

肥満と肝がん：腸内細菌と細胞老化の関与について

原 英二^{1,2}

肥満は糖尿病や心筋梗塞のリスクを高めるだけでなく、さまざまながんの発症率を高めることが知られており、近年先進国でみられるがんの発症率増加原因の一つになっていると考えられている。このため、がん予防の観点からも肥満の防止が重要であることは明らかであるが、残念ながら肥満人口は世界中で増加の一途をたどっている。したがって、肥満防止の取り組みだけではなく、肥満してもがんを発症しないようにする方法の開発も行ってゆく必要がある。これまで、肥満に伴う発がん促進機構については不明な点が多かったが、炎症反応がその中心的な役割をしていることが明らかになってきた。では、なぜ、肥満すると炎症反応が起こるのだろうか？ 最近、我々はマウスを用いた実験により肥満によって増加した腸内細菌の代謝産物が肝臓に運ばれ、肝星細胞に細胞老化を起こさせることで炎症反応が起き、肝がんの発症が促進されることを見いだした。そこで、本稿では肥満に伴う肝がんの発症を腸内細菌と細胞老化の関係から見直すことで肝がん発症機序の解明とがん予防の可能性に迫る。

1. はじめに

先進国においては栄養状態、衛生状態、医療水準、社会福祉制度等の改善によりこの100年間で平均寿命がほぼ2倍に延長した。また、過度な栄養の摂取や運動不足により肥満人口も著しく増加している。一方、このような寿命の延長や生活習慣の変化に伴い、がんの発症率が著しく上昇してきており^{1,2)}、今や日本人の2人に1人ががんを発症し、3人に1人ががんのために亡くなっている。分子標的治療薬の登場によって、がんの治療法は格段に進歩しているが、依然として早期発見が重要であり、進行がんの場合は完治することはきわめて難しく、治療による延命効果は限定的である。中でも肝臓がんの場合、いまだ効果的な分子標的薬の開発には至っておらず、早期発見できなければそれはすなわち死を意味する。肝がんの治療を困難にして

いる原因の一つが、遺伝子異常の多様性にあると考えられている。他の多くのがんではいくつかの鍵となる共通した遺伝子異常が見つかるが、肝がんの場合は患者ごとに遺伝子異常が異なり、さらには、同じ患者の肝がんでも部位によって異なる遺伝子異常が起こっていることも報告されている³⁾。このような現状を考えると、効果的な肝がん治療法の開発を加速させる必要があることはいうまでもないが、それに加えて肝がんの早期発見と予防が重要であることが明らかである。

肝がんのうち最も多いのが肝細胞がん (hepatocellular carcinoma: HCC) であり、全体の約80%を占めている。その主な原因としてHBVやHCV等の肝炎ウイルスの感染、発がん性物質であるアフラトキシンを産生するカビに感染した穀物の摂取、過度なアルコール摂取による肝炎および肥満に伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) 等が知られている。先進国ではワクチンの普及や衛生状態の改善等によりウイルスやカビが原因で発症する肝がんは減少傾向にあるが、NASHが原因とみられる肝がんの発症率は年々増加傾向にある³⁾。これには前述のように寿命の延長と生活習慣の変化が起因していることが明らかではあるが、それと同時にNASH肝がんの発症を予防するための有効な方策がとられていないことを意味している。我々の研究室では加齢や肥満に伴い発がん頻度が上昇する分子メカニズムを解明することを目指して研究を行っている。本稿では最近我々が明らかにした肥満に伴う肝がん発症メカニズムの一つとして、腸内細菌と

¹大阪大学 微生物病研究所 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1)

²公益財団法人がん研究会がん研究所 (〒135-8550 東京都江東区有明3-8-31)

Obesity and liver cancer: the roles of gut microbiota and cellular senescence

Eiji Hara^{1,2} (¹Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, ²The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research (JFCR), 3-8-31, Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870183

