

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control.

研究開発課題名： (日本語) 肥満誘導性肝がんの微小環境における脂質代謝物を標的とした治療戦略  
(英語) Treatment strategy of obesity-associated liver cancer by targeting lipid metabolites in the liver tumor microenvironment.

研究開発担当者 (日本語) 東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 教授 大谷 直子  
所属 役職 氏名： (英語) Naoko Ohtani, Professor, Department of Applied Biological Science,  
Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science.

実施期間： 平成27年9月1日 ～ 平成30年3月31日

分担研究 (日本語) マウスモデルを用いた脂肪酸代謝物制御による肥満誘導性肝癌の治療法・予防法の開発  
開発課題名： (英語) Development of prevention and treatment strategy of obesity-associated liver cancer by regulating lipid metabolites using mouse models.

研究開発分担者 (日本語) 大谷 直子  
所属 役職 氏名： (英語) Naoko Ohtani

分担研究開発課題名 (実施内容)：

分担研究 (日本語) 肝癌発症マウスの腸内細菌プロファイルの解析とプロバイオティクス開発  
開発課題名： (英語) Probiotics strategy by profiling of gut microbiota in mice with obesity-associated liver cancer.

研究開発分担者 (日本語) 蒲池史卓  
所属 役職 氏名： (英語) Fumitaka Kamachi

分担研究 (日本語) PGによる肥満関連肝癌微小環境の免疫細胞への作用解析  
開発課題名: (英語) The effect of Prostaglandins on the immune cells in obesity-associated liver cancer microenvironment.

研究開発分担者 (日本語) 蒲池史卓  
所属 役職 氏名: (英語) Fumitaka Kamachi

分担研究 (日本語) 肥満関連癌症例の血液試料分析による肥満関連癌のバイオマーカーの同定  
開発課題名: (英語) Identification of Biomarkers of obesity-associated HCC using human serum.

研究開発分担者 (日本語) 長山 聡  
所属 役職 氏名: (英語) Satoshi Nagayama

分担研究 (日本語) 肥満関連肝癌 (NASH 肝癌) の病理組織解析と病理情報の提供・分析  
開発課題名: (英語) Pathological analysis of human NASH associated HCC.

研究開発分担者 (日本語) 神田浩明  
所属 役職 氏名: (英語) Hiroaki Kanda

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

研究開発代表者は、マウスモデルを用いた先行研究において、高脂肪食摂取により肥満誘導性肝癌が高頻度に発症することを見出した。肥満誘導性肝癌の腫瘍部においては著しい脂質の蓄積が認められ、詳細を検討した結果、腫瘍部の肝星細胞で肥満誘導性に増加するグラム陽性腸内細菌成分 LTA の肝移行による Toll-like receptor2 (TLR2) を介する炎症シグナル経路が、アラキドン酸からのシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) 経路を活性化し、腫瘍部では脂肪酸の一種であるアラキドン酸の COX-2 による代謝物、プロスタグランジン (PG) 類が多く蓄積していることがわかった。一方で TLR2 経路を抑制すると腫瘍形成が著しく抑制されたことから、グラム陽性菌⇒TLR2⇒COX-2⇒PG という炎症シグナル経路が肥満誘導性肝癌の腫瘍形成に重要であることが強く示唆された。そこで、本研究ではこの経路に着目し、この経路を標的にした肥満誘導性肝癌の治療法・予防法の開発を目的としている。

マウスの肝臓で過剰産生されている数種類の PG (プロスタグランジン) のうち、どの PG が免疫細胞に影響を及ぼすのか調べるため、マウスの肝臓から免疫細胞を取り出し、免疫細胞が産生するサイトカインやケモカインの量をマルチプレックス法にて検討した。その結果、PGE2 のみが、免疫細胞が産生する IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  の産生を抑制することがわかった。また、肝腫瘍部では PGE2 の 4 つのレセプターのうち、EP4 が高発現し EP4 レセプターは免疫細胞にのみ発現していた。そのため EP4 のアンタゴニストをマウスに投与してその経路の影響を調べた。EP4 アンタゴニストを 19 週齢から 30 週齢まで投与したところ、肝腫瘍形成が有意に抑制された。一方で、直接、PGE2 には肝実質細胞の増殖を変化させる効果は認められなかった。

