日常食生活が非アルコール性脂肪性肝炎からの肝がん発生に及ぼす影響の分子基盤について

立 石 敬 介
東京大学消化器内科　助教

緒　　言

非アルコール性脂肪肝、脂肪性肝炎（NASH）は食事の西洋化と共に増加しつつあり、経過中、肝細胞癌の発生母地となることが知られている。当研究はその肝炎進展を増悪あるいは軽快させうる要因を、脂肪酸のような日常の食品摂取に関連の深いものに焦点を当て、とくに肝における遺伝子発現のエピジェネテイクス制御異常の観点から検討するものである。この肝への脂肪蓄積から起因する病態をエピジェネテイクス制御異常から検討するという試みは、最近の申請者の報告に基づいている[1)]。申請者はヒストンのメチル化制御に重要な酵素をコードする遺伝子 *Jhdm2a* を欠損するマウスを作成し、そのマウスが脂肪肝を含めたメタボリックシンドロームと同様の表現型を示すことを報告した。そしてヒストンのメチル化を含めたエピジェネテイクス制御が生体内での脂質代謝系遺伝子の発現に重要であることを明らかにした。これらの知見と、非アルコール性脂肪肝、脂肪性肝炎（NASH）の進展が食生活に相関するという数々の報告を考え合わせると、個々人の食生活の嗜好に起因する代謝臓器におけるエピジェネテイクスパターンの違いがNASH などの脂肪代謝異常由来の病態に関与する可能性が考えられる。

今さら B 型および C 型ウイルス性肝炎、肝硬変が肝細胞がんの発生母地であることは言をまたないが、NASH などの非ウイルス性肝障害も肝細胞がんの危険因子となることが示されている。驚くべきことに、当科症例を用いた臨床疫学的検討により、内臓脂肪の量および Body mass Index が NASH からの肝細胞がん発生に有意に相関することが明らかとなった[2)]。つまり全身の栄養代謝状態が NASH およびその後の肝細胞がん発生に深く関わる可能性がある。一方では NASH においては肝内の持続性炎症が発がんに重要であるという基礎科学的検討も報告されている。考え合わせると、肝臓内の脂肪組成、あるいは炎症の程度に影響を及ぼす食品があるとすれば、その摂取が NASH の進展と肝がんの発生に臨床医学的な関連をもつ可能性があるといえる。

例えばカフェインや、魚脂由来の EPA 摂取が慢性肝障害における肝線維化を抑制するという数々の知見があるが[3-5)]、その分子生物学的基盤は必ずしも明らかになっていない。最近では EPA にとどまらず様々な脂肪酸が単なる脂質の代謝産物としてではなく、細胞内で様々なシグナル伝達に寄与していることが明らかになってきた。今回の研究では、申請者らが作成した非アルコール性脂肪肝から肝細胞がんを発症するマウスモデルを用いて、その病態に影響を及ぼす因子を検討、とくに肝腫瘍発生に対する脂肪酸組成の影響に焦点をあてた。

実験方法

1．*PIK3CA* トランスジェニックマウスの作成

PI3K シグナリングの異常が代謝や腫瘍形成に関与していると報告されているが、とくに肝臓においても PI3K シグナリングの活性分子である *PIK3CA* の変異が肝がんにて報告されている。しかしながら PI3K シグナリングの異常が *in vivo* の肝臓において腫瘍を発生させるメカニズム、およびそれに関わる因子については必ずしも明らかとは言えない。そこで申請者らは変異型 *PIK3CA* を肝臓特異的に恒常的に過剰発現するトランスジェニック（TG）マウスを作製した。

2．*PIK3CA* トランスジェニックマウスの解析

肝組織所見、血清 ALT 値、肝組織トリグリセライド濃度、肝組織中脂肪酸濃度を野生型と比較した。肝組織及び腫瘍部の各種遺伝子発現も real time RT-PCR で評価した。*in vitro* での腫瘍形成能の評価法として正常肝細胞による colony formation assay の解析も行った。

