

博士論文

研究題目 AIM による新規肝がん治療法開発に向けた基盤研究

氏名 前原奈都美

【目次】

略語一覧	3
要旨	7
序文	8
結果	21
第1章 肝臓における AIM による抗がん作用の発見	
第2章 AIM による HCC 抑制メカニズムの解明	
第3章 高脂肪食負荷以外の原因に由来する HCC に対する AIM の抗がん作用	
考察	95
結語	100
材料と方法	102
引用文献	116
謝辞	127

【略語一覧】

AIM : Apoptosis inhibitor of macrophage

Acta2 : Alpha actin-2

ADCC : Antibody dependent cellular cytotoxicity

AFP : Alpha fetoprotein

α SMA : Alpha smooth muscle actin

Cbl : Casitas b-lineage lymphoma

CDC : Complement-dependent cytotoxicity

CD5L : Cluster of differentiation 5 ligand

CD36 : Cluster of differentiation 36

CD55 : Cluster of differentiation 55

CD59 : Cluster of differentiation 59

CD95L : Cluster of differentiation 95 ligand

CFH : Complement factor H

CHOP : CCAAT/ enhancer-binding protein homologus protein

ColA1 : Collagen alpha-1

CRP : C-reaction protein

CR1 : Complement receptor type 1

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte protein-4

C1-INH : C1 esterase inhibitor

C4BP : C4-binding protein

DAF (CD55) : Decay-accelerating factor (Cluster of differentiation 55)

DC : Dendritic cell

DEN : Diethylnitrosoamine

Dox : Doxycycline

Esp15 : Exocrine gland secreted peptide 15

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ER : Endoplasmic reticulum

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

FASN : Fatty acid synthase

FHL-1 : Factor H-like protein-1

GADD34 : Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34

GPX1 : Glutathione peroxidase 1

GRP78 : Glucose-regulated protein 78

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

HCC : Hepatocellular carcinoma

IL-1 β : Interleukin-1 beta

IL-6 : Interleukin-6

IL-8 : Interleukin-8

IL-10 : Interleukin-10

IDF : International diabetes federation

IDO : Indoleamine 2, 3-dioxygenase

IgG : Immunoglobulin G

IgM : Immunoglobulin M

iMB-AIM/ Hepa1.6 : Inducible Membrane bound-AIM/ Hepa1.6

JNK : c-Jun N terminal kinase

LDL : Low-density lipoprotein

LDLR : Low-density lipoprotein receptor

LTA : Lipoteichoic acid

LPS : Lipopolysaccharide

LXR : Liver X receptor

MAC : Membrane attack complex

MASPs : MBL-associated serine proteases

MB-AIM/ Hepa1.6 : Membrane bound-AIM/ Hepa1.6

MBL : Mannose binding lectin

MCP (CD46) : Membrane cofactor protein (Cluster of differentiation 46)

NAS : NAFLD activity score

NAFL : Non-alcoholic fatty liver

NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease

NASH : Non-alcoholic steatohepatitis

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

Pard3 : Par-3 family cell polarity regulator

PD-1 : Programmed cell death protein-1

PD-L1 : Programmed cell death protein-1 ligand-1

PRM : Pattern recognized molecule

RFA : Radiofrequency ablation

RCA : Regulators of complement activation

PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor

RAG1 : Recombinase activating gene 1

ROS : Reactive oxygen species

RXR : Retinoid X receptor

SOD1 : Superoxide dismutase 1

SOD2 : Superoxide dismutase 2

Spry2 : Sprouty homolog 2

SRCR : Scavenger receptor cysteine-rich

TAA : Tumor-associated antigen

TAM : Tumor associated macrophage

Tfam : Mitochondrial transcription factor A

TGF β 1 : Tumor growth factor beta 1

TIM-3 : T cell immunoglobulin and mucin domain protein-3

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

Treg : Regulatory T cell

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nich and labeling

VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor

WGA : Wheat germ agglutinin

8-OHdG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

【要旨】

慢性肝障害は、罹患率および致死率が高い疾患の一つであり、肝硬変や肝細胞がん（Hepatocellular Carcinoma: HCC）を発症することが知られている [1、2]。本研究では、これまで肥満を抑制することで知られてきた AIM（Apoptosis Inhibitor of Macrophage）が、肝細胞内に取り込まれることにより、脂肪肝を抑制することを明らかにした。さらに、AIM の新たな機能として、HCC 抑制作用を発見し、その作用機序として、がん細胞特異的なエンドサイトーシス不良に伴い、AIM が HCC 細胞表面上に集積することによって、補体系活性化を誘導することを解明した。

【序文】

非アルコール性脂肪性肝疾患（Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD）[図 1]

NAFLD は近年、メタボリックシンドロームのひとつとして、急速にクローズアップされてきた疾患であり、大別して二つのタイプへと病態が進行する。一つは、肥満に伴い脂肪肝を亢進していく単純性脂肪肝（Non-alcoholic fatty liver: NAFL）、もう一つは、アルコール常用性が無いにも関わらず、肝硬変や HCC を生じる非アルコール性脂肪性肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis: NASH）である [3-10]。

症状が深刻化する NASH の病態は、一般に、細胞内ストレスに起因することが知られている。NASH の病態に関与する細胞内ストレスとしては、酸化ストレスやミトコンドリアストレス、ER ストレスが挙げられる。細胞内ストレスの発生原因となるのは、活性酸素種（Reactive Oxygen Species: ROS）である。ROS は主にミトコンドリアにおいて、肝臓に蓄積した脂肪酸が、 β 酸化を受ける過程から産生される。NAFLD および NASH では、脂肪肝の亢進に伴い、肝臓内の脂質の蓄積が増加しているため、産生される ROS の量も増加する。ROS は、細胞内において、DNA や脂肪酸、タンパク質を酸化することが知られており、細胞の恒常性を保つ上で、非常に有毒な物質であるため、細胞内には ROS を分解する酵素が存在する。しかし、ROS 分解酵素の発現に関わる DNA や、タンパク質が酸化されることで、ROS 分解酵素の発現減少や機能不全が生じる。その結果、ROS の産生と分解のバランスが崩れ、ROS による障害を受けやすい環境が形成される。

さらに、細胞内ストレスの亢進によって、肝細胞は細胞死に陥る。その後、死細胞の残骸を除去するために、貪食細胞の活性化および遊走が起こる。これに加えて、マクロファージにおいて、遊離脂肪酸や炎症性サイトカイン、細胞内における

ROS によって、c-Jun N-terminal kinase (JNK) および NF- κ B の活性化が起こり、炎症性サイトカインやケモカインの更なる分泌が誘導される。このような機序によって炎症が亢進し、さらに繊維化が続き疾患を形成するとされているが [11-13]、肝硬変を伴わないにもかかわらず HCC を発生する症例も報告されており [14-20]、その病態メカニズムについては未だ明確ではない。

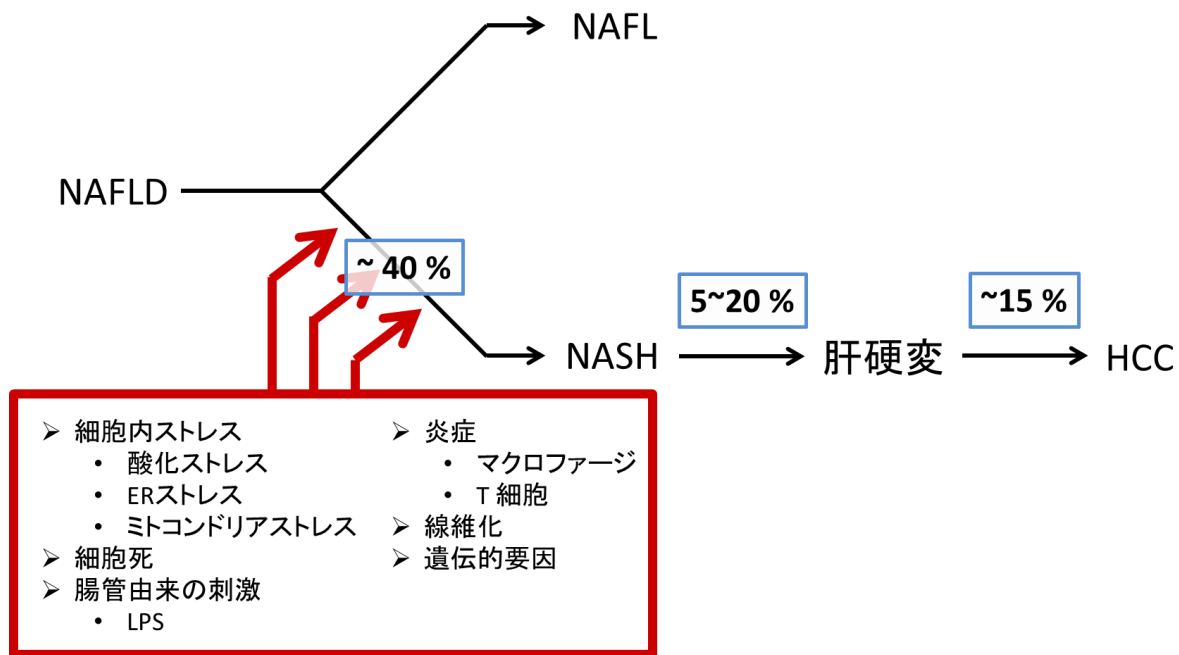


図 1. NAFLD の経過と NASH 進行の要因

NAFLD には脂肪肝のみを亢進する NAFL と脂肪肝の亢進によって炎症を生じ、肝硬変や HCC を発症する NASH が存在する。NASH 患者のうち 5-20% が肝硬変、さらに 15% が HCC を発症する。また、NASH は肝硬変、HCC を連続的に発症するとされてきたが、近年の報告によると、肝硬変を伴わない HCC も認められている。

HCC の原因と発生機序 [図 2]

HCC は、日本人の死因第 1 位である悪性腫瘍の内、部位別死因率が男性で 4 位、女性で 6 位と上位に入る疾患である [21]。その要因としては、HBV や HCV などの肝炎ウィルス、カビ毒の一種であるアフラトキシンなどの毒素、アルコール、そして、肥満に伴う脂肪肝などが挙げられる [22-24]。上記の様々な要因から生じる、肝臓における発がん過程は、酸化ストレスや炎症を基盤としている [25, 26]。酸化ストレスは各要因によってミトコンドリアでのカタラーゼや SOD、グルタチオンなどの抗酸化酵素の働きが阻害されることや、電子伝達系による代謝の亢進によって、肝細胞やクッパー細胞、好中球などから主な原因物質である ROS が産生されることによって生じる。通常は抗酸化酵素によって ROS の濃度は制御されるが、急性に過度の ROS 産生が生じた場合あるいは抗酸化酵素の阻害が生じた場合、細胞内では ROS によって 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) に代表されるように DNA の酸化を生じる。さらに、酸化された DNA の修復過程において変異を生じ、細胞のがん化を引き起こす。また、様々な要因によって引き起こされる炎症病態は、局在する免疫細胞（クッパー細胞、好中球など）による炎症性サイトカインやケモカイン（IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8 など）の産生と免疫細胞の浸潤によって形成される。浸潤してくる免疫細胞の一つであるマクロファージは腫瘍部位において Tumor associated macrophage (TAM) となることでがん細胞に増殖因子を供給し、がん細胞の増殖を促進させる [27]。さらに、肝細胞は細胞表面上に IL-6 や TNF α に対する受容体を有しているため、それらのサイトカインに応答し、炎症の惹起や細胞の生存、増殖を促進する他、DNA のメチル化を誘導することで肝細胞のがん化を促す [27, 28]。以上に述べたような酸化ストレスおよび炎症によって、がん遺伝子の活性化、がん抑制遺伝子の不活性化、そして発生したがん細胞の温床となる微小環境の構築により、HCC が形成される。

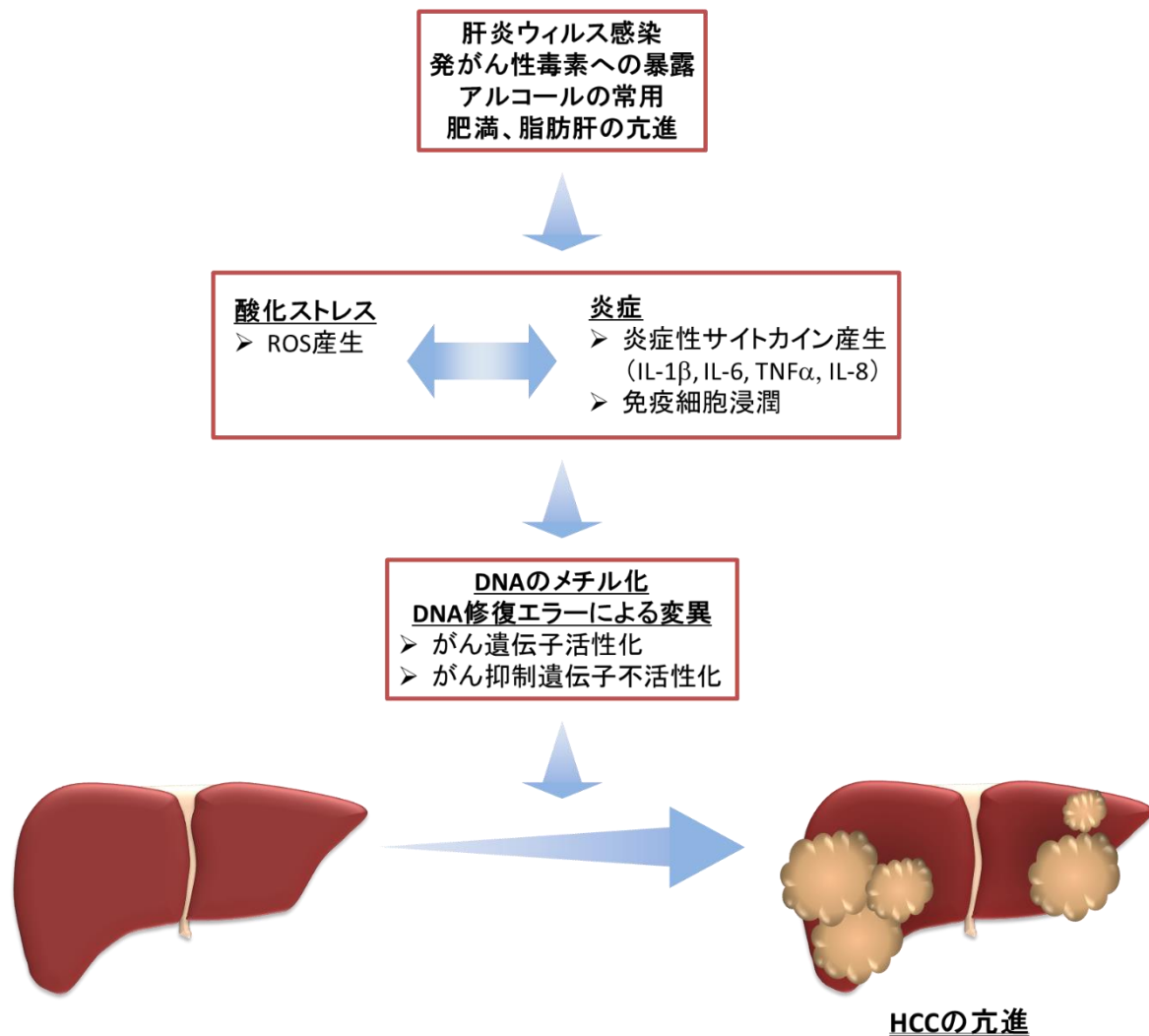


図 2. 肝臓における発がん背景

肝臓がんは HBV, HCV などの肝炎ウイルス感染やアフラトキシンなどの発がん性毒素への暴露、アルコールの常用や肥満、脂肪肝の亢進など様々な原因に起因する。これらの要因によって肝細胞内では酸化ストレスおよび炎症が惹起され、DNA の損傷が生じ、肝細胞のがん化を促進する。

メタボリックシンドローム病態における Apoptosis Inhibitor of Macrophage

(AIM) の役割 [図 3]

高度に発展した現代社会においては、便利で豊かな生活が培われている一方で、変容した生活習慣および長寿化に伴い、メタボリックシンドロームが社会問題として注目されてきた。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪が蓄積することで、高血圧、高血糖、脂質異常症の内、2 つ以上を合併し、心筋梗塞や脳梗塞といった動脈硬化性疾患や糖尿病、がんなど、様々な疾患に罹るリスクが高まった状態を指す。

これまでの研究から、AIM は、メタボリックシンドロームの病態基盤にある慢性炎症において、その病態を亢進させる作用を持つことが明らかになってきた。

AIM (別称: CD5L) は、マクロファージが特異的に産生する分泌型タンパク質であり、分子量は約 40 kDa である。AIM は Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) ドメイン 3 つから構成されており、SRCR スーパーファミリーに属している [29, 30]。AIM は、マクロファージや T 細胞において、CD95L/ Fas によるアポトーシス刺激に対する抑制能 [30-34] の他に、Tumor growth factor beta 1 (TGFβ1) による B 細胞増殖への抑制作用 [35]、グラム陰性菌およびグラム陽性菌の細胞壁構成成分である Lipoteichoic acid (LTA) や Lipopolysaccharide (LPS) を認識するパターン認識受容体としての機能 [36]、肺での炎症増悪化や肺胞上皮細胞における発がん誘導作用 [37, 38] など、多様な機能を有することが知られている。