© 2015 公益社団法人日本生化学会

細胞老化の関与について紹介する。

2. 肥満による細胞老化と肝がんの誘導

これまで肥満による炎症反応の亢進が発がんを促進する可能性が指摘されていたが^{4,5)}、その詳細なメカニズムについては不明なままであった。我々は肥満による発がん促進のメカニズムの一つとして、「細胞老化」という現象に着目した。細胞老化とは正常細胞に修復不可能なほど大きなDNAダメージが生じた場合に、細胞周期チェックポイント機構が恒常的に活性化することで誘導される不可逆的な細胞増殖停止状態のことである⁶⁾。DNAダメージがもっと大きい場合はアポトーシスが起こることも知られており、細胞老化はアポトーシスと同様に異常を持った細胞が増殖してがん化することを防ぐ重要ながん抑制機構であると長い間考えられてきた（図1参照）。しかし、アポトーシスとは異なり細胞老化を起こした細胞（以下、老化細胞と呼ぶ）はすぐには死滅せず長期間生存し続け、次第に、炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素や増殖因子など、炎症や発がんを促進するさまざまな分泌因子を分泌するSASP（senescence-associated secretory phenotype）と呼ばれる現象を引き起こすようになることが、最近の研究により明らかになってきた⁷⁾。興味深いことに、IL-6やPAI-1などの炎症性サイトカイン等が肥満による発がん促進に深く関与していることが以前から知ら

れていたが^{4,5)}、これらはSASP因子でもある。このため、我々はもしかすると、細胞老化とそれに伴うSASPが肥満による発がん促進に深く関与しているのではないかと考

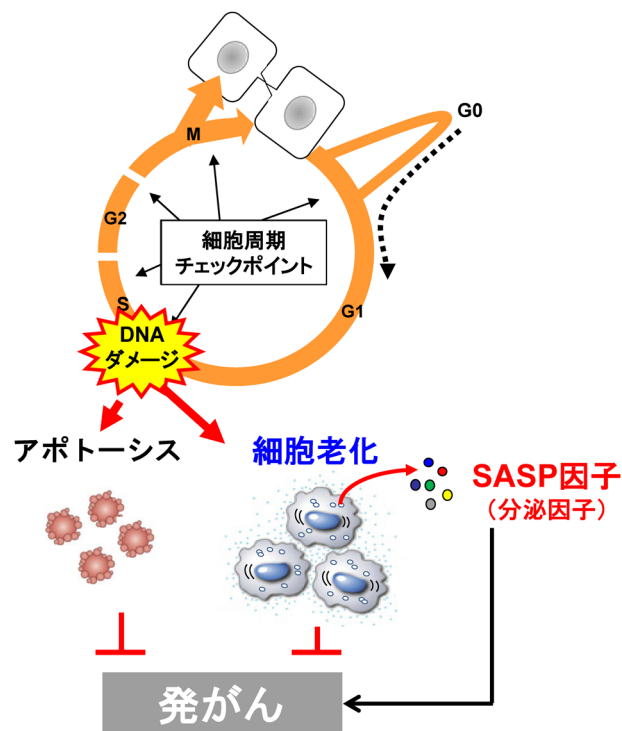
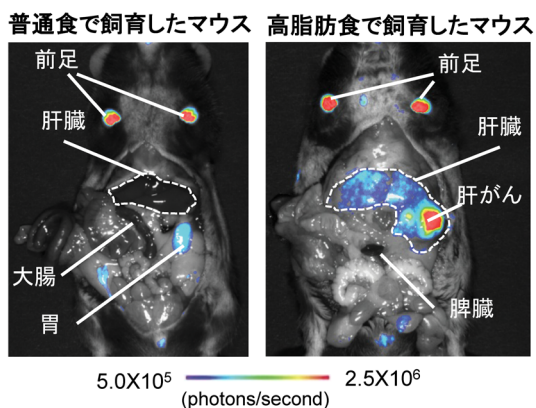


