CPT2 を KD しても細胞増殖には変化がなかったが、パルミチン酸やステアリン酸といった飽和脂肪酸による細胞死、いわゆる脂肪毒性に耐性を示すことが分かった。またその効果は細胞死誘導に重要な Src-JNK 経路活性化を抑制することによって発揮されていた（図 3）。

肥満患者においては、食事から摂取する総脂肪量が多いだけでなく、インスリン抵抗性を介して内臓脂肪からの脂肪分解も亢進しており、これらが門脈を通って多量に肝細胞へ流入する。この肝細胞への過剰な脂肪蓄積は脂肪毒性による肝細胞死・炎症・線維化を惹起し、NASH から発癌へと病態が進展していく引き金となる。しかし一方で、癌細胞はこのような lipid-rich な環境に適応し生存していかなければならないと考えられる。これは多くの癌の中でも、NASH・肥満関連肝癌にかなり特異的な癌微小環境と言える。よって CPT2 発現低下は、脂肪毒性を回避し lipid-rich な環境に適応するための合目的な反応と考えられた。

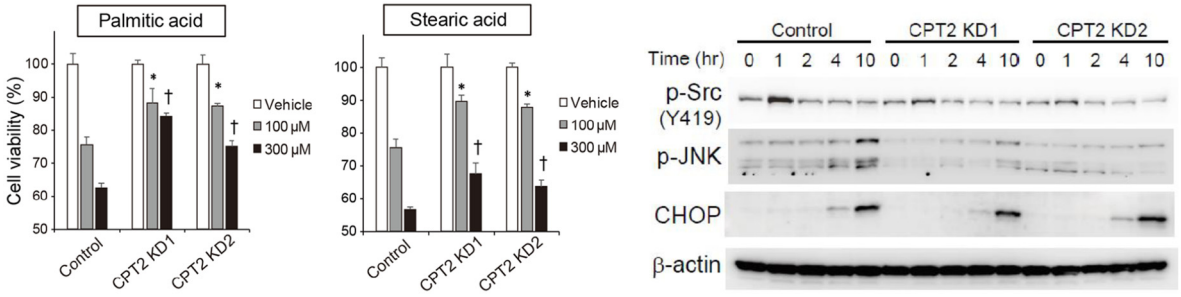


図 3. CPT2 発現低下が飽和脂肪酸による脂肪毒性に与える影響

左図 : control および CPT2 KD Dih10 細胞を飽和脂肪酸で刺激し、24 時間後の cell viability を比較。

(* : $p < 0.05$ vs control 100 μM パルミチン酸 or ステアリン酸、† : $p < 0.05$ vs control 300 μM パルミチン酸 or ステアリン酸、 Student's *t*-test)

右図 : control および CPT2 KD Dih10 細胞を 200 μM パルミチン酸で刺激し、それぞれのタンパクの発現量をウエスタンブロットで比較。

4. アシルカルニチン蓄積が肝発癌に与える影響

次に癌組織に蓄積しているアシルカルニチンが、単なる CPT2 発現低下の surrogate marker なのか、あるいは直接癌化に寄与しているのかを検討した。肥満関連肝癌で顕著に蓄積していたアシルカルニチンである AC16 : 0 と AC18 : 1 を肝癌細胞 Dih10 に添加しそのフェノタイプを解析したところ、AC18 : 1 が stem cell marker の発現上昇を伴い肝癌の sphere 形成能を促進する作用を有することがわかった。AC18 : 1 添加によって STAT3 Y705 のリン酸化が増加していしており、STAT3 阻害剤によって AC18 : 1 による stem cell marker 発現上昇や sphere 形成能亢進がキャンセルされたことから、これらの作用は、STAT3 を介した作用であることが示唆された（図 4)。すなわち、腫瘍組織に蓄積しているアシルカルニチンには、直接腫瘍形成を促進する作用があることがわかった。

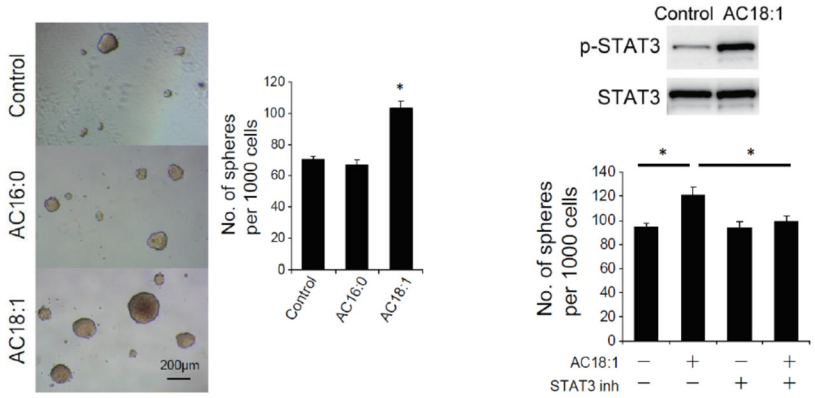


図 4. アシルカルニチンによる肝腫瘍形成能促進効果

左　図 : Dih10 細胞の sphere 形成能における AC16 : 0 および AC18 : 1 の影響（いずれも 5 μM）

(* : $p < 0.05$ vs control、Student's *t*-test)