AIM の産生は、核内受容体である Liver X receptor/ retinoid X receptor (LXR/ RXR) ヘテロダイマーによって制御されていることが明らかになっている [39, 40]。また、マクロファージによって産生・分泌された AIM は、血中で IgM 五量体と結合して安定化しており [41, 42]、マウスでは約 5 µg/ml、ヒトでは男性約 5 µg/ml、女性約 6 µg/ml と高濃度で存在している [43]。この血中濃度は、様々な疾

患（C型肝炎 [44]、肝硬変 [45]、HCC [43, 45]、アトピー性皮膚炎 [46]、川崎病 [47]、ターナー症候群 [48]）の罹患者において上昇することが報告されており、これらの疾患の診断におけるバイオマーカーとしての応用も期待できる。

これまでの研究成果から、AIMのマクロファージに対するアポトーシス抑制能とLXR/RXRによるAIM産生の制御に着目し、動脈硬化病巣におけるAIMの役割が解明された [49]。動脈硬化は、高血糖や高血圧によって、血管内皮細胞の恒常性が崩壊し、血中 Low-density lipoprotein (LDL) が血管内皮細胞のバリアーを通過することを発端として生じる [50]。内膜下に入り込んだ LDL は、酸化 LDL となり、酸化 LDL は内皮細胞に作用して、単球走化性タンパク質 1 (Monocyte chemotractive protein-1: MCP-1) などのケモカイン産生を誘導する。このケモカインによって遊走してきた単球は、マクロファージへと分化し、酸化 LDL を排除するために細胞内に取り込む。酸化 LDL を細胞内に取り込んだマクロファージは泡沫化マクロファージとなる。この泡沫化マクロファージや酸化 LDL、コレステロールなどから、粥腫が発生・発達することによって、血管内に瘤を作り、血流を留める。粥腫は酸化 LDL などの脂質を多く含んでおり、浸潤してきた免疫細胞や泡沫化マクロファージにとってはアポトーシスによる細胞死を生じやすい環境である。しかし泡沫化マクロファージは、酸化 LDL によって核内受容体である LXR/RXR が活性化されているため、AIM の発現が増強している。その影響によって、泡沫化マクロファージはアポトーシスを起こしにくく、動脈硬化巣の増悪化に寄与する。実際に、LDL receptor (LDLR) 欠損 (*LDLR*^{-/-}) マウスに対し、高コレステロール食を負荷する、動脈硬化モデルマウスを用いた実験において、高コレステロール食を負荷した野生型の *LDLR*^{-/-} マウスと比較して、AIM を欠損した *LDLR*^{-/-} マウスにおいて、動脈硬化病巣の進行が軽減されていたことから、AIM が動脈硬化病巣において、泡沫化マクロファージのアポトーシスを抑制し、病態の増悪化に寄与することが示された。

また、動脈硬化と同様に、マクロファージが病態形成において重要な役割をすることが明らかになってきたメタボリックシンドロームにおける病態基盤である、脂肪組織における慢性炎症と、それに伴うインスリン抵抗性についても、AIM が重要な役割を持つことが明らかになった [51]。メタボリックシンドロームの病態基盤には、脂肪組織における慢性炎症の存在が明らかになっている。脂肪組織はエネルギー蓄積以外にも内分泌器官としての機能を持っており、通常抗炎症性物質であるアディポネクチンを分泌している [52, 53]。肥満が進行すると、脂肪組織の肥大化・過形成に伴い、血中に放出される遊離脂肪酸が増加する。脂肪細胞の細胞表面上には Toll 様受容体 4 (Toll like receptor 4: TLR4) が発現しており、遊離脂肪酸の刺激によって脂肪細胞でも炎症性サイトカインやケモカインの分泌が誘導される。さらに、分泌されたケモカインによって、脂肪細胞へのマクロファージの浸潤が起こり、脂肪組織において慢性炎症が惹起される [54]。この脂肪組織における慢性炎症の惹起において、AIM はその増悪化に重大な役割を担っている。AIM はスカベンジャーレセプターである CD36 を介して脂肪細胞内に取り込まれる。また、AIM は脂肪細胞内で Fatty Acid Synthase (FASN) による脂肪酸合成の炭素鎖伸長に重要なドメインや合成した脂肪酸の放出に必要なドメイン、FASN のホモ二量体構造の安定化に関与しているドメインと直接結合することで FASN の機能を阻害する。その結果、FASN による脂質の合成・蓄積を阻害され、間接的に脂肪融解を誘導することが明らかになっている [55]。このように脂肪細胞内に取り込まれた AIM は FASN を阻害し、脂肪融解が誘導され、放出された遊離脂肪酸が作用して脂肪細胞からの炎症性サイトカイン、ケモカイン産生や炎症性細胞の浸潤を亢進し、慢性炎症を惹起する。肥満モデルとして高脂肪食を *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスに負荷したところ、肥満 *AIM*^{-/-} マウスは肥満 *AIM*^{+/+} マウスと比較して脂肪細胞における慢性炎症に関与する M1 マクロファージの浸潤が抑制されている他、肥満 *AIM*^{+/+} マウスでみられるような耐糖能異常や、や AKT や Glycogen synthase

kinase 3 beta (GSK3 β) などのインスリン受容体下流シグナルの異常が、*AIM*^{-/-} マウスにおいて認められなかった [51]。以上のことより、AIM はメタボリックシンドローム病態の基盤となる脂肪組織での慢性炎症、そしてそれに続くインスリン抵抗性の亢進に寄与することが示された。

以上に述べたように、AIM はメタボリックシンドローム病態において、中心的な役割を持つタンパク質である。本研究においては、メタボリックシンドロームの原因となる肥満と、肝臓への脂肪蓄積によって発症する疾患である NAFLD、およびその病態が進行した NASH に対する AIM の影響を解析することとした。

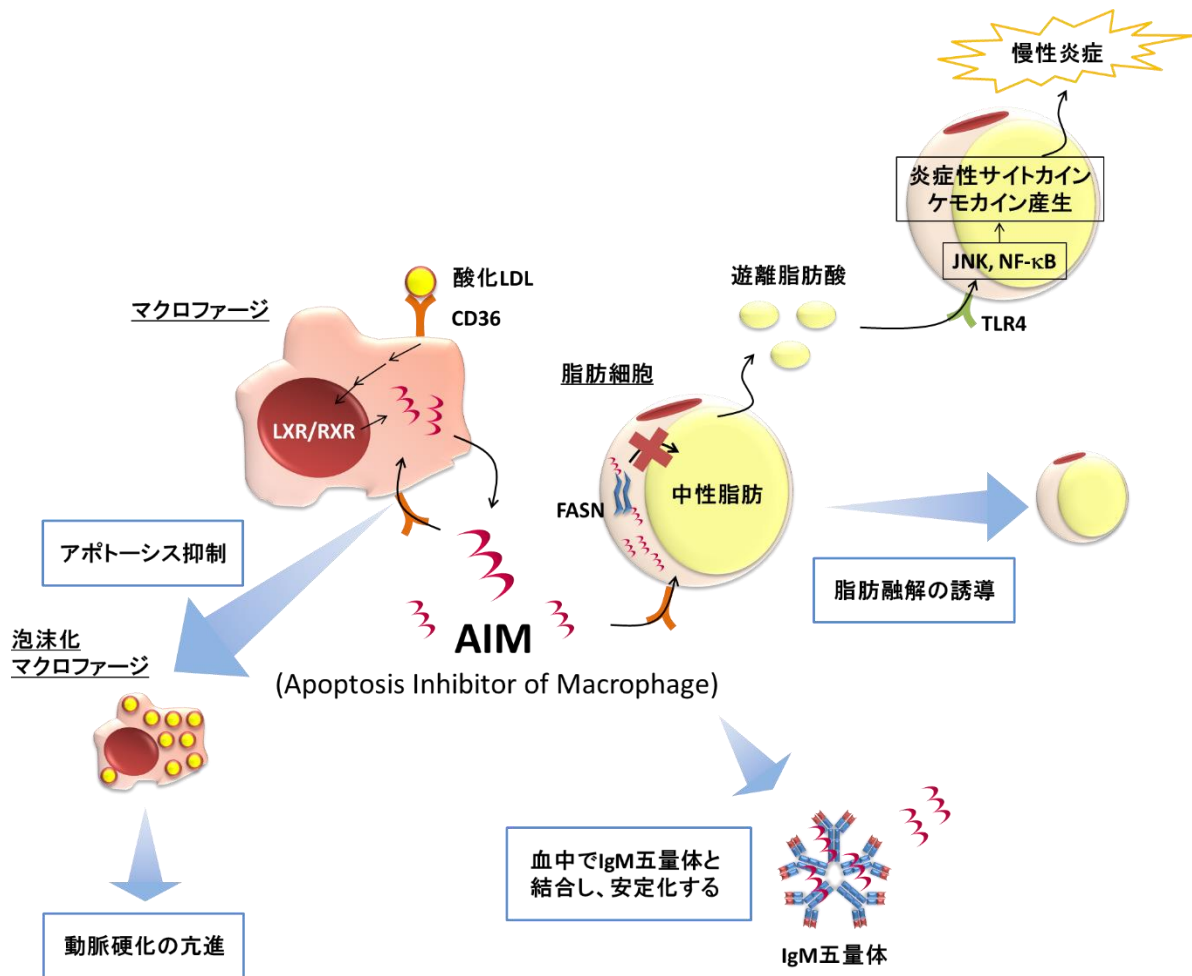


図 3. メタボリックシンドローム病態における AIM の機能

マクロファージから産生・分泌される AIM はメタボリックシンドローム病態の基盤となる慢性炎症において、マクロファージのアポトーシス抑制能や脂肪細胞での脂肪融解の促進によって、その病態の亢進に影響する。

HCC 治療における免疫システムの応用

HCC に対する治療法としては、HCC 部位の切除や、肝臓内の血管の走行に基づいた区域の切除などのように病変を切除する肝切除、高周波の電流を流し加熱することで、HCC 部位を壊死させる高周波アブレーション（Radiofrequency Ablation: RFA）などの外科的な手法や、肝動脈にカテーテルを挿入し、HCC 部位局所的に化学療法を行う肝動注化学療法など多様な治療法が存在している。しかし、HCC を有する肝臓は、肝障害の亢進を伴う場合が多いため、肝障害の度合いや HCC の数、大きさによって適応可能な治療法は異なる [56]。

近年、既存の治療法に加えて、分子標的薬を用いた治療法の開発が進められてきた。HCC の治療においては、主にキナーゼ阻害剤である Sorafenib が用いられている。Sorafenib は、血管新生を担う Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) や Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) といった、細胞の増殖や生存などに関与する Raf キナーゼを阻害するキナーゼ阻害薬であり、HCC 細胞の増殖や生存、血管新生などを抑制する。この他にも、Sunitinib や Brivanib、Linifanib といったキナーゼ阻害薬の開発が行われ、複数の分子標的薬を併用した HCC 治療法の構築が主流となっている [57, 58]。

また、HCC 細胞の生存・増殖および血管新生に重要なシグナル伝達の阻害を目的とした薬剤以外に、HCC に対し、生体内の免疫系による細胞障害を誘導する薬剤の開発が進められてきた。生体内において HCC は、免疫システムによる攻撃を避けて生存・増殖しており（免疫逃避）、免疫原性の低い細胞が優位に増殖している（免疫エディティング）。HCC の免疫逃避は、HCC 細胞自身や、腫瘍関連マクロファージ（Tumour-associated macrophage: TAM）、樹状細胞（Dendritic cell: DC）、制御性 T 細胞（Regulatory T cell: Treg）からの免疫抑制物質（IL-10, Indoleamine 2,3-dioxygenase: IDO, VEGF, Adenosine, tumor-associated antigen: TAA）の分泌、および HCC 細胞に対する免疫応答を抑制する細胞（TAM, Treg）の遊走によって形成

される [59]。

上述のように、通常は免疫逃避によって、免疫システムによる攻撃を受けにくい HCC 細胞に対し、免疫系によって細胞障害を誘導する医薬品である、抗 Cytotoxic T-lymphocyte protein-4 (CTLA-4) 抗体や抗 Programmed cell death protein 1

(PD-1) 抗体、抗 Programmed cell death protein-1 ligand-1 (PD-L1)、抗 T cell immunoglobulin and mucin domain protein-3 (TIM-3) 抗体などの開発が進められてきた [59-61]。これらの医薬品は、HCC 細胞に対して、抗体医薬品による中和作用、抗体依存性細胞障害 (Antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC)、補体依存性細胞障害 (Complement dependent cytotoxicity: CDC) を誘導する。

ADCC とは、HCC 細胞表面上の分子標的に対し、特異性を持つ抗体医薬品を投与することによって、免疫細胞の活性化を促し、細胞障害を誘導する細胞障害機構である。一方、CDC とは、自然免疫の一つである補体系の活性化経路 [図 4] の内、抗体依存性である古典経路が活性化することによって、特異的な細胞障害を誘導する機構である。補体系活性化には、古典経路の他に、病原体の細胞表面上の存在するマンノースを認識することで活性化するレクチン経路や、補体成分の一つである C3 が同じく補体成分である B 因子 (Complement factor B) によって加水分解されることを発端とし、直接的に C3 の活性化を誘導する第二経路が存在する。補体系の 3 つの活性化経路は、それぞれ活性化の発端は異なるものの、C3 の活性化を経て、標的細胞の細胞膜上に、膜侵襲複合体 (Membrane attack complex: MAC) を形成し、細胞膜に孔を形成し、細胞の壊死を誘導する点は共通している。

補体系は病原体のような非自己に対する防御機構であるが、自己細胞に影響が及ばないように補体制御因子 (Regulators of complement activation: RCA) によって制御されている。RCA は血中または自己細胞の細胞表面上に存在しており、自己細胞表面上での C3 の活性化や MAC の形成を阻害している。

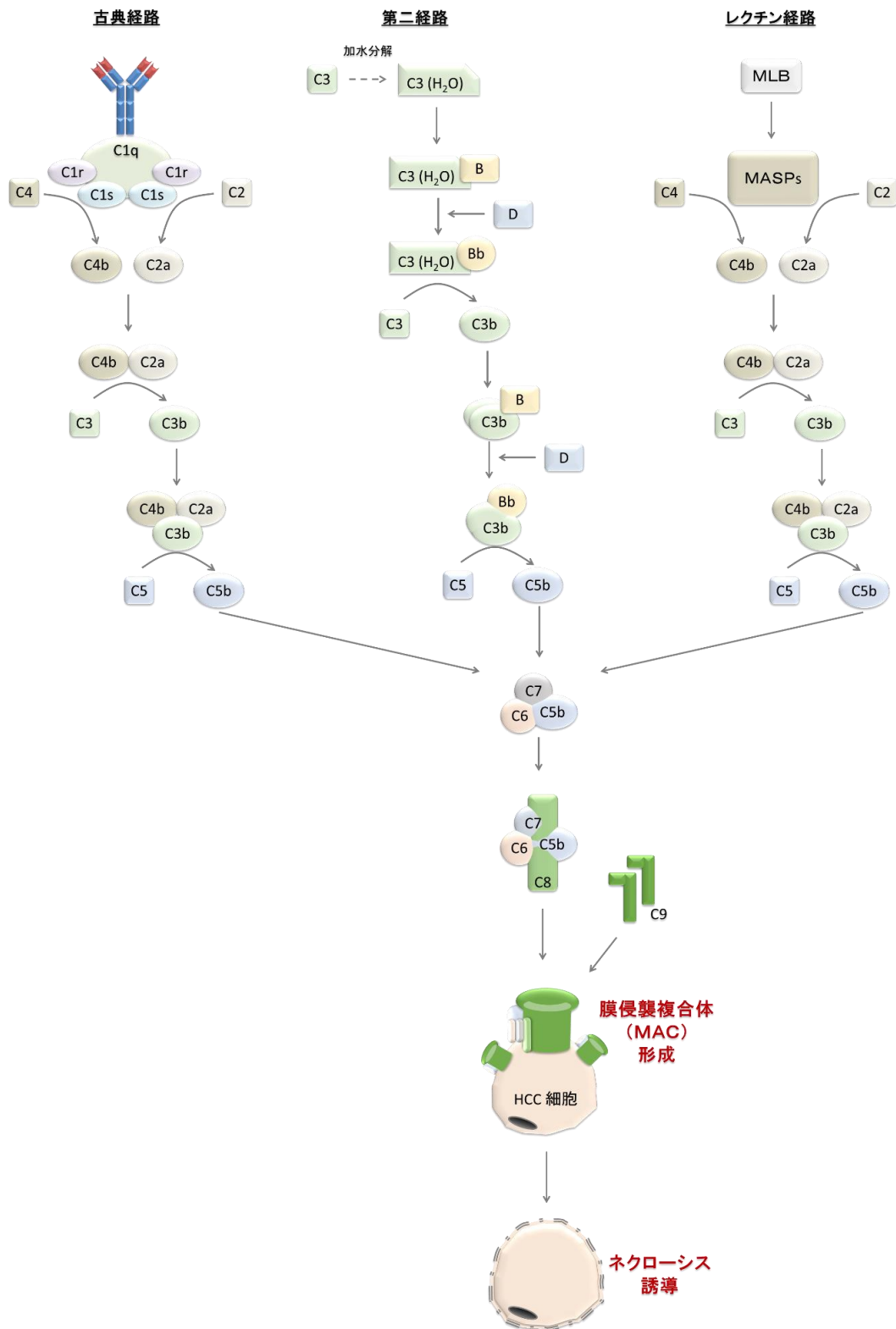


図 4. 補体活性化経路

補体系は病原体に対する防御を担う免疫システムの一つである。その活性化は、抗体依存的な古典経路、C3 の直接的な活性化に伴う第二経路、病原体の細胞表面に特異的に存在するマンノースを認識することで活性化するレクチン経路によって生じる。