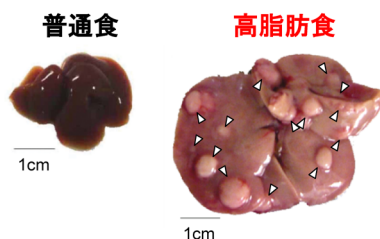
図1 細胞老化はがん抑制と発がん促進の二面性を有している

A

細胞老化反応の*in vivo*イメージング



B



C

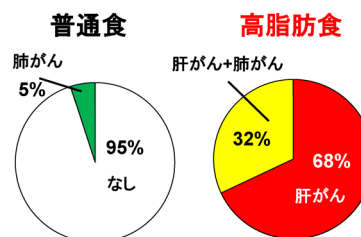


図2 肥満は肝臓に細胞老化と肝がんの形成を誘導する

(A) DMBA塗布後、普通食あるいは高脂肪食で30週間飼育した細胞老化反応イメージングマウス（麻酔下で開腹）。(B, C) 普通食あるいは高脂肪食で30週間飼育した野生型マウスの肝臓の写真、および形成されるがんの種類と発がん頻度。

え、この仮説を証明するためにマウスモデルの構築を試みた。C57BL/6系統のマウスに高脂肪食を与え肥満させただけではがんの発症率に有意な差は得られないことが知られている。そこで、多くのヒトのがんで高頻度に変異が見つかる *ras* 遺伝子に活性化型変異を起こすことが知られている化学発がん物質である DMBA (7,12-dimethylbenz [*a*]anthracene) を生後4~5日のマウスの背中に1回塗布し、その後、高脂肪食 (HFD) 摂取群と普通食 (ND) 摂取群に分けて30週間飼育してみることにした。また、このときに細胞老化の関与を調べるために、細胞老化誘導遺伝子の一つである *p21^{Waf1}* 遺伝子の発現を発光シグナルとして検出できる細胞老化反応イメージングマウス⁸⁾を用いて実験を行うことにした。するとHFD摂取群のすべてのマウスの肝臓に強い発光シグナルが観察され、さらに肝がん (HCC) が形成されていることがわかった⁹⁾ (図2参照)。また、同様の結果がHFDの摂取ではなくNDの過度な摂取により肥満する *ob/ob* マウスの場合にもみられた⁹⁾。一方、DMBA塗布後NDを与えた肥満していないマウスでは肝がんの発症がまったくみられなかったことから、肥満により肝臓に細胞老化反応の誘導と発がんが促進されたと考えられる⁹⁾。

3. 肝星細胞の細胞老化が肥満による肝がんの形成を促進する

次に、肝臓のどの細胞が細胞老化を起こしているかを調べるため、免疫組織化学染色法を用いて検討を行った。その結果、肥満マウスの肝臓のがん部において間質の細胞の一つである肝星細胞で細胞老化の原因であるDNAダメージの蓄積、細胞老化誘導因子である *p21^{Waf1}* や *p16^{INK4a}* の発現および細胞増殖の停止がみられ、肝星細胞が細胞老化を起こしていることが明らかになった。さらに肝星細胞はSASP因子も高発現していることが確認された。これらの結果から、肥満により肝星細胞にDNAダメージが起こり、細胞老化とそれに伴うSASPが起こることで、周囲の肝実質細胞の発がんが促進されたのではないかと仮説を立てた⁹⁾。主要なSASP因子でありかつ他のさまざまなSASP因子の発現誘導に必要なことが知られているIL-1 (IL-1 β) を欠損したノックアウトマウスを用いて解析を行ったところ、野生型マウスと異なり、肥満による肝星細胞のSASPが起らず、肝がんの発症率も著しく低下することがわかった⁹⁾。またsiRNAを用いて肝臓のHSP47の発現をノックダウンする方法¹⁰⁾により肥満マウスの肝星細胞を死滅させてみたところ、肝がんの発症率が著しく低下することがわかった⁹⁾。これらの実験結果から肥満により細胞老化を起こした肝星細胞がSASPを介して周囲に存在する肝実質細胞のがん化を促進していることが明らかになった。