右上図 : Dih10 細胞に AC18 : 1（5 μM）を添加し、24 時間後に STAT3 のリン酸化をウエスタンブロットで検討

右下図 : STAT3 阻害剤 WP1066（2 μM）は、AC18 : 1 による Dih10 細胞の sphere 形成能亢進効果を抑制する

(* : $p < 0.05$、Student's *t*-test)

5. NAFLD 症例における血清アシルカルニチン分析

次にアシルカルニチンのバイオマーカーとしての可能性を探索するため、生検で非アルコール性脂肪肝（NAFLD）と診断された 250 名（HCC なし 222 名、HCC あり 28 名）の血清アシルカルニチン濃度を測定した。マウスの実験結果と同様に、HCC を有する NAFLD 患者では有意に血清アシルカルニチンが高値であった（図 5 左）。

さらに NAFLD 241 症例の血清を用いて、LC-MS/MS によって不飽和を含む AC0～18 の 16 種類のアシルカルニチン濃度を測定し、病態との関連を詳細に検討した。すると肝線維化進行とともに長鎖不飽和アシルカルニチンが増加する傾向にあり、NAFLD→NASH→LC→HCC と変化するにつれて AC14：1^{high}/AC18：1^{high}／AC5：0^{low} という特徴的シグニチャーを示す割合が有意に増加していた（図 5 右）。また先天性 *CPT2* 欠損症の診断に用いられる、アシルカルニチン増加とミトコンドリア β 酸化能低下の両者を反映する指標（AC16：0＋AC18：1）／AC2：0 は、肝線維化とは独立した有意な肝癌関連因子であり、マウスの実験結果を裏付ける結果となった。

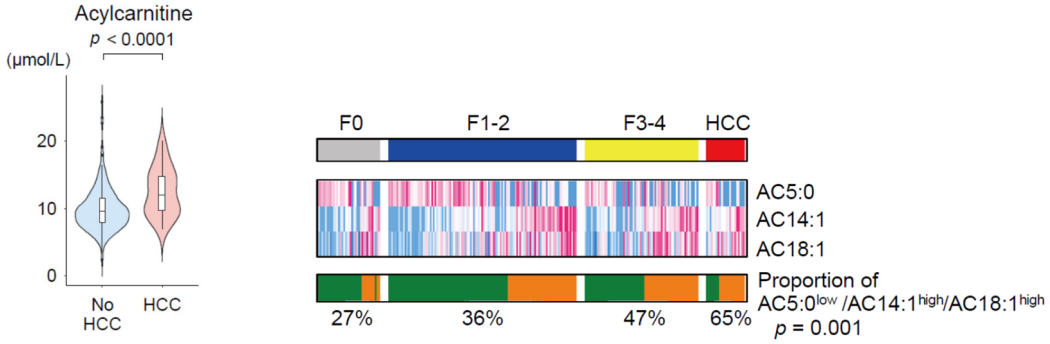


図 5. NAFLD 患者における血清アシルカルニチン濃度

左図：HCC の有無による NAFLD 患者の血清アシルカルニチン濃度（Student's *t*-test）

右図：NAFLD 症例における AC14：1^{high}/AC18：1^{high}／AC5：0^{low} の割合。

病態進展とともにその割合が増加する（p＝0.001、Cochran-Armitage test）。

考　察

NASH・肥満関連肝癌では CPT2 発現低下を介した metabolic reprogramming が生じており、過剰な β 酸化を抑制することで脂肪蓄積という病理像が現れると同時に、脂肪毒性を回避することによって lipid rich な環境に適応しており、さらにアシルカルニチン蓄積を介して腫瘍形成に有利に働いていることがわかった。肥満患者では、これらの総和として肝発癌が促進されるという、一つのメカニズムが明らかとなった。よって CPT2 の発現を回復させるような薬剤が肝癌に対する治療薬として有望である可能性が示唆された。また血清アシルカルニチンのバイオマーカーとしての有用性や病態への関与について、さらに検討する価値があると考えられた。

文　献

1) 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):331-343. PMID: 25132496 DOI: 10.1016/j.ccr.2014.07.001.

2) Fujiwara N, Nakagawa H, Enooku K, Kudo Y, Hayata Y, Nakatsuka T, Tanaka Y, Tateishi R, Hikiba Y, Misumi K, Tanaka M, Hayashi A, Shibahara J, Fukayama M, Arita J, Hasegawa K, Hirschfield H, Hoshida Y, Hirata Y, Otsuka M, Tateishi K, Koike K. CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis via acylcarnitine accumulation in obesity. Gut. 2018 Aug;67(8):1493-1504. PMID: 29437870 DOI: 10.1136/gutjnl-2017-315193.

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. PMID: 20141834 DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.052.