【結果】

第1章 肝臓における AIM による抗がん作用の発見

AIM は、動脈硬化巣の増悪化や、脂肪組織における慢性炎症の惹起など、メタボリックシンドロームの病態基盤に、深く関与していることが明らかになっている。そこで本研究では、メタボリックシンドロームの肝疾患である NAFLD 病態に対する、AIM の影響を解析することにした。

1-1. 肥満 *AIM*^{-/-} マウス肝臓では HCC が発達する

NAFLD は、肥満に伴う脂肪肝に起因する疾患である。その内、脂肪肝の亢進のみを認めるものを NAFL、脂肪肝の亢進加えて、炎症が惹起され、肝硬変や HCC を生じるものを NASH と診断する。本研究では、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスに対して、肥満や脂肪肝を生じさせる高脂肪食を負荷し、NAFLD および、特に劇症型である NASH の病態に対する AIM の影響を解析することにした。NASH は一般に、細胞内ストレスやそれに続く炎症によって、肝硬変や HCC を生じるとされている。AIM は、これまでの研究から、高脂肪食の負荷によって、脂肪組織における炎症を惹起し、慢性炎症の亢進に寄与することが明らかになっている。よって、AIM を体内に持たない *AIM*^{-/-} マウスにおいては、炎症が生じにくく、NAFLD は NASH へと進行しにくく、NAFL に留まることが考えられた。一方、*AIM*^{+/+} マウスにおいては、NASH の病態が増悪化し、肝硬変や HCC が亢進すると考えられた。

しかし、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスに対し、高脂肪食を負荷したところ、驚いたことに *AIM*^{-/-} マウスの肝臓において、顕著な腫瘍の形成を確認した（図 5. A）。一方、*AIM*^{+/+} マウスにおいては、高脂肪食を 1 年以上負荷しても腫瘍の形成は認められず、脂肪肝の亢進のみを確認した。

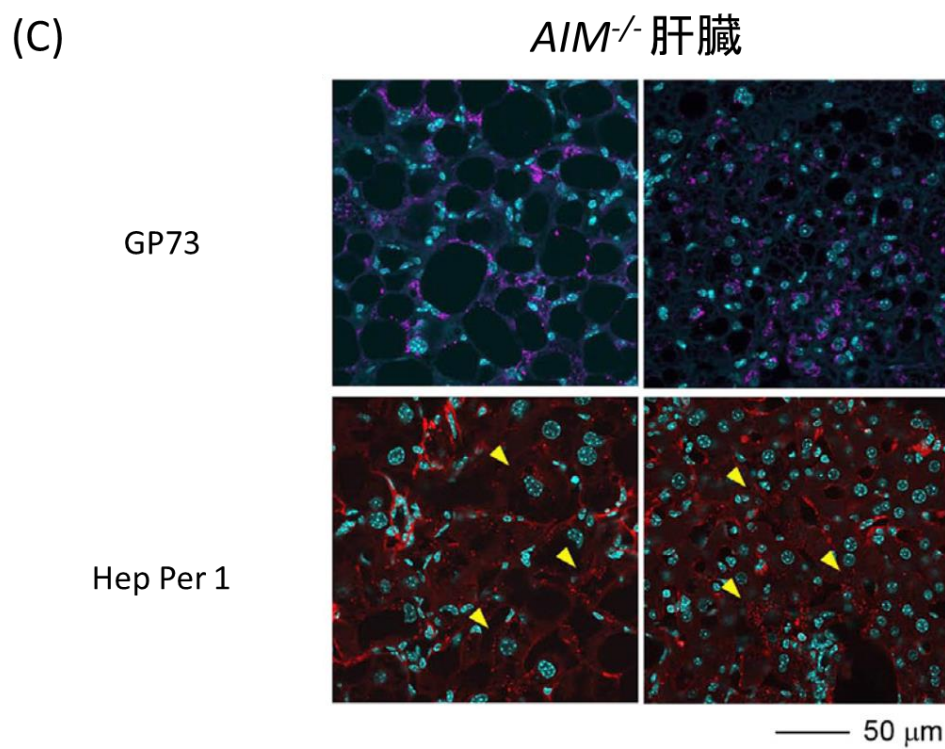
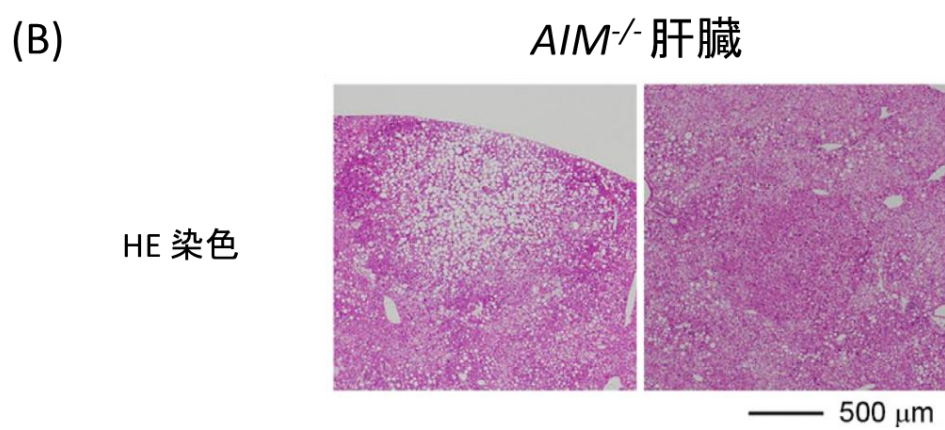
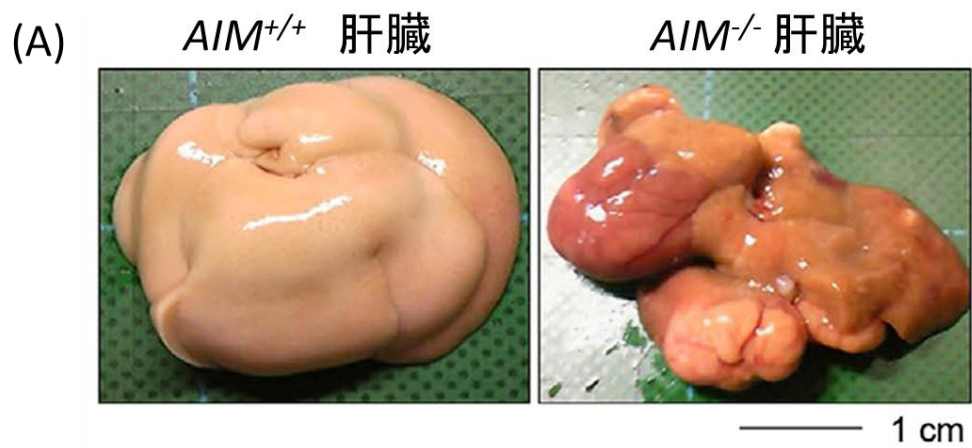


図 5. $AIM^{-/-}$ マウスに高脂肪食を負荷すると HCC が顕著に発達する

- (A) 高脂肪食負荷 1 年後の $AIM^{+/+}$ マウス、 $AIM^{-/-}$ マウス肝臓を撮影した。
 $AIM^{+/+}$ マウスと比較して $AIM^{-/-}$ マウスでは顕著な HCC の腫瘍形成を認めた。
- (B) 高脂肪食負荷 1 年後の $AIM^{-/-}$ マウス肝臓を HE 染色法によって解析した。その結果、HCC と思われる細胞群の発達を確認した。
- (C) 高脂肪食負荷 1 年後の $AIM^{-/-}$ マウス肝臓における HCC マーカー (gp73、Hep Per 1) の免疫組織化学法を用いて解析した。HCC マーカーで染色されたことから、高脂肪食負荷によって発生する腫瘍は HCC であることを確認した。(黄色矢印：)

また、*AIM*^{-/-} マウスの肝臓において観察された腫瘍の種類を同定するために、HE 染色および gp73 [62]、Hep Par 1 [63] といった HCC マーカーによる免疫染色を用いて、組織学的な解析を行った。その結果、*AIM*^{-/-} マウスにおける肝臓の腫瘍は、典型的な HCC であることが分かった (図 5. B, C)。また、一般に HCC マーカーとして知られている *AFP* (Alpha-fetoprotein) の遺伝子発現をリアルタイム PCR によって解析したところ、*AIM*^{-/-} マウスの HCC 部位においてのみ、発現が亢進していた (図 6)。

さらに、高脂肪食負荷期間による HCC の発生率を検証した。*AIM*^{-/-} マウスの肝臓において、高脂肪食負荷 12 週間後の HCC 発生率は 10% (21 匹中 2 匹) であり、その後高脂肪食負荷期間が長くなるにつれて HCC 発生率は急速に上昇することが分かった (図 7)。一方、*AIM*^{+/+} マウスにおいては、高脂肪食負荷期間に関わらず、HCC の形成は認められなかった (図 7)。この結果は、野生型マウスにおいて、高脂肪食負荷だけでは HCC がほとんど発生しないという、先行研究の結果と合致した [64, 65]。

以上より、*AIM* を欠損しているマウスにおいて、肥満および脂肪肝の亢進に伴い、顕著な HCC の腫瘍形成が認められることが明らかになった。

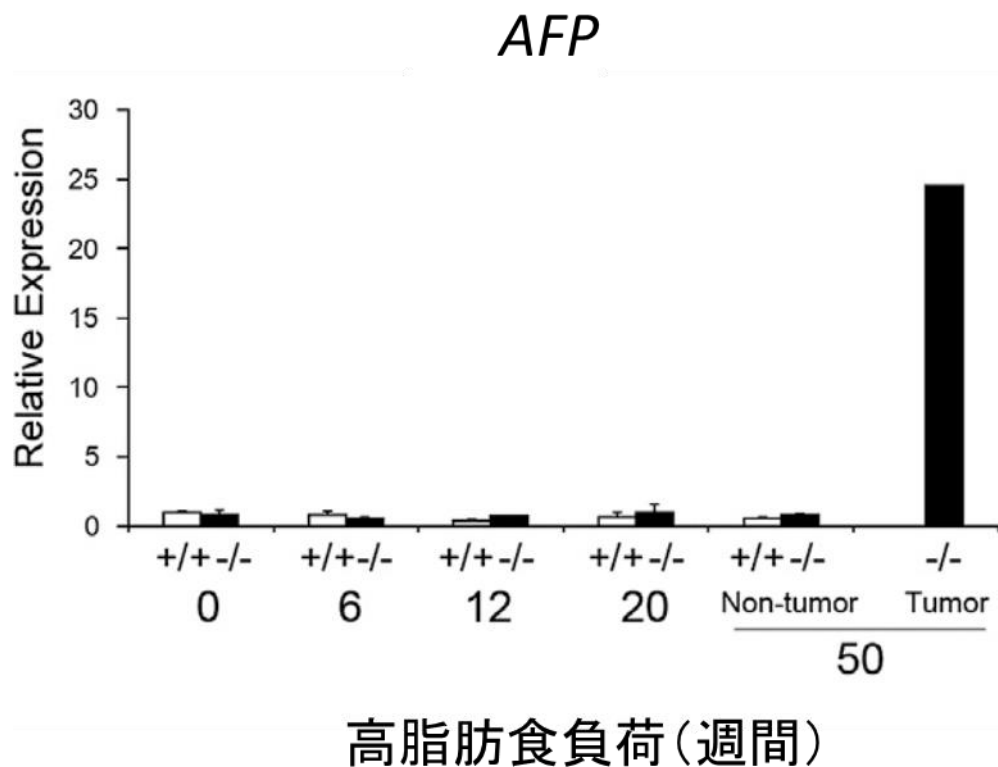


図 6. 高脂肪食負荷 *AIM*^{-/-} マウス肝臓のがん部位では AFP の発現が亢進している
リアルタイム PCR によって、高脂肪食を付加したマウスの肝臓における、*AFP* の遺伝子発現レベルを解析した（高脂肪食負荷 1 年後の肝臓は、非腫瘍部位（Non-tumor）と腫瘍部位（Tumor）を分離した）。その結果、高脂肪食負荷によって *AIM*^{-/-} マウスの肝臓で発生した HCC において、AFP の発現が亢進していることが明らかになった。

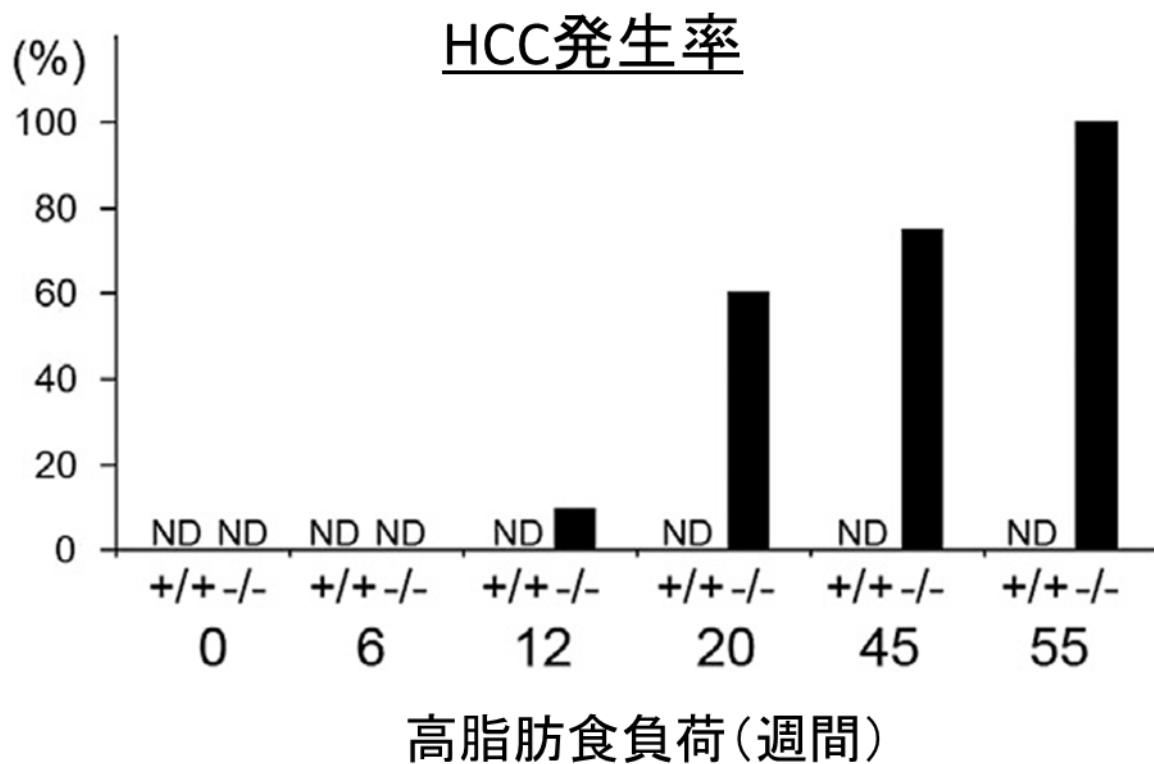


図 7. *AIM*^{-/-} マウスでは高脂肪食負荷期間に伴い、HCC 発生率が上昇する

AIM^{+/+} マウス (+/+) および *AIM*^{-/-} (-/-) マウスに対し、各週齢で 10 匹以上の肝臓を解析した。その結果、*AIM*^{+/+} マウスにおいては、高脂肪食を 1 年間負荷しても HCC の腫瘍形成は確認しなかった。一方、*AIM*^{-/-} マウスにおいては、高脂肪食負荷期間に伴う HCC 発生率の上昇を認めた。

1-2. *AIM*^{-/-} マウスに AIM を継続的に補填すると HCC 発達を抑制する

これまでの結果から、*AIM*^{-/-} マウスにおいて、高脂肪食の負荷によって誘導される肥満および脂肪肝に伴い、顕著な HCC の腫瘍形成を確認した。一方、*AIM*^{+/+} マウスにおいては、HCC の腫瘍形成は認められなかった。そこで、*AIM*^{-/-} マウスに対し、長期的に AIM を補填することで、HCC の腫瘍形成が抑制されるかを検証した。