3．組織中の脂肪酸定量および脂肪酸分画組成の測定

ガスクロマトグラフィー法を用い、肝腫瘍部と非腫瘍部との脂肪酸を測定した。

結　果

1．*PIK3CA* トランスジェニックマウスの肝における脂肪代謝異常

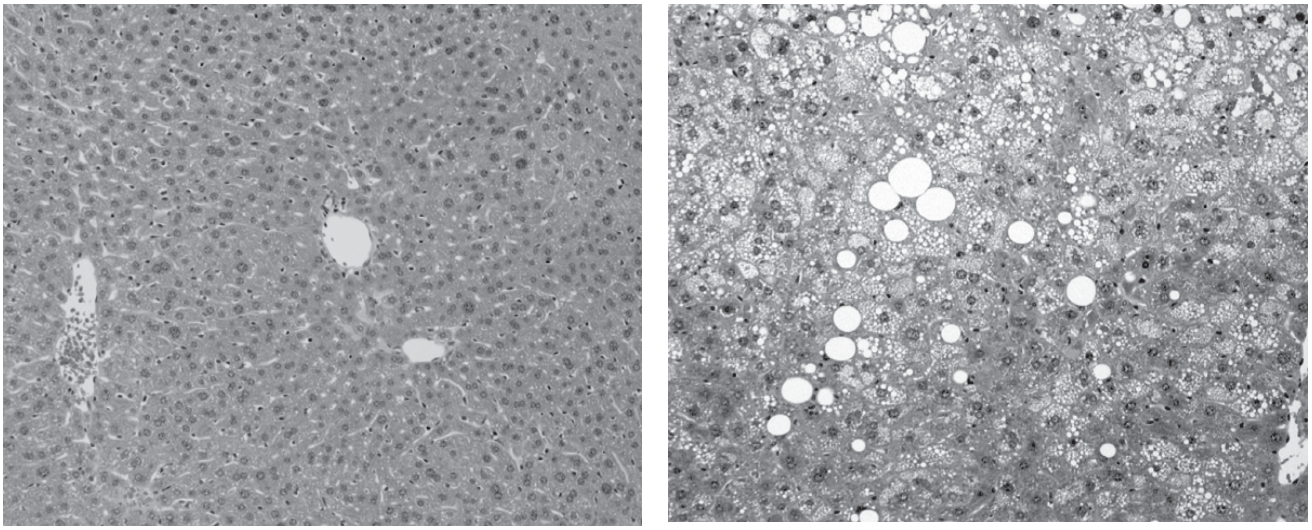
本マウスは通常食でも 4 週令から脂肪肝を呈し（図 1 ）肝トリグリセライドの高値を示した。その TG 肝において脂肪合成にかかわる *Pparg* とその下流分子の発現上昇を認めたことから、この脂肪肝は *Pparg* シグナリングの亢進による肝脂肪合成の増加が寄与していることが示唆された。

2．*PIK3CA* トランスジェニックマウスの肝腫瘍形成

TG マウスは週令とともに肝内に炎症所見を呈し、また生後一年で 90％以上のマウスに肝腫瘍が発生、そのうち 10％の腫瘍が肝細胞がんに至るという表現型を呈した（図 2 ）。このマウスの肝腫瘍組織と非腫瘍部での PI3K シグナリングの活性化を比較すると、腫瘍部においてより強いシグナリングの活性化がみられていた。また遺伝子発現を比較すると *Pten*、*Xpo4*、*Dlc1* などの肝臓における腫瘍抑制遺伝子の発現低下が認められた。この PTEN の発現低下が腫瘍部にて見られた PI3K のより強い活性化に寄与している可能性が考えられた。またこれらのがん抑制遺伝子の発現低下がこのマウスにおける肝腫瘍発生の一因である可能性が示唆された。