4. 肥満による腸内細菌叢の変化が肝星細胞の細胞老化と肝がんの発症を促進する

では、なぜ肥満すると肝星細胞が細胞老化を起こすのか？ ヒトの腸内には500~1000種類からなる約100兆の細菌が存在しており、腸内細菌の構成は食事や栄養状態によって大きく変化することが知られている。ヒトにおいては肥満に伴いグラム陰性菌が減少し、逆にグラム陽性菌の割合が著しく増加することが明らかにされており¹¹⁾、同様の傾向が遺伝的肥満 (*ob/ob*) マウスにおいても確認されている¹²⁾。次世代シーケンサーを用いてマウスの腸内細菌の16S rRNA 遺伝子配列のメタ解析を行って見たところ、NDを摂取したマウスの腸内細菌では、グラム陽性菌とグラム陰性菌の割合はそれぞれ50%程度とほぼ等しかったのに対し、HFDを摂取して肥満したマウスではグラム陽性菌が90%以上を占めるまでに増加していることが明らかになった⁹⁾。特に、ND摂取マウスではほとんど検出されなかったクロストリジウム (*Clostridium*) クラスター XI に分類される菌 (グラム陽性菌) がHFD摂取マウスで増加していることが明らかになった。この結果は、ヒトや *ob/ob* マウスを用いた以前の報告とも一致する^{11, 12)}。そこで、次にグラム陽性菌のみを特異的に除去する抗生物質 (バンコマイシン) を肥満マウスに投与してみたところ、肝がんの発症や、肝星細胞の細胞老化とSASPの誘導が著しく抑制されることがわかった⁹⁾。さらに、無菌マウスを用いた解析においても同様の結果が観察された (未発表データ)。一方、肝臓にグラム陽性菌はまったく検出できなかったため、肥満により腸管に増殖したグラム陽性菌が産生する代謝産物が血液を介して肝臓に運ばれ、肝星細胞にSASPを誘導することで周囲に存在する肝実質細胞の

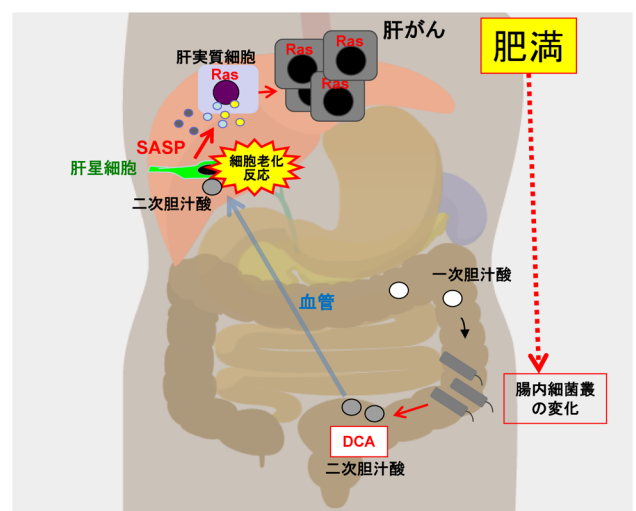


図3 肥満により腸内細菌が産生するDCAが肝がんの発症を促進する

肥満により増加した腸内細菌が産生する二次胆汁酸 (DCA) が、血管を通して肝臓に運ばれることで、肝星細胞にDNAダメージを与え、細胞老化およびSASPを誘導することで、周囲の肝実質細胞のがん化を促進していることが明らかになった。