AIM^{-/-} マウスに対し、高脂肪食負荷 12 週間後から、リコンビナント AIM (rAIM) または PBS (各 5 匹ずつ) を週に 2 回、1 回 100 μ g ずつ、腹腔内に投与した。高脂肪食負荷 45 週間後において、各マウスから肝臓を採取した (図 8. A)。各群の肝臓を巨視的に観察したところ、PBS 投与群における巨視的な HCC の発生率は 80%であったのに対し、rAIM 投与群では HCC の発生が認められなかった (図 8. B)。

また、HCC の腫瘍形成について詳細に検討するために、PBS 投与群および rAIM 投与群の肝臓について、HCC マーカーの一つである gp73 を用い、免疫組織化学法による解析を行った。共焦点顕微鏡を用いた観察の結果、rAIM 投与群においても gp73 陽性細胞を認めたが、PBS 投与群と比較して、数が少なく、分散していることを確認した。また、血中 AIM 値の高い個体 (#2, #5) と比較して、血中 AIM 値の低い個体 (#4) ほど、より多くの gp73 陽性細胞の存在が認められた (図 8.C, D)。

以上をまとめると、高脂肪食を負荷した *AIM*^{-/-} マウスに対し、AIM を補填したところ、HCC の形成は抑制された。また、血中に AIM を持つ個体においても、血中 AIM 濃度が十分でない場合は、gp73 陽性細胞の存在を確認したが、血中に AIM を持たない個体と比較して少数であり、分散した状態であった。

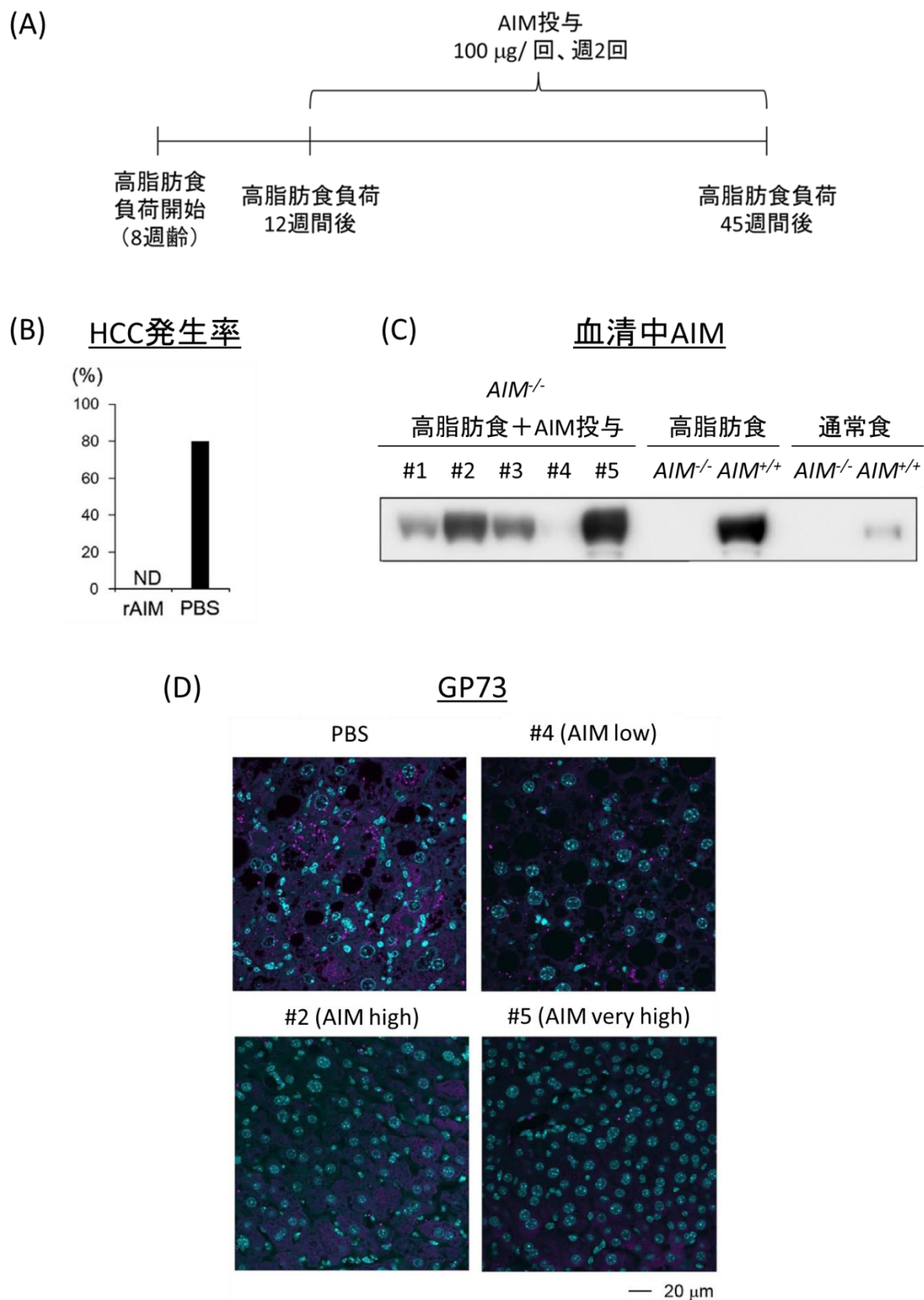


図 8. AIM 投与によって高脂肪食負荷に起因する HCC 発達が抑制される

高脂肪食負荷 12 週間後の *AIM*^{-/-} マウスに、rAIM を週 2 回、一回 100 μg の条件で、継続的に腹腔内投与した。コントロール群として、rAIM の代わりに等量の

PBS を投与した。各群のマウスは 5 個体ずつとし、高脂肪食負荷 45 週間後に血清および肝臓を採取した。

(A) rAIM 投与スケジュール

(B) rAIM 投与群および PBS 投与群における HCC の腫瘍形成を解析した。その結果、rAIM 投与群において、HCC の腫瘍形成が抑制された。

(C) rAIM 投与群における血中 AIM 値をイムノブロット法によって解析した。その結果、個体間において、血中に保持する AIM の量にばらつきがあることが分かった。

(D) rAIM 投与群および PBS 投与群の肝臓を、HCC マーカーである gp73 に対する抗体を用いた免疫組織化学法によって解析した。その結果、rAIM 投与群においても、gp73 陽性細胞を確認したが、血中 AIM 濃度の高さに伴ってその数は減少しており、PBS 投与群と比較すると非常に少数であった。

第2章 AIMによるHCC抑制メカニズムの解明

2-1. 高脂肪食負荷 $AIM^{-/-}$ マウスでは $AIM^{+/+}$ マウスと比較して脂肪肝が亢進するが、細胞内ストレス、炎症、線維化については同等である

$AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスへの高脂肪食負荷実験から、 $AIM^{-/-}$ マウスにおいて、高脂肪食の負荷による顕著なHCCの腫瘍形成を確認した。その一方で、 $AIM^{+/+}$ マウスでは、HCCの腫瘍形成を認めなかった。また、高脂肪食を負荷した $AIM^{-/-}$ マウスに対する、AIMの持続的な投与によって、HCCの腫瘍形成は抑制されることが明らかになった。AIMによるHCCの腫瘍形成を抑制するメカニズムとして、AIMがNASHにおけるHCC細胞の発生過程に作用するという仮説と、AIMがHCC細胞の排除に作用するという仮説を立て、検証を行った。

まず、AIMがNASHにおけるHCC細胞の発生過程に作用するという仮説について、検証を行った。一般に、NASHの病態背景として知られている脂肪肝、細胞内ストレス、炎症、線維化について、高脂肪食を負荷した肥満 $AIM^{+/+}$ マウスと肥満 $AIM^{-/-}$ マウスを比較し、検討した。

まず、脂肪肝について、 $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓を用い、解析を行った。 $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓においては、より脂肪蓄積が亢進していることが認められた。一方、 $AIM^{+/+}$ マウスの肝臓においては、高脂肪食6週間後から、肝細胞内に脂肪沈着が確認できるものの、 $AIM^{-/-}$ マウスと比較して、脂肪沈着の程度が低かった。さらに、高脂肪食12週間後においては、 $AIM^{-/-}$ マウスにおける高脂肪食6週間後と同程度の、肝細胞内への脂肪蓄積を確認した。以上の結果から、高脂肪食を負荷した $AIM^{+/+}$ マウスと $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓において、脂肪肝の程度を組織学的に比較すると、 $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓において、脂肪肝が進行していることを確認した（図9.A, B）。また、高脂肪食を負荷した $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓を用い、肝重量とトリグリセリド（Triglyceride: TG）含有量を測定した結果からも、 $AIM^{+/+}$ マウスと比較して、 $AIM^{-/-}$ マウスにおいて脂肪肝が進行しているこ

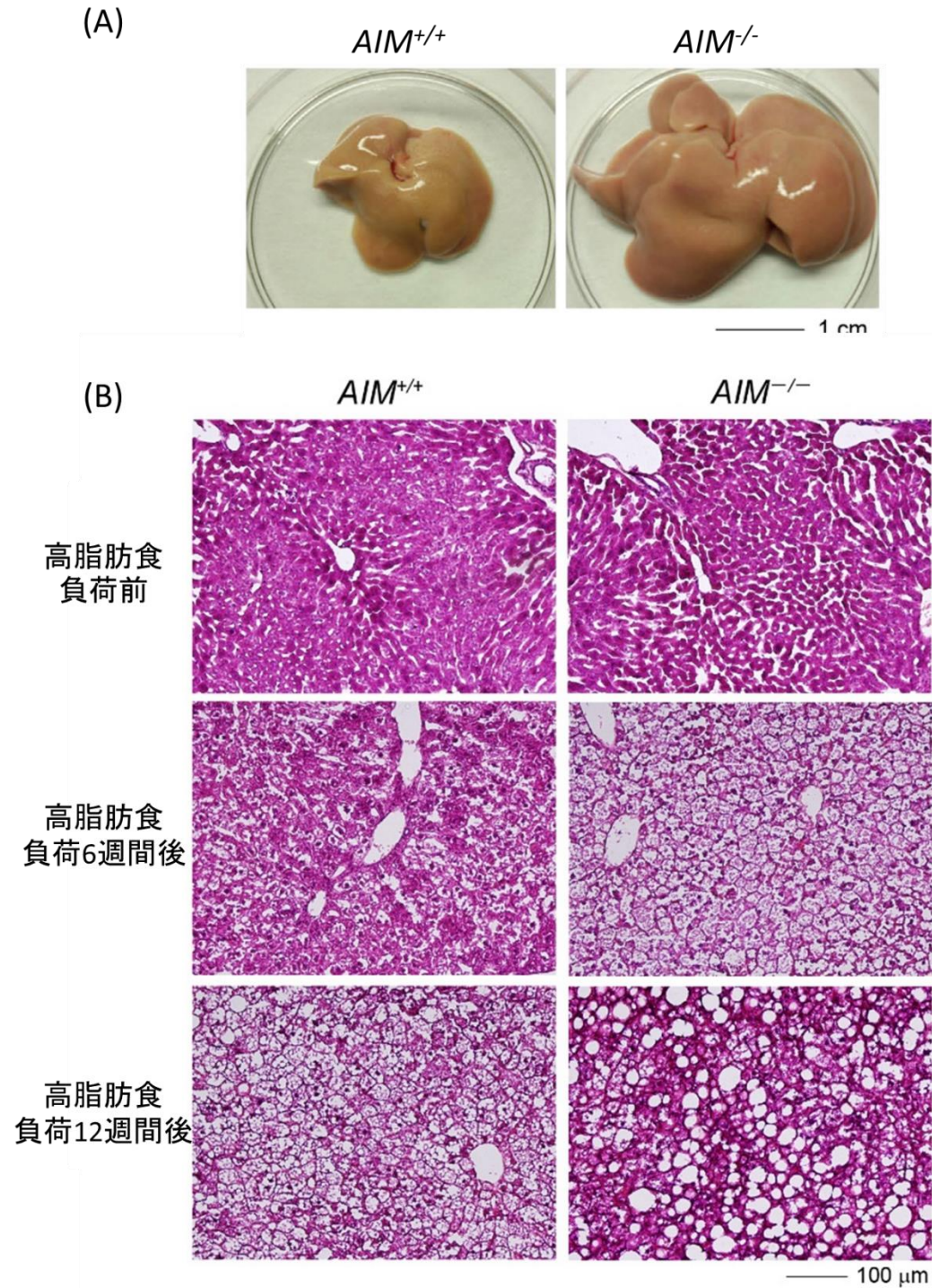


図 9. 高脂肪食負荷 *AIM*^{-/-} マウスは *AIM*^{+/+} マウスと比較して脂肪肝が亢進する

(A) 高脂肪食負荷 *AIM*^{+/+} マウス、*AIM*^{-/-} マウスの肝臓を撮影した。*AIM*^{-/-} マウスにおいて肝臓の肥大化が認められた。

(B) 高脂肪食負荷 *AIM*^{+/+} マウス、*AIM*^{-/-} マウスの肝臓を HE 染色法によって解析した。*AIM*^{-/-} マウスの肝臓において肝細胞内の脂肪蓄積が増加する傾向を認めた。

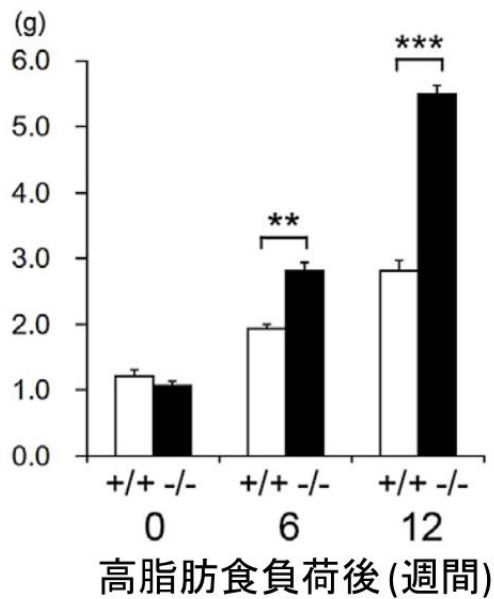
とを確認した (図 9. C, D)。

次に、*AIM*^{+/+} マウスと比較し、*AIM*^{-/-} マウスにおいて脂肪肝が進行するメカニズムを検討した。これまでの研究から、脂肪組織において、AIM は脂肪細胞内に取り込まれ、細胞内で FASN に直接結合し、脂肪酸合成を阻害することが明らかになっている。脂肪酸合成が阻害されると、トリグリセリド (TG) 合成も阻害されるため、結果的に脂肪融解が促進された状態になる [55]。肝臓においても、肝細胞内で AIM が FASN に作用し、脂肪融解が促進されることによって、*AIM*^{+/+} マウスは *AIM*^{-/-} マウスと比較して脂肪肝が軽減されるのではないかと考えた。この仮説を検証するためにまず、AIM が肝細胞内に取り込まれることを確認する必要がある。そこで、*AIM*^{-/-} マウスの肝臓から単離した肝細胞 (初代培養肝細胞) に rAIM を 25 µg/ml の濃度で添加し、抗 AIM 抗体を用いて細胞内染色を行い、蛍光顕微鏡で観察することで、肝細胞への AIM の取り込みを検証した。その結果、AIM は肝臓においても、脂肪組織と同様に細胞内に取り込まれることを確認した (図 10. A)。

さらに、AIM は肝細胞内においても、脂肪細胞内と同様に FASN に直接結合し、その機能を阻害するかを検証した。まず、*AIM*^{+/+} マウス肝臓から単離した初代培養肝細胞に、rAIM を 25 µg/ml の濃度で添加し、培養した。培養 5 時間後、細胞を回収後、破碎し、ライセートを回収した。さらに、抗 AIM 抗体によって共免疫沈降を行い、抗 FASN 抗体を用いてイムノブロット法で AIM と FASN の結合を検討した。その結果、FASN が検出されたため、取り込まれた AIM は肝細胞内で FASN と結合することが明らかになった (図 10. B)。

また、脂肪細胞と同様に、AIM によって、FASN の活性が阻害されるかを検討した。*AIM*^{-/-} マウスの肝臓から単離した初代培養肝細胞に、中性脂肪を蓄積させ、脂肪滴を形成させるために、オレイン酸 (800 µM) を添加し、24 時間培養した。さらに、rAIM (25 µg/ml) を添加して、24 時間培養した後、細胞を回収し、FASN の活性と、FASN の活性に伴い遺伝子発現が制御され、脂肪滴の形成に関わるタン