3．*PIK3CA* トランスジェニックマウスの肝腫瘍における脂肪酸組成異常

一方で腫瘍部と非腫瘍部の脂肪酸含有量を比較したところ、明らかに腫瘍での総脂肪酸濃度が増加してい



WT　　TG

図 1　生後 24 週齢における肝臓

野生型（WT）と比べてトランスジェニックマウス（TG）では明らかな肝内の脂肪蓄積がみられる。

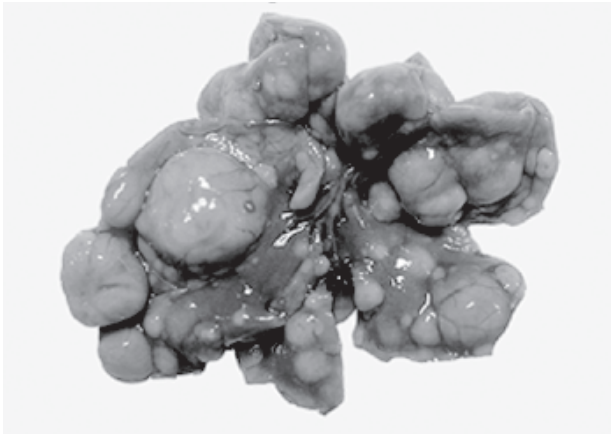


図 2　生後 52 週齢におけるトランスジェニックマウス肝臓

肝臓は多発する腫瘍にてほとんど置き換えられている。

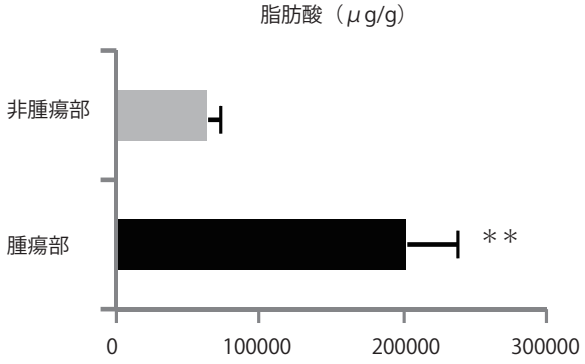


図 3　肝臓内の脂肪酸定量

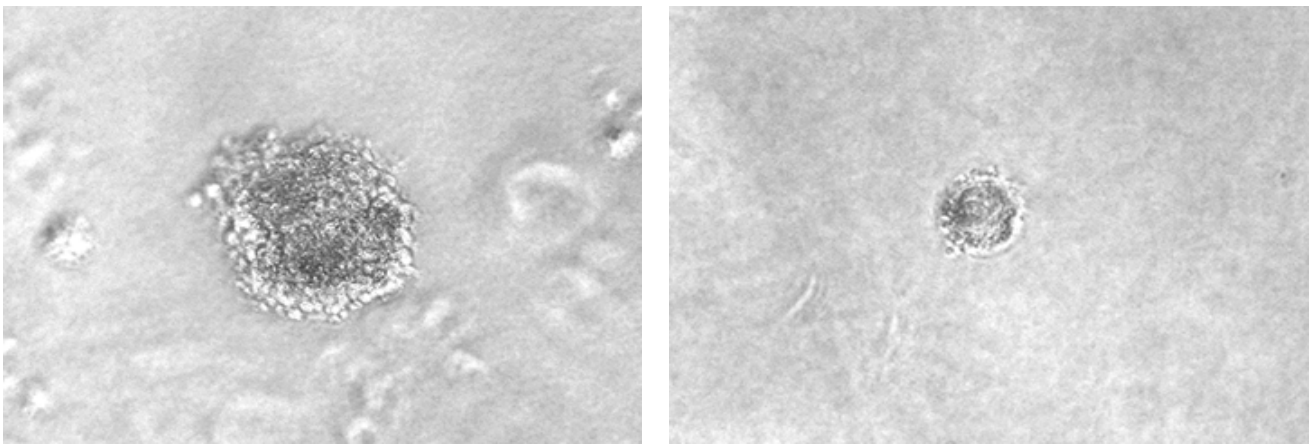
トランスジェニックマウスに生じる腫瘍部では非腫瘍部と比べて有意に脂肪酸含量が増加している。