がん化を促進した可能性が考えられる (図3参照)。

5. 肥満により増加したDCA (二次胆汁酸) が肝星細胞に細胞老化を誘導する

そこで、肥満により増加するグラム陽性菌の代謝産物を同定するため、NDマウスとHFDマウスの血清を用いてLC-MSによるメタボローム解析を行った。その結果、二次胆汁酸の一つであるデオキシコール酸 (deoxycholic acid: DCA) が肥満マウスの血中で顕著に増加していることを見いだした⁹⁾。生体内でコレステロールを基に産生される一次胆汁酸 (コール酸等) は脂肪の消化吸収に必要であり、ヒトやマウスの場合、胆嚢を経て胆汁として十二指腸内に分泌されるが、そのほとんどは回腸末端部から能動的吸収機構により吸収され、門脈を経て再び肝臓に戻り、胆汁中に分泌される。しかし、一部の胆汁酸はこの腸肝循環から外れ、大腸に移動するため、大腸にて一部の腸内細菌が有する7 α -dehydroxylation活性によって二次胆汁酸 (DCA等) に変換されることが知られている¹³⁾。二次胆汁酸の一部は大腸から濃度依存的な受動吸収により肝臓に運ばれるため、その後は一次胆汁酸と同様に腸肝循環されることが考えられている。DCAは活性酸素種を介して細胞にDNAダメージを誘導することが報告されており¹⁴⁾、肥満による肝がんの形成においてDCAが重要な役割を担っている可能性が高いと考えた。そこで、次に肥満マウスにDCAの産生を阻害するDFAIII (diffructose anhydride III) や、胆汁酸の体外への排出を促進するUDCA (ursodeoxycholic acid) を投与して体内のDCA濃度を低下させたところ、肝がんの発症率およびSASPを起こした肝星細胞の数が著しく低下することが確認された。また、逆に肥満マウスに抗生物質を投与して腸内細菌を除去すると同時に化学合成されたDCAを経口投与しておく、肝がんの発症率が低下せず、腫瘍部で肝星細胞の細胞老化とSASPも観察された⁹⁾。これらの実験結果から、肥満により増加した腸内細菌が産生するDCAが肝臓に運ばれ、肝星細胞に細胞老化およびSASPを誘導することで肝がんの発症を促進していることが明らかになった (図3参照)。

興味深いことに肥満マウスで増加していたクロストリジウムクラスターXIに属する菌 (*Clostridium ariake*と命名) の16s rRNA遺伝子のDNA配列はDCA産生菌として知られる *C. hiranonis* や *C. sordellii* と同一性が高く、これらDCA産生菌の類縁菌である可能性が高い⁹⁾。

6. ヒトでも同様のメカニズムが働いている可能性がある

最後に、今回マウスを用いて明らかになった肥満による肝がん促進機構が、ヒトにおいても起こりうるメカニズムかどうかを調べるために、ヒトの培養肝星細胞にDCAを投与してみた。その結果、マウスの培養肝星細胞の場合と同様に細胞老化とSASPの誘導が確認された。さらに、肥

満に伴うNASHを素地とする肝がん患者の約3割において、がん部に肝星細胞の細胞老化とSASPが起こっていることが確認された⁹⁾。古くから健常人にHFDを摂取させると糞便中のDCA濃度が著しく上昇することが知られており¹⁵⁾、ヒトにおいても少なくとも肥満によって起こるNASH肝がんの一部は腸内細菌によるDCAの産生とそれに伴う肝星細胞のSASPによって引き起こされる可能性が高いと考えられる。

興味深いことに、肝星細胞がSASPを起こしていることが確認された症例では肝臓の繊維化や肝硬変がほとんど観察されなかった。この結果は、今回我々が作製したマウスモデル (肥満マウス) の結果とも一致する⁹⁾。これまでNASH肝がんは肝硬変を経て肝がんへと進行すると思われていたが、最近の研究から、NASH肝がんの約3割は肝硬変を伴わないことが報告されており¹⁶⁾、本研究の成果は肝硬変を経ずに直接肝がんへと進行するNASH肝がんの発がんメカニズムの解明につながるのではないかと期待される。

7. おわりに

ヒトの肝がんの場合は*ras*遺伝子そのものに変異が起こっているケースは報告がないが、最近になって*Ras*シグナルが高頻度に亢進していることが報告されており¹⁷⁾、今回我々がマウスを用いて見いだしたのと同様の発がん促進機構がヒトでも起こっている可能性が十分考えられる。本研究により、腸内細菌の代謝産物は腸管だけでなく、血流を介することで全身に作用して発がんを促進する危険性があることが示された。現在我々は、臨床サンプルを用いて、ヒトにおけるNASH肝がんの発症にDCA産生菌およびDCAが関与しているかどうかを解析している。また、本研究で作製した肝発がんモデルマウスを用いて肥満による肝がんの発症を予防する食品素材などの探索を進めている。今後、腸内細菌やその代謝産物を測定することで肥満に伴うがんの発症リスクを予測する方法の開発や、肥満に伴うがんの発症を予防する方法の開発につなげていきたい。