(C) 肝重量



(D) 中性脂肪含有量

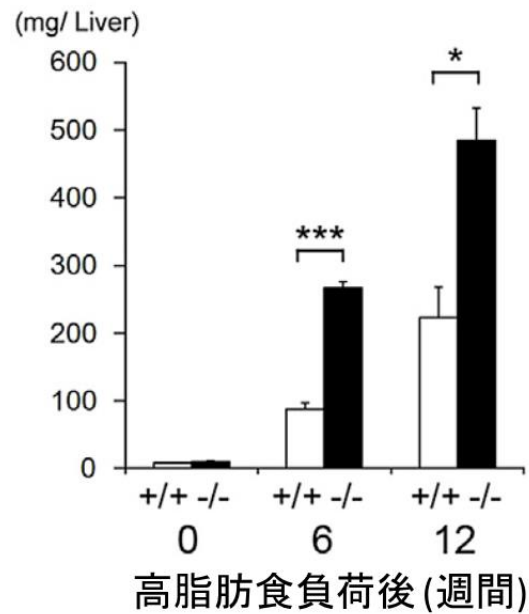


図 9. 高脂肪食負荷 $AIM^{-/-}$ マウスは $AIM^{+/+}$ マウスと比較して脂肪肝が亢進する

(C) 高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ マウス (+/+), $AIM^{-/-}$ (-/-) マウスの肝重量を測定した。 $AIM^{-/-}$ マウスにおいて肝重量が優位に重いことを確認した。

(D) 高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ (+/+) マウス、 $AIM^{-/-}$ (-/-) マウスの肝臓を用いて TG 含有量を測定した。 $AIM^{-/-}$ マウスにおいて TG 含有量が優位に高いことを確認した。

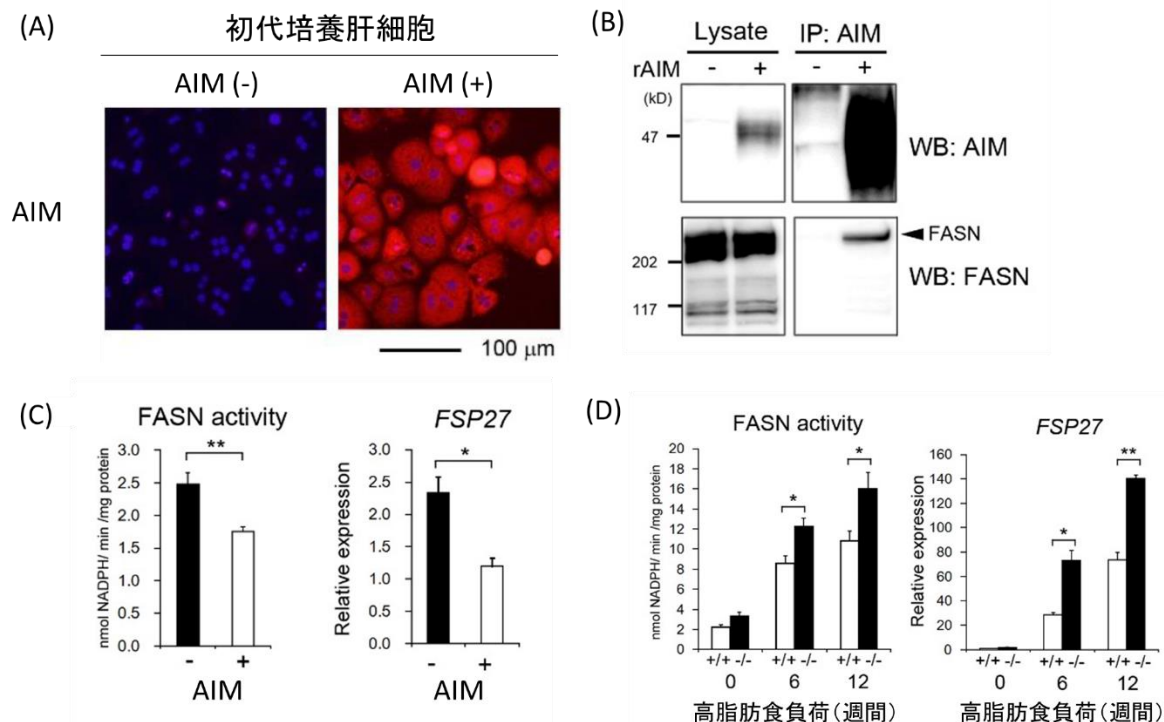


図 10. 肝細胞において AIM は脂肪細胞と同様に細胞内に取り込まれ、FASN に結合して FASN 活性を阻害し、脂肪融解を促進する

(A) $AIM^{-/-}$ マウスより肝細胞を単離し、rAIM を加えて培養した後、DAPI と AIM で染色した。その結果、肝細胞内への AIM の取り込みを確認した。

(B) 初代培養肝細胞に rAIM を添加して培養した後、細胞を破碎し、回収したライセートに対し、抗 AIM 抗体を用いて免疫沈降を行った。回収したライセートおよび免疫沈降後のサンプルをイムノブロット法によって解析した。その結果、AIM と FASN の結合を確認した。

(C) 初代培養肝細胞にオレイン酸 800 mM、さらに rAIM 無添加、添加の条件で培養し、FASN の活性と *FSP27* の遺伝子発現を測定した。その結果、AIM の添加によって FASN の活性や *FSP27* の遺伝子発現が低下していたことから、AIM によって肝細胞の脂質蓄積が低下することが明らかになった。

(D) 高脂肪食を負荷した $AIM^{+/+}$ マウス、 $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓における FASN 活性と *FSP27* の遺伝子発現をそれぞれ解析した。その結果、 $AIM^{-/-}$ マウスにおいて脂質蓄積が亢進している、つまり脂肪肝が亢進していることを確認した。

パク質である *FSP27* の遺伝子発現を解析した。その結果、*AIM* の添加によって、*FASN* の活性が低下することを確認した。また、*FSP27* の発現量も低下しており、*AIM* の添加によって、肝細胞においても *FASN* による脂肪酸合成が抑制されることを確認した (図 10. C)。

最後に、マウスの肝臓内において、実際に、*AIM* が *FASN* の機能を阻害していることを確認した。高脂肪食を負荷した *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの肝臓を用い、*FASN* の活性および *FSP27* の遺伝子発現を測定した。その結果、*AIM*^{-/-} マウスと比較して、*AIM*^{+/+} マウスにおいては、*FASN* の活性および *FSP27* の遺伝子発現が共に低下していることを確認した (図 10. D)。

以上のことから、脂肪細胞と同様に、肝細胞においても、*AIM* は細胞内に取り込まれ、細胞内で *FASN* に直接結合し、その機能を阻害することが明らかになった。*AIM* による *FASN* の機能阻害によって、脂肪融解が促進されるため、*AIM* は脂肪肝を抑制する作用を持つことが示された。

次に、高脂肪食を負荷した *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの肝臓において、*NASH* の病態背景として知られている細胞内ストレスを比較し、*AIM* による細胞内ストレスへの影響を解析した。脂肪肝において、肝細胞への過剰な脂肪蓄積によって、酸化ストレスなどの細胞内ストレスが起こることが知られている [13, 66]。さらに、その酸化ストレスが *HCC* 発生の原因となることが報告されている [25, 26]。そこで、高脂肪食を負荷した *AIM*^{+/+} マウスと *AIM*^{-/-} マウスの肝臓において、小胞体 (Endoplasmic reticulum: ER) ストレスマーカーとして知られる *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein* (*CHOP*)、*Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34* (*GADD34*)、*Glucose-regulated protein 78* (*GRP78*) (図 11)、ミトコンドリアストレスマーカーとして知られる *Superoxide dismutase 2* (*SOD2*)、*Mitochondrial transcription factor A* (*Tfam*) (図 12)、酸化ストレスマーカーとして知られる *Superoxide dismutase1* (*SOD1*)、

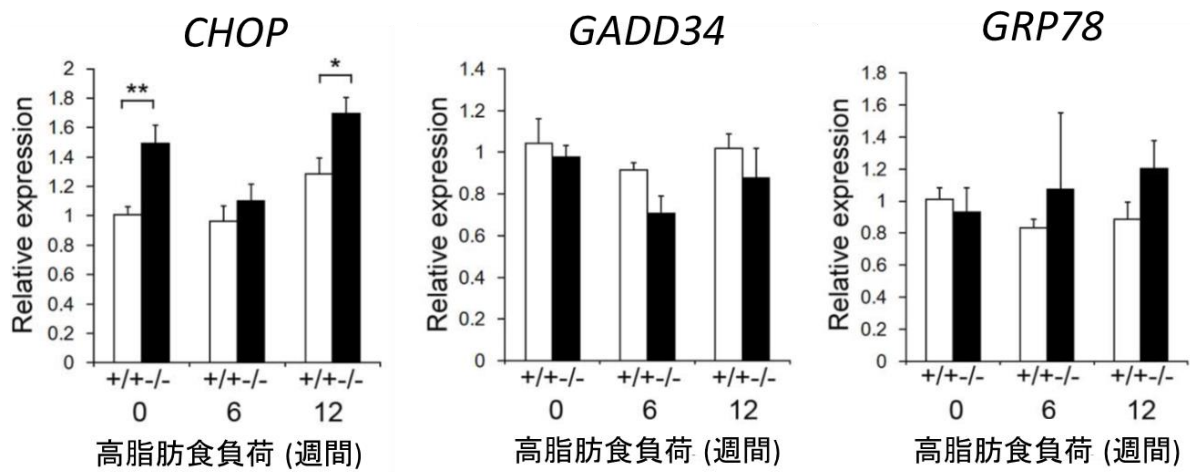


図 11. 高脂肪食負荷後の $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓において、ER ストレスは同程度である

高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ マウス ($+/+$)、 $AIM^{-/-}$ マウス ($-/-$) の肝臓において ER ストレスマーカーの遺伝子発現をリアルタイム PCR によって解析した。各サンプルは 5-6 個体ずつ用いた。その結果、 $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの間で HCC の腫瘍形成に影響すると考えられるほどの顕著な差異を認めなかった。

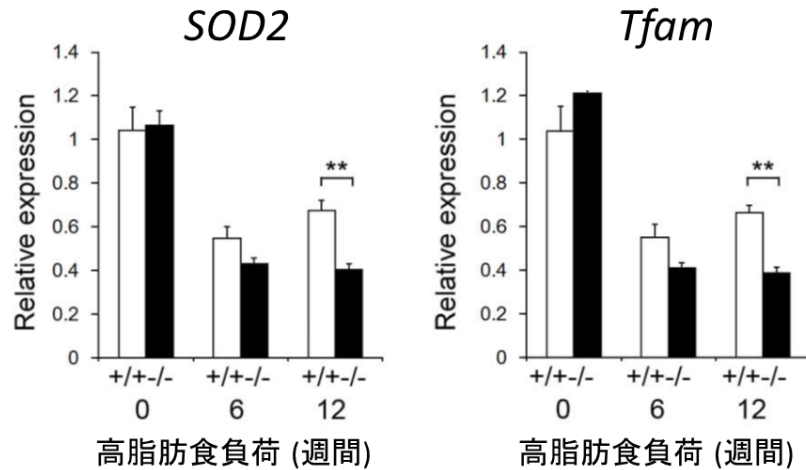


図 12. 高脂肪食を負荷した $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓において、ミトコンドリアストレスはやや亢進する傾向にある

高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ マウス ($+/+$) および $AIM^{-/-}$ マウス ($-/-$) の肝臓においてミトコンドリアストレスマーカーの遺伝子発現をリアルタイム PCR によって解析した。各サンプルは 5-6 個体ずつ用いた。その結果、高脂肪食を負荷した $AIM^{-/-}$ マウスにおいて、ミトコンドリアストレスは亢進する傾向にあるものの、高脂肪食を負荷した $AIM^{-/-}$ マウスにおける、顕著な HCC の腫瘍形成に影響するほどの顕著な差異を認めなかった。

Glutathione peroxidase 1 (GPX1)、*Catalase* (図 13) の遺伝子発現を、リアルタイム PCR を用いて解析した。また、酸化ストレスについては、最も酸化されやすいデオキシグアノシン (deoxyguanosine: dG) が、活性酸素種によって酸化されて生成される 8-OHdG や、スーパーオキシドによって生成され、脂質の酸化を担うヒドロキシラジカルを生成する、過酸化水素の計測も行った。その結果、*AIM*^{+/+} マウスにおいて、脂肪肝の亢進に伴い、細胞内ストレスも亢進することがしめされた (図 11-13)。

さらに、高脂肪食を負荷した *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの肝臓において、炎症状態の比較を行った。まず、肝臓全体における炎症状態を比較するために、肝臓片を用い、リアルタイム PCR によって、*IL-1β*、*IL-6*、*TNFα* の遺伝子発現を解析した。その結果、*AIM*^{+/+} マウスにおいて、炎症が亢進している傾向にあった (図 14)。しかし、*AIM*^{+/+} マウスにおいては、HCC の腫瘍形成を確認していないことから、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスにおける炎症の差異は、がん化に影響するほどの差異ではなかったと考えられた。また、高脂肪食を負荷した *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの肝臓から、クッパー細胞を単離し、炎症状態の比較を行った。その結果、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの間に差異は認められなかった (図 15)。*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの炎症状態について、さらに検討するために、高脂肪食を負荷した *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの肝臓を用い、メタボロミクス解析を行った。その結果、高脂肪食を負荷した *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの肝臓において、脂質プロファイルに差異は認められず、炎症性の脂質代謝産物の増加も確認されなかったことから、AIM の有無は、脂肪肝における炎症状態に影響を与えないことが示された (図 16)。

さらに、高脂肪食を負荷した *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの肝臓における、線維化の状態について検討した。まず、シリウスレッド染色によってコラーゲン線維の染色を行い、染色エリアを測定した (図 17. A, B)。その結果、高脂肪食の

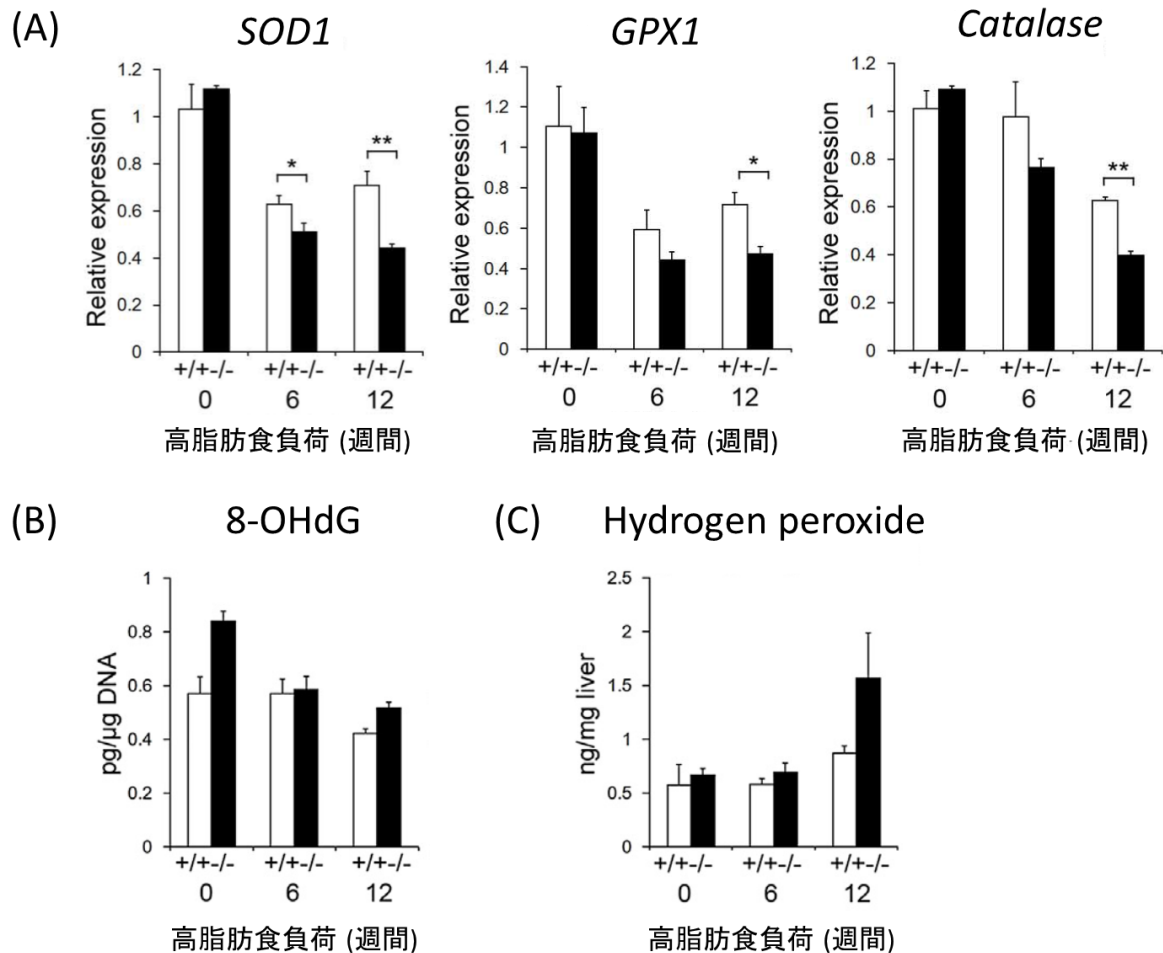


図 13. *AIM*^{-/-} マウスの肝臓において、酸化ストレスが亢進する傾向にある

(A) *AIM*^{+/+} マウス (+/+) および *AIM*^{-/-} (-/-) マウスの肝臓を用い、酸化ストレスマーカーの遺伝子発現をリアルタイム PCR によって解析した。各群 5-6 個体を用いて解析を行った。その結果、*AIM*^{-/-} (-/-) マウスの肝臓において、酸化ストレスがやや亢進する傾向にあることを認めた。