次に、肝癌発症マウスの腸内細菌プロファイルを 16SrRNA 遺伝子配列の塩基配列の解析から検討した結果、野生型肥満マウス、および腫瘍が減少した TLR2 ノックアウト肥満マウスとも普通食摂取マウスに比べて、高脂肪食摂取で Firmucutes 門 (グラム陽性) の菌が著しく増加していた。しかし、今のところ特異的に増加傾向のある菌種の同定までは至っていない。

次に神田浩明研究分担者の協力のもと、ヒトの肥満関連肝癌サンプルにおいても、COX-2 経路が働いているかどうか検討した。ヒトの NASH 肝癌の臨床サンプルを用いて腫瘍部で COX-2 の発現を調べたところ、肝腫瘍部の周囲の線維化が少なく、腫瘍部に脂質の蓄積量の多い症例で、腫瘍部に存在する肝星細胞における COX-2 の発現上昇と PGE2 の過剰産生が認められた。また、長山聡研究分担者の協力のもと、ヒトの血清サンプルを用いて、COX-2 活性を反映するバイオマーカーを検討中である。

英文

Recent studies have shown that gut microbiota may influence liver diseases by transferring its metabolites and components. We show that the hepatic translocation of obesity-induced lipoteichoic acid (LTA), a Gram positive gut microbial component, promotes HCC development by creating a tumor-promoting microenvironment. LTA enhances the senescence-associated secretory phenotype (SASP) of hepatic stellate cells (HSCs) to upregulate the expression of SASP factors and cyclooxygenase-2 (COX-2) through Toll-like receptor (TLR) 2. We also observed severe lipid accumulation in the liver, and so we wondered some lipid was involved in liver carcinogenesis. Interestingly, lipidomics analysis revealed that prostaglandin E2 (PGE2) was overproduced in the tumor region. Moreover, we found that COX-2-mediated PGE2 production suppresses the anti-tumor immunity through EP4 receptor, thereby contributing to HCC progression, since we observed that EP4 antagonist treatment for 11 weeks effectively suppressed HCC development. 16S rRNA gene sequencing analysis revealed that Phylum Firmicutes was increased by high fat diet. However, we have not identified specific pieces which is involved in obesity-associated HCC. Moreover, COX-2 overexpression and excess PGE2 production were detected in HSCs in human HCCs with non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), indicating that a similar mechanism could function in humans. We showed the importance of gut-liver axis in obesity-associated HCC. Gut microbiota-driven COX-2 pathway produced lipid mediator, PGE2 in the senescent HSCs in the tumor microenvironment which plays a pivotal role to suppress antitumor immunity, suggesting that PGE2 and its receptor could be novel therapeutic targets for non-cirrhotic NASH-associated HCC. Moreover, we have been trying to identify bio-markers in human serum which are associated with obesity-associated HCC, but have not identified so far yet.

### Ⅲ. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 1件)

1. Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, Yoshimoto S, Kanda H, Arai Y, Nakajima-Takagi Y, Iwama A, Koga T, Sugimoto Y, Ozawa T, Nakamura M, Kumagai M, Watashi K, Taketo MM, Aoki T, Narumiya S, Oshima M, Arita M, Hara E, Ohtani N. Gut Microbiota Promotes Obesity-Associated Liver Cancer through PGE2-Mediated Suppression of Antitumor Immunity.

Cancer Discov. 2017 7:522-538. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0932. Epub 2017 Feb 15.

2. Li, J., Motoi, N., Kanda, H., Sugiura, Y., Nagano, H., Yonese, J., Okumura, S., Matsumoto, S., Machinami, R., Ishikawa, Y. A newly-emerged osteosarcomatous dedifferentiation of liposarcoma in lung metastasis; a potential diagnostic pitfall Pathology Int., 67(1):50-52, 2017. doi: 10.1111/pin.12482.

3. Shigematsu, Y., Kanda, H., Konishi, T., Takazawa, Y., Inoue, Y., Muto, T., Ishikawa, Y., Takahashi, S. Recurrence 30 years after surgical resection of localized rectal neuroendocrine tumor. Internal medicine, in press.