文 献

- 1) Finkel, T., Serrano, M., & Blasco, M.A. (2007) *Nature*, **448**, 767–774.
- 2) Bhaskaran, K., Douglas, I., Forbes, H., dos-Santos-Silva, I., Leon, D.A., & Smeeth, L. (2014) *Lancet*, **384**, 755–765.
- 3) Gravit, L. (2014) *Nature*, **516**(Suppl.), S1–S17.
- 4) Khandekar, M.J., Cohen, P., & Spiegelman, B.M. (2011) *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 886–895.
- 5) Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., & Karin, M. (2010) *Cell*, **140**, 197–208.
- 6) Ohtani, N. & Hara, E. (2013) *Cancer Sci.*, **104**, 525–530.
- 7) Rodier, F. & Campisi, J. (2011) *J. Cell Biol.*, **192**, 547–556.
- 8) Ohtani, N., Imamura, Y., Yamakoshi, K., Hirota, F., Nakayama,

- R., Kubo, Y., Ishimaru, N., Takahashi, A., Hirao, A., Shimizu, T., Mann, D.J., Saya, H., Hayashi, Y., Arase, S., Matsumoto, M., Kazuki, N., & Hara, E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15034–15039.
- 9) Yoshimoto, S., Loo, T.M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., Hara, E., & Ohtani, N. (2013) *Nature*, **499**, 97–101.
- 10) Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., Takayama, T., & Niitsu, Y. (2008) *Nat. Biotechnol.*, **26**, 431–442.
- 11) Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., & Gordon, J.I. (2006) *Nature*, **444**, 1022–1023.
- 12) Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., & Gordon, J.I. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11070–11075.
- 13) Ridlon, J.M., Kang, D.J., & Hylemon, P.B. (2006) *J. Lipid Res.*, **47**, 241–259.
- 14) Payne, C.M., Weber, C., Crowley-Skillicorn, C., Dvorak, K., Bernstein, H., Bernstein, C., Holubec, H., Dvorakova, B., & Garewal, H. (2007) *Carcinogenesis*, **28**, 215–222.
- 15) Rafter, J.J., Child, P., Anderson, A.M., Alder, R., Eng, V., & Bruce, W.R. (1987) *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**, 559–563.
- 16) Torres, D.M. & Harrison, S.A. (2012) *Semin. Liver Dis.*, **32**, 30–38.
- 17) Newell, P., Toffanin, S., Villanueva, A., Chiang, D.Y., Minguez, B., Cabellos, L., Savic, R., Hoshida, Y., Lim, K.H., Melgar-Lesmes, P., Yea, S., Peix, J., Deniz, K., Fiel, M.I., Thung, S., Alsinet, C., Tovar, V., Mazzaferro, V., Bruix, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Friedman, S.L., & Llovet, J.M. (2009) *J. Hepatol.*, **51**, 725–733.

著者寸描

●原 英二 (はら えいじ)

大阪大学微生物病研究所教授。理学博士。

■略歴 1987年東京理科大学理工学部応用生物科学科卒業。93年同大学院修了、(米)University of California Berkeley及び(英)Imperial Cancer Research Fund Laboratoriesでポストドクを経た後、98年(英)Cancer Research UK-Paterson InstituteにてPIとして独立、2003年徳島大学教授、08年より公益財団法人がん研究会がん研究所部長、15年より大阪大学微生物病研究所教授(がん研究会がん研究所部長を兼務)。

■研究テーマと抱負 加齢や肥満に伴う発がんメカニズムの解明を目指しています。

■ウェブサイト <http://www.jfcr.or.jp/tci/canbio/>