(B) 8-OHdG check ELISA (Wako) を用いた 8-OHdG の計測を行った。サンプルは各 5-6 個体で解析した。その結果、*AIM*^{+/+} マウス (+/+) および *AIM*^{-/-} マウス (-/-) の肝臓において差異を認めなかった。

(C) Hydrogen peroxide colorimetric assay kit (BioVision Technologies) を用い、過酸化水素の計測を行った。*AIM*^{+/+} マウス (+/+) および *AIM*^{-/-} マウス (-/-) の肝臓において優位な差を認めなかった。

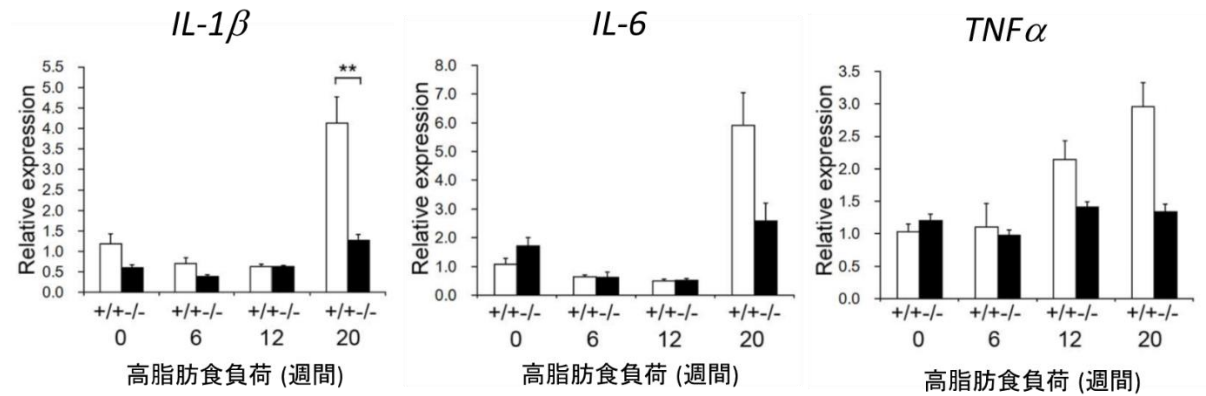


図 14. $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓においては同程度の炎症を呈する
 高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ マウス (+/+) および $AIM^{-/-}$ マウス (-/-) の肝臓組織を用い、炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR によって解析した。各群 5-6 個体から肝臓を採取し、解析に用いた。その結果、 $AIM^{+/+}$ マウスにおいて炎症が亢進している傾向にあったが、その多くで有意差を認めなかったことから、炎症についても $AIM^{+/+}$ マウスと $AIM^{-/-}$ マウスにおいて、細胞のがん化に影響する程の遺伝子発現の変化がないと考えた。

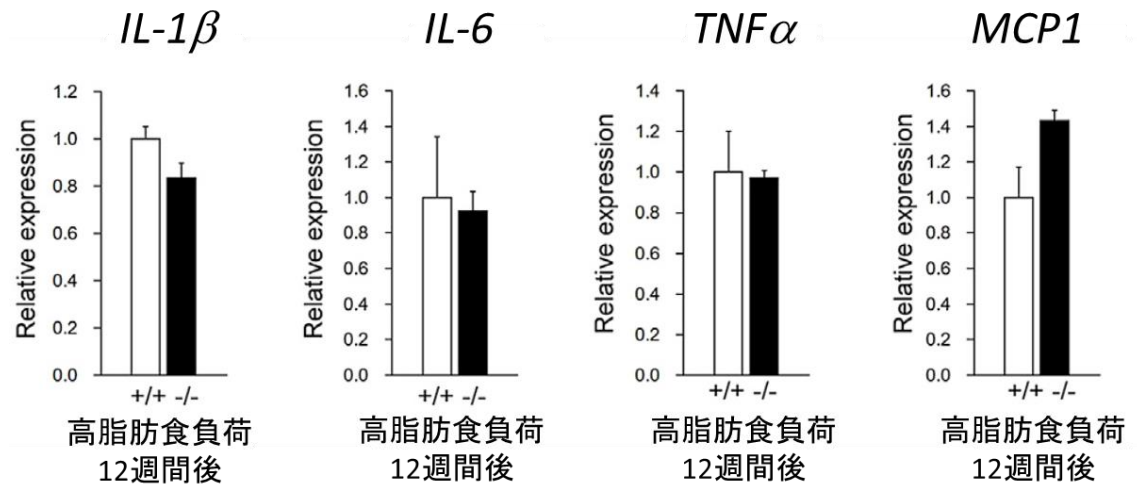


図 15. *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスのクッパー細胞において炎症性サイトカインの遺伝子発現に差異はない

高脂肪食負荷 12 週間後の *AIM*^{+/+} マウス (+/+) および *AIM*^{-/-} マウス (-/-) の肝臓からクッパー細胞を単離し、リアルタイム PCR を用いて炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析した。各群 5-6 個体ずつ用いて解析を行った。その結果、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスにおいて、差異は認められなかった。

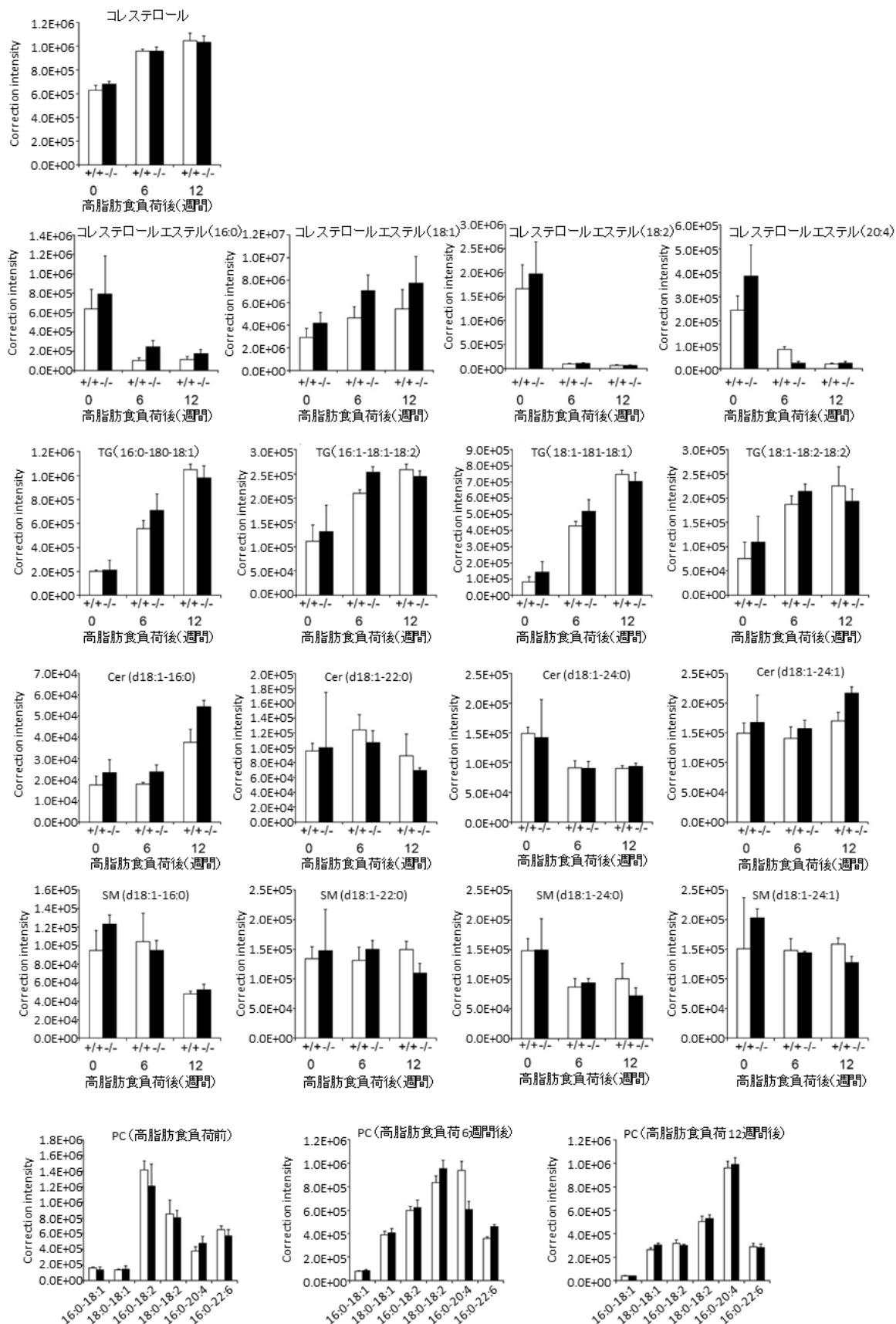
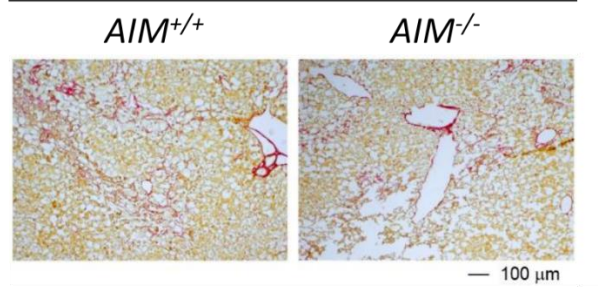


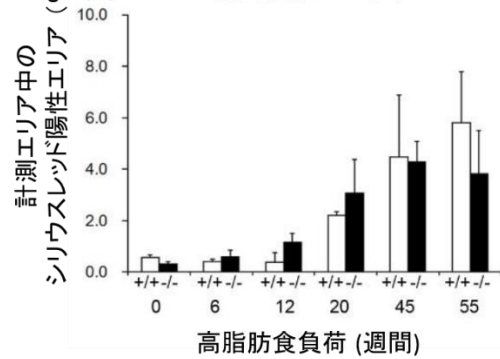
図 16. 高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ マウス、 $AIM^{-/-}$ マウス肝臓におけるメタボローム解析

高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓における各種脂質分子の代謝プロファイリングを行った。各群 3 匹ずつを解析に用い、シグナルの強度は内部標準と肝重量によって標準化した。その結果、 $AIM^{+/+}$ マウスと $AIM^{-/-}$ マウスの間で差を認められなかった。

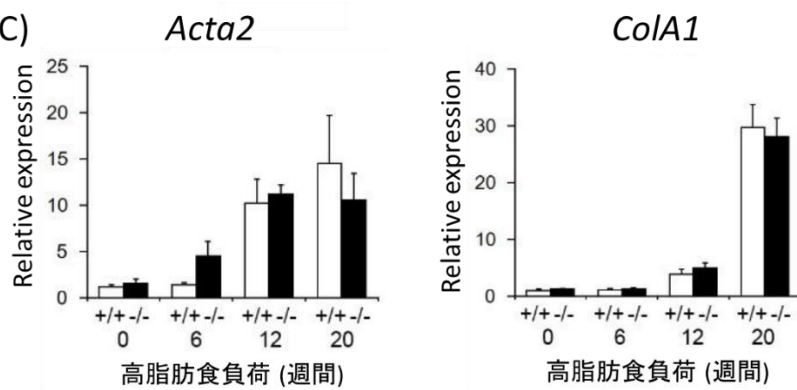
(A) シリウスレッド染色



(B) 線維化エリア



(C)



(D)

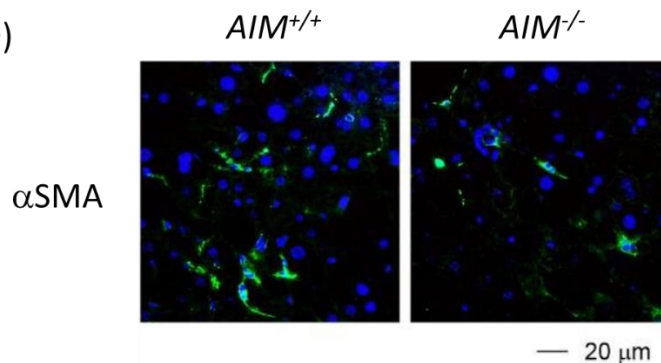


図 17. 高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ マウス、 $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓における線維化の解析

(A) 高脂肪食負荷 20 週間後の $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウス肝臓のシリウスレッド染色によって解析した。

(B) 高脂肪食負荷前および負荷 6-55 週間後までの肝臓においてシリウスレッド染

色を行った。染色した切片を顕微鏡で観察し、各サンプル 10 枚ずつ写真を撮影し、NIH Image-J image analysis software を用いて線維化エリアの測定を行った。その結果、*AIM^{+/+}* マウスおよび *AIM^{-/-}* マウスの肝臓において差異を認めなかった。

(C) リアルタイム PCR を用いて、線維化マーカーの遺伝子発現を解析した。各群 5-6 個体ずつ用いて解析を行った。その結果、*AIM^{+/+}* マウスおよび *AIM^{-/-}* マウスの肝臓において差異を認めなかった。

(D) 高脂肪食負荷 20 週間後の *AIM^{+/+}* マウスおよび *AIM^{-/-}* マウス肝臓において、免疫組織化学法を用いて α SMA (緑) の染色を行った。その結果、*AIM^{+/+}* マウスおよび *AIM^{-/-}* マウスの肝臓において差異を認めなかった。

負荷期間によって、染色エリアは増加するものの、*AIM^{+/+}* マウスおよび *AIM^{-/-}* マウスの間において、差異は認められなかった。次に、線維化マーカーの遺伝子発現を解析した (図 17. C)。その結果、*AIM^{+/+}* マウスと *AIM^{-/-}* マウスの間に差異はなかった。さらに、 α SMA (alpha smooth muscle actin) の免疫染色も行ったが、*AIM^{+/+}* マウスおよび *AIM^{-/-}* マウスにおいて、差異は認められなかった (図 17. D)。

さらに、発がんに関する遺伝子発現や細胞内シグナルの変化について解析するために、高脂肪食を負荷した *AIM^{+/+}* マウスおよび *AIM^{-/-}* マウスの肝臓を用い、マイクロアレイによる解析を行った。その結果、*AIM^{+/+}* マウスと *AIM^{-/-}* マウスの肝臓においてがん化に関する遺伝子の発現に差異は認められなかった (表 1)。

また、発がん過程を亢進する細胞内シグナルの重要な中間体である、AKT や ERK (Extracellular Signal- regulated Kinase) のリン酸化について、高脂肪食を負荷した *AIM^{+/+}* マウスおよび *AIM^{-/-}* マウスの肝臓を用いて比較したが、差異は認められなかった (図 18)。

以上の結果より、高脂肪食負荷マウスでは、AIM の欠損によって脂肪肝のみ亢進するが、NASH において、脂肪肝や細胞内ストレスが進行することに続いて生じるとされている、炎症、線維化に関しては AIM の有無による顕著な差異はないことが明らかになった。よって、AIM による HCC 抑制メカニズムは肝細胞がん化への影響ではないことが示唆された。