4. Kanda, H., Furuta, R, Motoi, N, Suzuki, N, Furuta, N, Komatsu, K, Sugiyama, Y, Saiura, A, Sugitani, M, Ishikawa, Y Touch cytology smear of an inflammatory hepatocellular adenoma displaying an unusual pattern: A case report. Diagnostic Cytopathology, 44(12):1074-1077, 2016 doi: 10.1002/dc.23541.

5. Fukuda, K, Uehara, Y, Nakata, E, Inoue, M, Shimazu, K, Yoshida, T, Kanda, H., Nanjo, H, Hosoi, Y, Yamakoshi, H, Iwabuchi, Y, Shibata, H A Diarylpentanoid Curcumin Analog Exhibits Improved Radioprotective Potential in the Intestinal Mucosa International Journal of Radiation Biology, 92(7):388-394, 2016 doi: 10.3109/09553002.2016.1164910.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 口頭 大谷直子 細胞老化の誘導メカニズムとその生体内における役割 日本生化学会東北支部第 82 回例会・シンポジウム 弘前 2016.5.21. 招待講演、国内

2. 口頭 大谷直子 肥満による肝がん促進機構 ～腸内細菌代謝物の関与～ 第 11 回日本実験動物学会総会、シンポジウム 腸内細菌による生体恒常性維持 ～腸内細菌が引き起こす疾患～ 川崎 2016.5.18.川崎 (招待講演、国内)

3. 口頭 大谷直子 細胞老化による炎症とその 生体における役割 第 15 回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム 6 炎症を標的とした疾患発症メカニズムの解明 福岡 2015.05.29. 福岡 (招待講演、国内)

4. 口頭 大谷直子 肥満による肝がん促進機構 ～腸内細菌代謝物の関与～ 第 18 回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会 教育講演 III 病態と治療法を探る 東京 2015.08.29.東京 (招待講演、国内)
5. 口頭 Naoko Ohtani. Gut microbiota and obesity-associated hepatocarcinogenesis. The 74th Annual meeting of The JCA (日本癌学会) Symposium: “Microbiome and cancer” Nagoya, Japan, October, 10, 2015 (招待講演、国内)
6. 口頭 大谷直子、羅 智文 肥満により増加する腸内細菌による肝がん促進機構 第 36 回 日本肥満学会 シンポジウム「肥満と臓器障害」名古屋 2015.10.2. (招待講演、国内)
7. 口頭 大谷直子 腸内細菌代謝産物による細胞老化の誘導と肝がん 第 11 回 日本食品免疫学会学術大会、シンポジウム 3 老化と腸内環境、腸管機能 東京 2015.10.16. (招待講演、国内)
8. 口頭 Naoko Ohtani. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence-associated secretome. 24th Symposium on Intestinal Flora, Dynamism of Intestinal microbiota - pathophysiology of microbial metabolites - Tokyo Japan, October, 30, 2015 (招待講演、国内)
9. 口頭 Naoko Ohtani. The Mechanism of Obesity-associated Liver Carcinogenesis: a co-operation between gut microbial metabolites and lipid. The International Liver Congress 2016, Barcelona Spain, April, 14, 2016 (招待講演、国外)
10. 口頭 Naoko Ohtani. Cellular Senescence and Tissue regeneration. 3rd ICRS Summit – Kyoto, Japan 2016, Kyoto Japan, April, 10, 2016 (招待講演、国内)
11. 口頭 Naoko Ohtani The mechanism of obesity-induced liver cancer development through gut microbial components and metabolites. Bridging Biomedical Worlds meeting, Frontiers in Human Microbiota Symbiotic Interactions, Hong Kong, China, May, 24, 2016 (招待講演、国外)
12. 口頭 大谷直子 肥満により増加する腸内細菌による肝がん進展メカニズム 第 16 回抗加齢医学会総会シンポジウム 腸内フローラの臨床への展開 横浜 2016.6.12 (招待講演、国内)
13. 口頭 Naoko Ohtani The role of gut microbiota for obesity-induced liver cancer development. RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2016, Immune homeostasis and diseases. 2016.6.16 Yokohama, Japan (招待講演、国内)
14. 口頭 Naoko Ohtani The role of gut microbiota for obesity-associated liver cancer progression. Tokyo University of Science, International Symposium of the Center for Animal Disease Models 2016 - Metabolic disease and Aging-. 2016.7.16 Tokyo, Japan (招待講演、国内)