た (図３)。さらには分画組成を比較したところ、腫瘍部において有意に一価の不飽和脂肪酸群の一部が増加していることが明らかとなった。これらの脂肪酸プロファイルが肝腫瘍発生に及ぼす影響を *in vitro* の実験にて検討した。面白いことに *in vitro* の *PIK3CA* の過剰発現では上記の腫瘍抑制遺伝子の発現低下は見られなかった。またソフトアガーを用いたコロニー形成能の検討でも *in vitro* の *PIK3CA* の過剰発現だけでは腫瘍形成能はみられなかった。一方、腫瘍部で増加していた脂肪酸のうち、オレイン酸の投与にて腫瘍抑制遺伝子群の発現低下が誘導された。そればかりでなく、オレイン酸添加によりコロニー形成能が肝細胞において誘導されることを見出した（図 4)。これらの知見は、オレイン酸のような脂肪酸が、がん抑制遺伝子の発現に影響し、ひいては肝細胞の腫瘍形成に促進的に働きうることを示唆するものであった。最後にオレイン酸によるがん抑制遺伝子の発現調節にヒストン修飾変化を介したエピジェネティクス機構が関与しているかどうかを検討した。*in vitro* でのオレイン酸投与によるいくつかのがん抑制遺伝子の発現低下は、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である TSA および、ヒストン H3K9 のメチル化酵素である G9a の阻害剤である BIX01294 の投与においてその程度が減弱することが明らかとなった。このことはオレイン酸によるがん抑制遺伝子の発現調節においてヒストン脱アセチル化および、ヒストン H3K9 のメチル化などが関与していることを示唆していた。PI3K シグナルの異常亢進に伴う脂肪肝からの腫瘍形成には脂肪酸によるエピジェネティクス抑制などの二次的な要因が重要であることが示唆された。

考　　察

エピジェネテイクスによる転写制御としては、プロモーター領域の DNA のメチル化修飾と、ヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾が大きな役割をもつ。2006 年に JmjC ドメインがヒストン脱メチル化活性を司ることが初めて発見され、ヒストン修飾機構がいずれも可逆性を有することが明らかとなった。同時にこれはいわばヒストンの修飾状態が細胞核内において合目的的にそして動的に制御されている可能性を示唆するものであった。現在ではそれぞれのヒストン修飾状態が互いに影響を及ぼしあうことで、遺伝子発現の制御機構のさらなる多様性を実現しうることも明らかにされつつある。こうした多様なヒストン修飾の変化により紡ぎ出される遺伝子発現の変化が、複雑な生体機能への適応を可能とする一手段なのであろうと推察される。逆にいえば、ヒストン修飾機構の破綻は生体内において様々な病態を引き起こす可能性があるのかもしれない。

最近、ヒストン修飾酵素のコード遺伝子の変異ががんで見つかり、その機能異常と腫瘍形成の関連について多くの研究がなされつつある。また腫瘍発生における細胞内代謝変化の果たす役割についてもその重要性は高まるばかりである。一方現時点では少なくともヒストン修飾制御異常と代謝異常、さらには腫瘍発生との三者の相互



脂肪酸＋　　脂肪酸－

図 4　肝細胞のコロニー形成能
オレイン酸の添加により肝細胞のコロニー形成能が増強される。

関係を *in vivo* での解析を含む形で検討した論文は見当たらない。しかしながら臨床医学においては、非ウイルス、非アルコール性の内臓肥満に伴う肝腫瘍発生はひとつの大きな命題であり、今回の研究がその分子生物学的背景にもひとつの手がかりとなりうることも期待される。

要　約

PIK3CA トランスジェニックマウスの解析から、PI3K シグナルの異常亢進に伴う脂肪肝からの腫瘍形成に脂肪酸という二次的な要因が重要であることを見出した。このことは食生活からも起因する栄養状態の変動が腫瘍形成あるいは進展などに対する二次的な要因となる可能性を示唆した。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、財団法人三島海雲記念財団による研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

文　献

1) Tateishi K, et.al. *Nature* 2009; 458(7239):757.
2) Ohki T, et. al. *Gut*. 2009;58(6):839.
3) Ruhl CE, et. al. *Gastroenterology* 2005,129:1928,
4) Ruhl CE, et. al. *Gastroenterology* 2005,128:24.
5) Ishii H, et.al. *J Hepatol*. 2009,50:562.