シグナル経路	全遺伝子数	高脂肪食 負荷(週間)	P値	被影響遺伝子(倍率変化)
ERK/MAPK Signaling	65	0	0.740	BRAF(3.453), DUSP1(-2.319), ITGA5(-2.059), PLA2G12A(2.432), PLA2G4E(44.623), PPP1R10(-2.511), PPP2R3A(5.450)
		12	N.D.	CRKL(-3.413), RAF1(3.670), DUSP2(2.244), MYC(2.101)
		20	0.603	DUSP1(-2.316), DUSP2(-2.440), FOS(-9.555), MYC(-6.830), RAP1B(-2.743)
FAK Signaling	44	0	0.811	ACTG1(2.344), EGFR(-2.129), ITGA5(-2.059)
		12	N.D.	RAF1(3.670)
		20	0.564	ACTA2(-8.420), ASAP1(4.203), EGFR(2.231)
Notch Signaling	16	0	0.693	APH1B(4.453), DTX4(-2.302)
		12	N.D.	-
		20	N.D.	-
p53 Signaling	79	0	0.310	ADCK3(-2.821), BIRC5(3.105), CCND1(2.134), DRAM1(32.425), GADD45A(4.224), GADD45G(-3.823), MAPK8(-6.188)
		12	0.491	ATR(13.868), CDKN1A(2.134), GADD45B(2.098), HIPK2(2.750), PML(-2.053)
		20	0.137	BCL2(-7.599), BRCA1(-21.022), GADD45G(-7.110), JUN(-2.724), PIDD(-2.545), STAG1(4.264)
PI3K/AKT Signaling	64	0	0.710	CCND1(2.134), ITGA5(-2.059), JAK1(-3.862), PPP2R3A(5.450), SYNJ2(3.172)
		12	0.600	CDKN1A(2.134), GAB2(-20.143), INPP5F(-5.083), RAF1(3.670), TSC1(-2.101)
		20	N.D.	GDF15(-3.411), BCL2(-7.599)
PTEN Signaling	49	0	0.690	CCND1(2.134), EGFR(-2.129), ITGA5(-2.059), NTRK2(8.472), SYNJ2(3.172)
		12	0.590	CDKN1A(2.134), DDR1(2.997), FOXO4(9.913), INPP5F(-5.083), RAF1(3.670)
		20	0.646	BCL2(-7.599), EGFR(2.231), TGFB2(24.386)
Sonic Hedgehog Signaling	17	0	N.D.	-
		12	0.752	DYRK1A(2.825)
		20	0.685	PTCH1(-13.334)
Telomerase Signaling	40	0	0.740	DKC1(2.068), EGFR(-2.129), PPP2R3A(5.450), TERT(3.890)
		12	0.681	CDKN1A(2.134), DKC1(-2.898), MYC(2.101), RAF1(3.670)
		20	0.611	ABL1(4.071), EGFR(2.231), MYC(-6.830)
NF-κB Signaling	86	0	0.767	EGFR(-2.129), IL33(2.201), IL1B(-3.911), MAPK8(-6.188), NTRK2(8.472), ZAP70(2.712)
		12	N.D.	BCL10(2.595), RAF1(3.670), IL1R1(2.062), DDR1(3.000)
		20	N.D.	IL1B(-3.543), EGFR(2.231), TGFB2(24.386)

表 1. 高脂肪食負荷 *AIM^{+/+}* マウス、*AIM^{-/-}* マウス肝臓におけるがん化関連遺伝子発現の比較

マイクロアレイによってがん化に関連する一般的な経路を解析した。解析は Ingenuity Pathways Analysis software (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) を用いた。*P*値はフィッシャーの直接確立検定で算出した。

サンプル数は各グループ 3 個体ずつで解析した。その結果、 $AIM^{+/+}$ マウス、 $AIM^{+/-}$ マウスの肝臓において差のある項目は認められなかった。

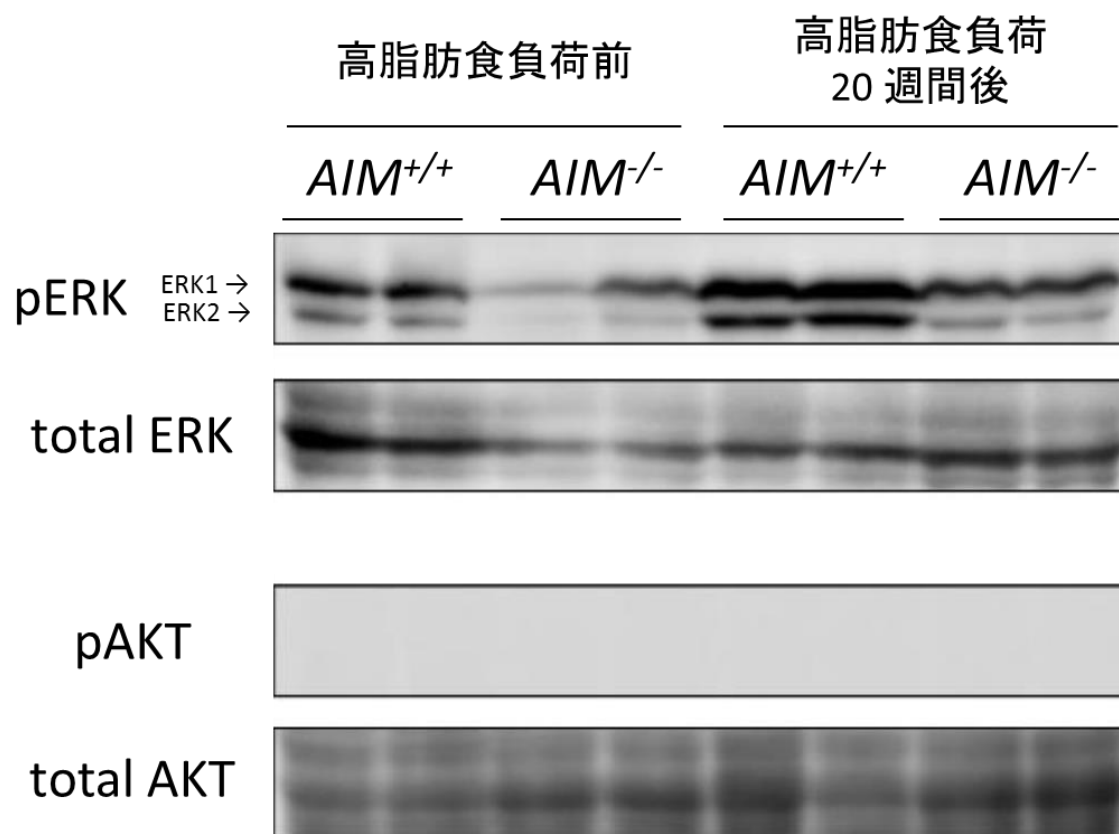


図 19. AKT、ERK の活性化に差はない

イムノブロット法を用いたトータルおよびリン酸化 AKT、ERK を各グループ 2 匹ずつ用いて解析した。その結果、*AIM*^{+/+} マウス、*AIM*^{-/-} マウスの肝臓において差異を認めなかった。

2-2. AIM は肝細胞において細胞内に取り込まれるが、HCC 細胞では細胞表面上に蓄積する

これまでの結果から、AIM は脂肪肝に伴う HCC の腫瘍形成を抑制するが、AIM は肝細胞のがん化過程に影響しないことが証明された。そこで次に、AIM が HCC 細胞の排除に作用するという仮説の検証を行った。

まず、AIM による直接的な HCC 細胞への細胞障害作用の有無を検討することにした。マウス HCC 細胞株である Hepa1.6 に、*AIM*^{+/+} マウスまたは *AIM*^{-/-} マウスから採取した血清を培地の 50%濃度 (v/v) で添加し、4 時間培養した。培養後、細胞表面を抗 AIM 抗体によって染色した。共焦点顕微鏡によって観察した結果、Hepa1.6 において、細胞障害を受けた様子は認めなかった。一方で、これまで初代培養肝細胞において、AIM は細胞内に取り込まれることが明らかになっていたが

(図 10. A)、Hepa1.6 において AIM は細胞内に取り込まれず、細胞表面上に集積することを、抗 AIM 抗体を用いた免疫細胞化学染色で確認した (図 19)。また、抗 AIM 抗体を使用した細胞表面の染色を行い、フローサイトメトリーによって解析した結果からも、AIM が Hepa1.6 の細胞表面上への集積を確認した (図 20)。その際、血中で AIM と結合して存在する IgM についても解析したところ、IgM も AIM と共に Hepa1.6 の細胞表面上に集積することが分かった。また、ヒト HCC 細胞株である HepG2、Alexander、Huh7 に、ヒト血清を添加し、培養したところ、同様に血清中の AIM が HCC 細胞株の細胞表面上に蓄積することを確認した (図 21)。

以上の結果から、マウスおよびヒトの AIM は、HCC 細胞表面上に蓄積することが示された。

次に、高脂肪食を負荷したマウスの肝臓においても、AIM が HCC 細胞表面上に蓄積するかを検証した (図 22)。高脂肪食負荷前、高脂肪食負荷 35、52 週間後の *AIM*^{-/-} マウスに、腸間膜静脈から rAIM を 500 μ g 投与し、4 時間後に肝臓を採取した。AIM 非投与個体をコントロールとして、AIM、IgM、gp73 の免疫染色を行い、

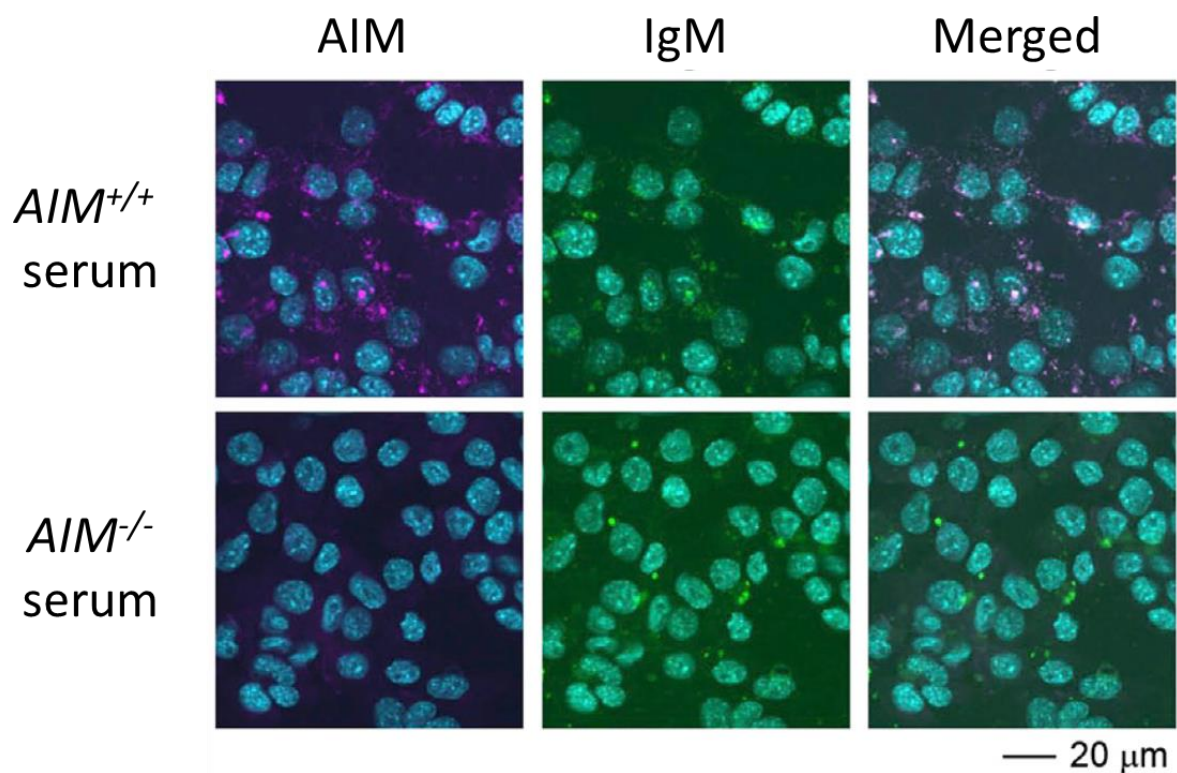
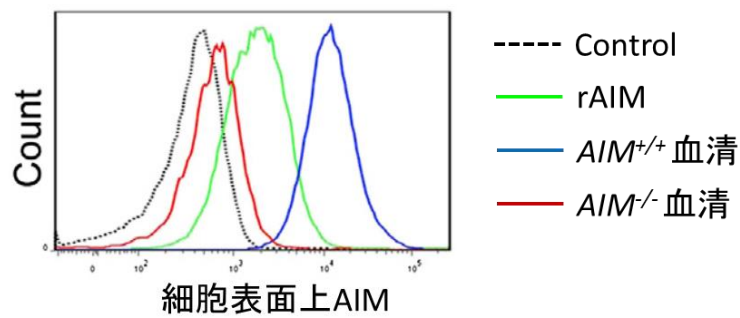


図 19. AIM および IgM は Hepa1.6 細胞表面上に集積する

AIM^{+/+} マウスまたは *AIM*^{-/-} マウスの血清を 50% 濃度(v/v)で加え、Hepa1.6 を培養した。4 時間後、AIM、IgM、DAPI で染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、Hepa1.6 の細胞表面上に AIM および IgM の集積を確認した。

(A)



(B)

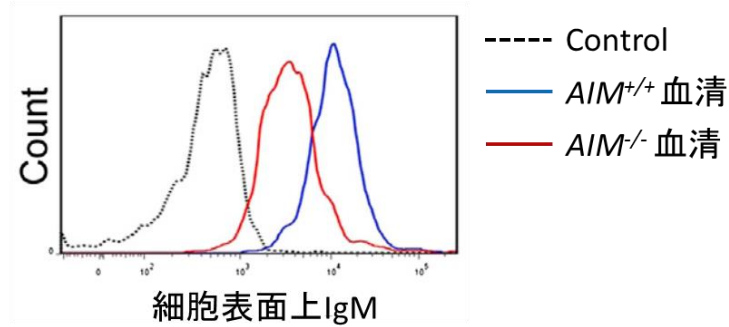


図 20. AIM、IgM は Hepa1.6 細胞表面上へ蓄積する

(A) Hepa1.6 細胞表面上への AIM の蓄積確認

$AIM^{+/+}$ マウス、 $AIM^{-/-}$ マウス血清 50%濃度 (v/v) および AIM (20 $\mu\text{g/ml}$) をそれぞれ添加し、Hepa1.6 を培養した。4 時間後、フローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、Hepa1.6 細胞表面上への AIM の集積を確認した。

(B) Hepa1.6 細胞表面上への IgM の蓄積確認

$AIM^{+/+}$ マウス、 $AIM^{-/-}$ マウス血清 50%濃度 (v/v) を添加し、Hepa1.6 を培養した。4 時間後、フローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、Hepa1.6 細胞表面上への IgM の集積を確認した。

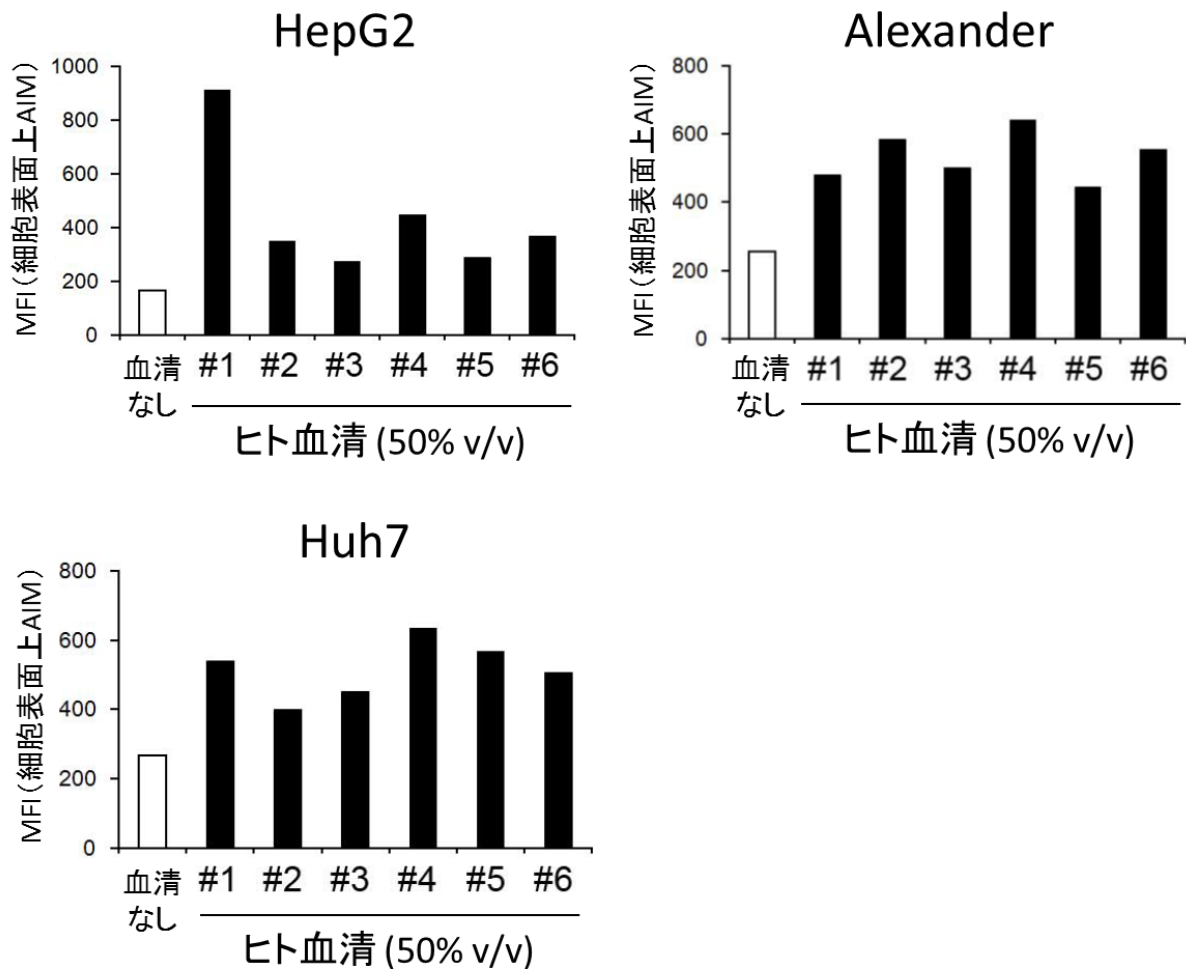


図 21. ヒト HCC 細胞株においても AIM は細胞表面上に集積する

ヒト血清を 50%濃度 (v/v) 添加し、ヒト HCC 細胞株 (HepG2, Alexander, Huh7) を培養した。4 時間後、フローサイトメトリーを用いて細胞表面上への AIM の集積を解析した。その結果、ヒト HCC 細胞株においてもヒト血清中の AIM が細胞表面上に集積することが明らかになった。(MFI: Mean Fluorescence Intensity)