15. 口頭 大谷直子 p16INK4a による個体老化の新たなメカニズム 第 89 回日本生化学会大会 シンポジウム 加齢にともなう幹細胞変化と疾患の分子基盤 仙台 2016.9.27 (招待講演、国内)
16. 口頭 大谷直子 細胞老化・SASP とその生体における役割 日本放射線影響学会 第 59 回大会 シンポジウム 低線量放射線生物影響の課題への分子生物学的アプローチ 広島 2016.10.28 (招待講演、国内)
17. 口頭 Tze Mun Loo and Naoko Ohtani Cooperative role of gut microbial components and metabolites in obesity-associated liver cancer development. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Symposium 10 (日本癌学会), Therapeutic vulnerability in infection/inflammation-associated cancer. 横浜 2016.10.7 (招待講演、国内)
18. 口頭 羅 智文、蒲池史卓、渡辺喜洋、大谷直子 肥満誘導性の腸内細菌代謝物による肝星細胞の細胞老化・SASP と肝がんの促進 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 臓器老化による臓器間ネットワークの破綻を探る 横浜 2016.12.2 (招待講演、国内)
19. ポスター 熊谷 実保、蒲池 史卓、安藤 達也、新井 友里子、井手口 真理、中村 大、小澤 崇之、渡辺喜洋、山崎 翔太、羅 智文、大谷 直子 規則的な運動は肥満誘導性肝腫瘍の発症を抑制する 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016.12.2 (国内)
20. ポスター 中村 大、蒲池 史卓、山崎 翔太、新井 達也、原田 陽介、久保 允人、羅 智文、吉本 真、中江 進、原 英二、大谷 直子 肥満誘導性肝臓癌における interleukin-33 の役割解明 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016.12.2 (国内)
21. ポスターと口演 Fumitaka Kamachi, Shota Yamazaki, Tatsuya Arai, Yohsuke Harada, Masato Kubo, Susumu Nakae, and Naoko Ohtani IL-33 promotes obesity-associated liver cancer development 第 45 回日本免疫学会学術集会 The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 沖縄県宜野湾市 2016.12.6 (国内)
22. 口頭 神田浩明、山本智理子、齋浦明夫、加藤 洋、石川雄一、北川知行 メタボリック症候群関連肝がんの特徴第 105 回日本病理学会総会 仙台 2016/5/12-14 (国内)
23. ポスター Kanda H, Yamamoto N, Saiura A, Ishikawa Y, Kitagawa T Characteristics of metabolic syndrome related hepatocellular carcinoma (HCC) in Japan 2016World Cancer Congress, UICC, Paris 2016/10/31-11/3, (国外)
24. ポスター 神田浩明、マハムット ヤセン、重松康之、若槻尊、山本智理子、齋浦明夫、石川雄一、北川知行 肝細胞がんにおける PD-L1 の発現様式 第 75 回日本癌学会学術集会横浜 2016/10/6-8, (国内)
25. 口頭 Kanda H, Furuta R, Motoi N, Suzuki N, Furuta N Komatsu K, Sugiyama Y, Saiura A, Sugitani M, Ishikawa Y 国際細胞学会(ICC) 横浜 2016/5/28-6/1 (国内)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 腸内フローラと疾患～肥満で増える腸内細菌が発がんを促進するメカニズム～ 大谷直子 東京理科大学フォーラム 2016 2016/10/31
2. 腸内フローラと疾患 ～細胞老化ー腸内細菌が発がんを促進するメカニズム～ 大谷直子 東京理科大学 こうよう会 茨城県支部 講演会 2017/2/25

上記以外に、発表論文の詳細や研究内容は、大学や研究室のウェブサイトを通じて公開し、広く国民に発信している。

(4) 特許出願  
該当なし