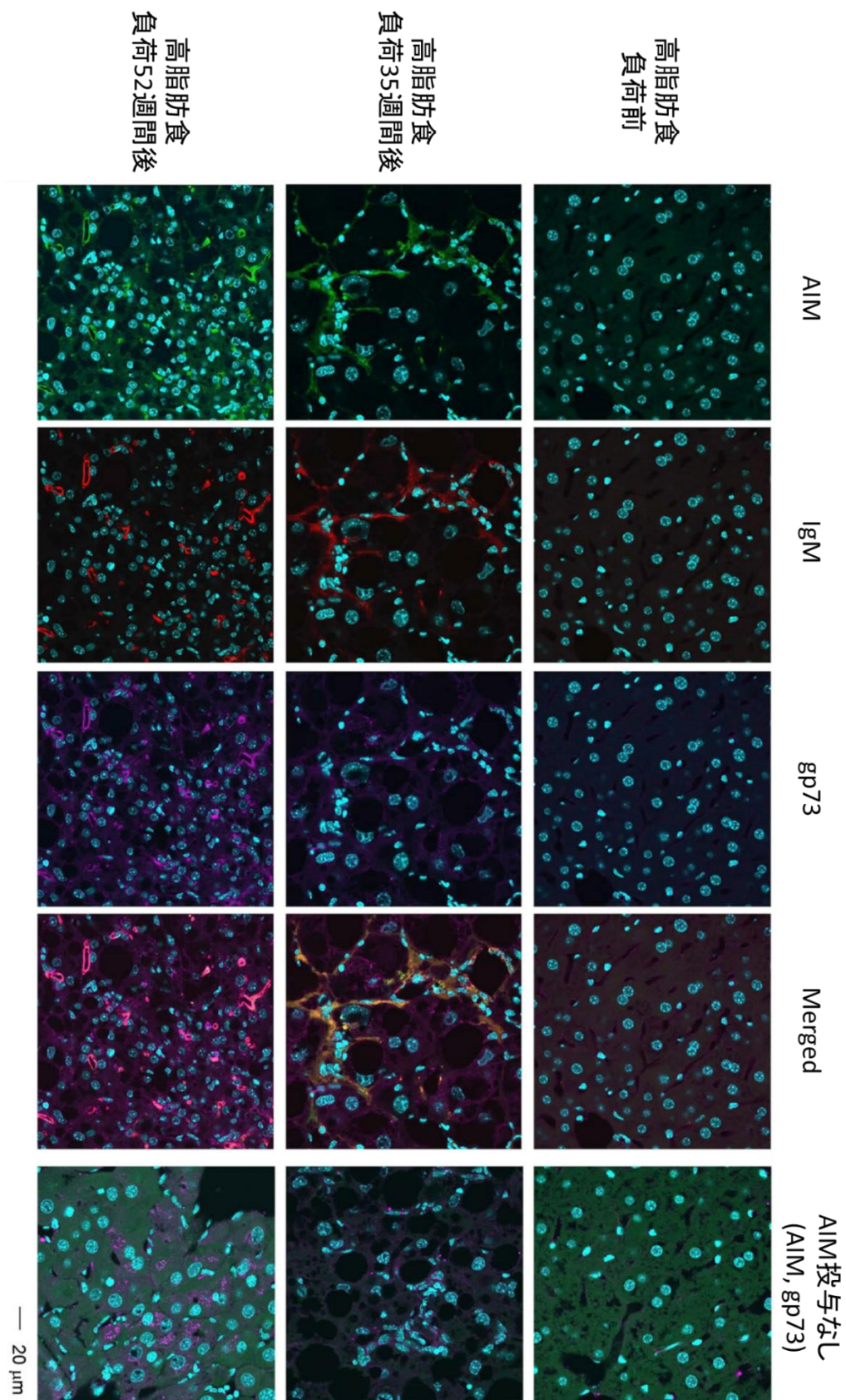


図 22. 高脂肪食負荷肝臓の HCC において、AIM 投与によって HCC 細胞表面上に AIM が集積する

高脂肪食負荷前、高脂肪食負荷 35、52 週間後の *AIM*^{-/-} マウスに腸間膜静脈から AIM を 500 µg 投与し、4 時間後に肝臓を採集した。AIM の投与を行わなかったマウスをコントロールとし、免疫組織化学法によって AIM、IgM、gp73 について解析した。その結果、HCC 細胞表面上に AIM、IgM の集積を認めた。しかし、AIM と IgM は必ずしも共局在しないことも明らかになった。

共焦点顕微鏡を用いて解析した。その結果、高脂肪食負荷 35 週間後から、細胞表面上に AIM を蓄積するエリアを確認した。また、血中で AIM と結合している IgM については、高脂肪食負荷 AIM^{+/+} マウスの肝臓において、AIM 陽性エリアの多くで IgM も陽性であったが、必ずしも AIM と IgM が共局在していなかった。さらに、巨視的な HCC の形成が認められない高脂肪食負荷 35 週間後の肝臓は、HCC 腫瘍の形成を認める高脂肪食負荷 52 週間後の肝臓と比較して、肝細胞における gp73 陽性レベルは低かったが、投与した AIM が細胞表面上に蓄積している部分も存在したことから、AIM はがん化過程にある肝細胞においても細胞表面上に集積することが示唆された。これらの組織染色に加えて、AIM の集積している場所が細胞表面上であることを確認するために、抗 AIM 抗体に加えて、小麦胚細胞凝集素 (Wheat Germ Agglutinin: WGA) を用いて解析を行った。共焦点顕微鏡による観察の結果、WGA と AIM の共染色像を確認したことから、マウス肝臓において AIM は HCC 細胞の細胞表面上に集積することが確かめられた (図 23)。以上の実験結果から、AIM は正常な肝細胞において細胞内に取り込まれるにも関わらず、HCC 細胞あるいはがん化しつつある肝細胞においては、細胞表面上に集積することが明らかになった。その原因としては、がん化細胞のエンドサイトーシス不良が考えられた。エンドサイトーシス不良は、一般に、様々なタイプのがん細胞の特徴として知られている。また、がん細胞においては、増殖因子受容体の恒常的な発現や、インテグリン、カドヘリンによる接着複合体のリサイクリング抑制などが起こり、制限されない細胞増殖の原因となる [67]。そこで、エンドサイトーシスに関連する遺伝子である、*Dynamin2*、Exocrine gland secreted peptide 15 (*Esp15*)、Casitas B-lineage Lymphoma (*Cbl*)、*Sprouty homolog 2* (*Spry2*)、*Par-3 family cell polarity regulator* (*Pard3*) [68-72] の発現を確認した。その結果、がん部位においてエンドサイトーシスに関連する遺伝子の発現が低下していることを確認した (図 24)。以上から、通常の肝細胞においては細胞内に取り込まれる AIM が、HCC 細胞では

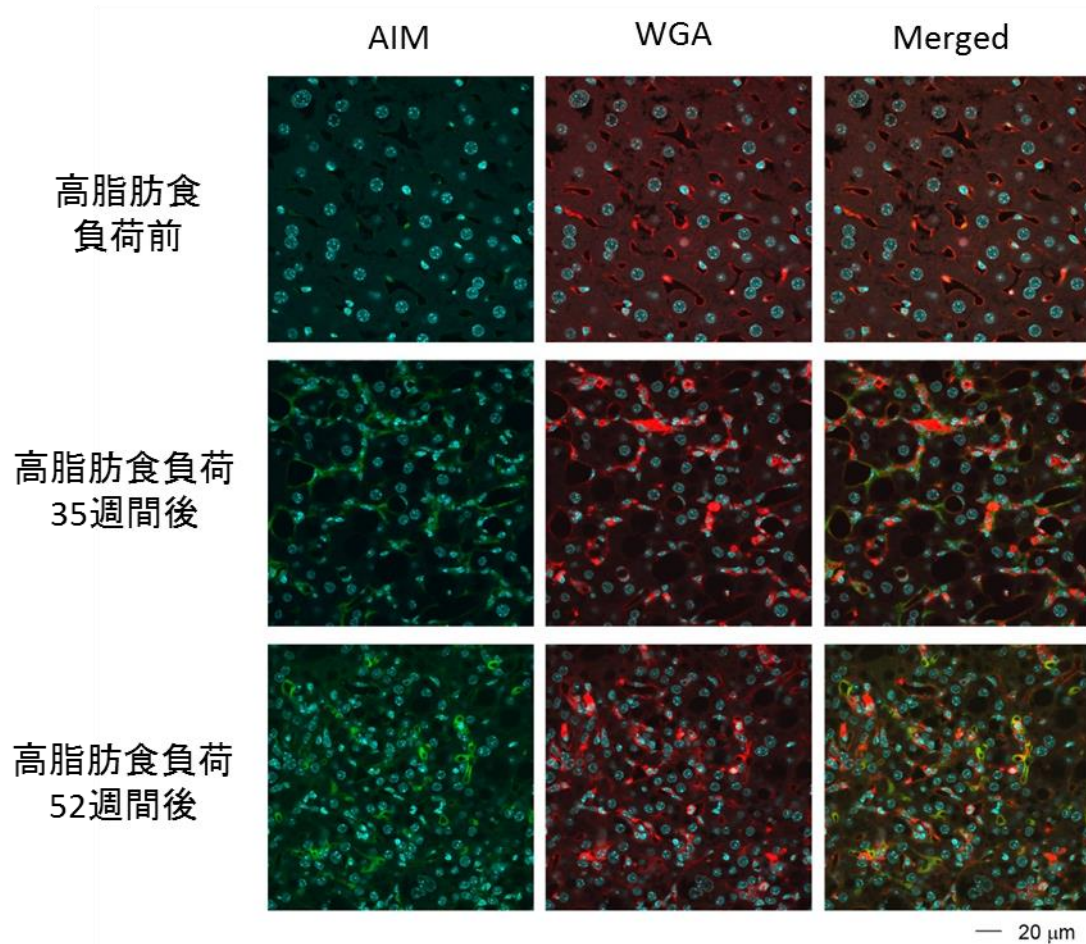


図 23. AIM は HCC の細胞表面上に集積している

高脂肪食前および高脂肪食負荷 35、52 週間後の *AIM*^{-/-} マウスに腸間膜静脈から AIM を 500 μg 投与して 4 時間後の肝臓を、WGA (wheat germ agglutinin: 小麦胚細胞凝集素) を用いて、免疫組織化学法によって解析した。その結果、WGA と AIM の共局在を確認した。

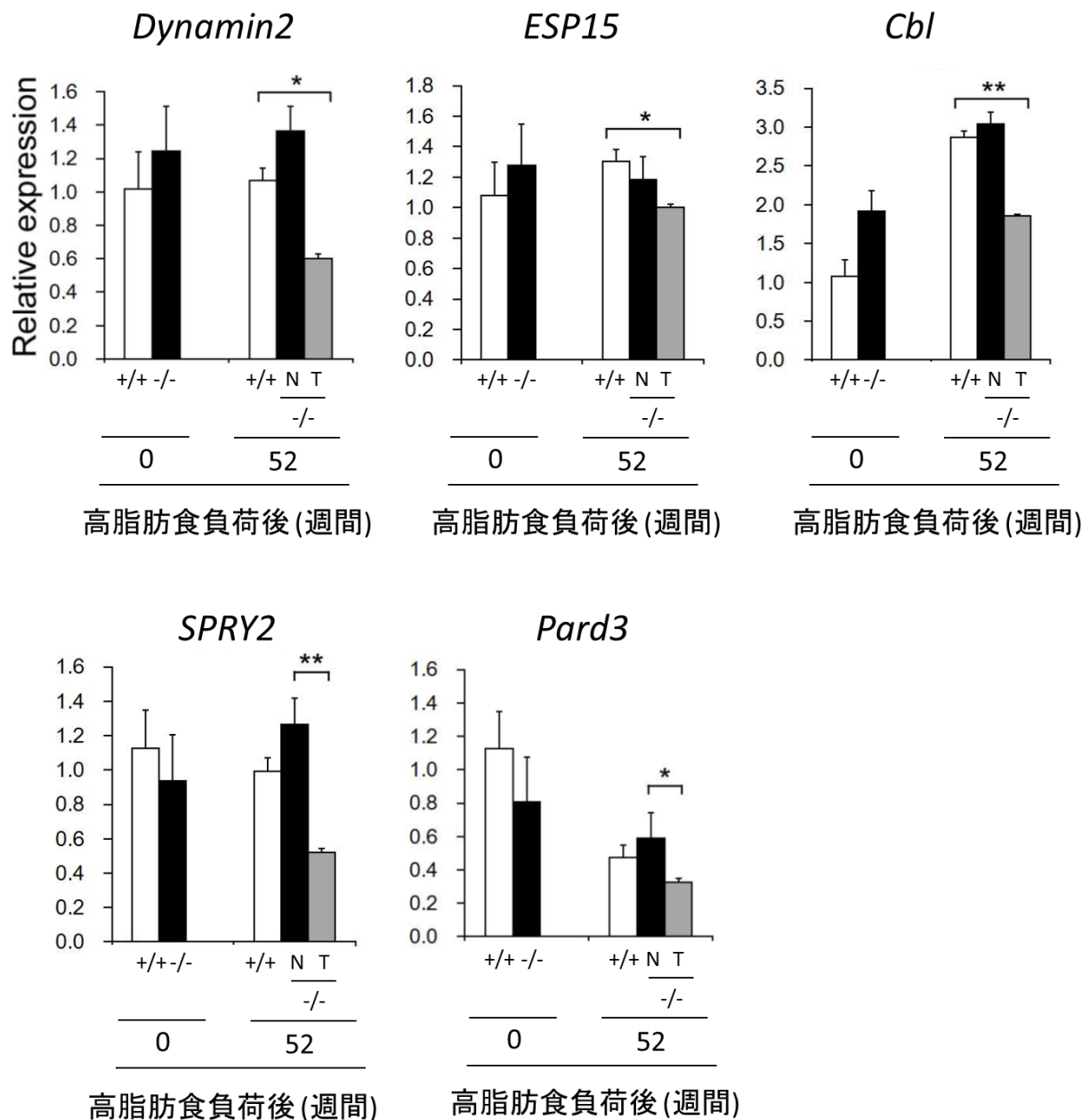


図 24. HCC においては、エンドサイトーシス不良によって AIM を細胞表面上に集積する

高脂肪食負荷 $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓において、エンドサイトーシス関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR によって解析した。各群 5-6 個体ずつ用い、高脂肪食負荷 52 週間後の肝臓は、非 HCC 部位 (N)、HCC 部位 (T) に分別して解析した。その結果、 $AIM^{-/-}$ マウスの HCC 部位において、その発現量の低下を確認した。

エンドサイトーシス不良によって細胞内に取り込まれず、AIM は HCC 細胞表面上に集積することが明らかになった。また、HCC 細胞特異的な細胞表面上への AIM の集積は、HCC 細胞特異的な排除機構を誘導する可能性があると考えられた。

2-3. 細胞表面上結合 AIM によって HCC 細胞特異的なネクロシスが誘導される

これまでの検討から、AIM は HCC 細胞のエンドサイトーシス不良によって、HCC 細胞特異的に細胞表面上に集積するが、*in vitro* の解析において、AIM は HCC に対し、直接的な細胞障害作用はもたないことが示唆された。従って、AIM が細胞表面上に集積することによって、HCC 細胞に対し、間接的に何らかの排除機構を誘導するのではないかと考えた。そこで、マウス生体内において、HCC 細胞に対する、AIM の細胞表面上集積による影響を解析することにした。しかし、肝臓に HCC を形成したマウスに対し、AIM を投与するという方法は、肝臓以外の臓器での取り込みや尿中への排出、HCC の細胞表面上に集積する AIM 量を制御できないことなどから、効率的でないと想定された。

そこで、AIM が HCC 細胞表面上に集積した状態を模倣し、HCC 細胞表面上に AIM を細胞表面に結合した状態 (Membrane bound-AIM: MB-AIM) で発現するマウス肝がん細胞の安定発現株 (MB-AIM/ Hepa1.6) を作製した。なお、MB-AIM/ Hepa1.6 は AIM の C 末端にシグナル伝達能を欠損させた CD5 の細胞膜貫通領域を結合させることで細胞表面上に AIM を発現させた (図 25. B) [73]。抗 AIM 抗体を用いて AIM を検出し、フローサイトメトリーによって解析した結果、MB-AIM/ Hepa1.6 の細胞表面上に、AIM が発現していることを確認した (図 25. C)。細胞表面上に集積した AIM による HCC 細胞への影響を調べるために、MB-AIM/ Hepa1.6 と通常の Hepa1.6 を 5×10^5 cells ずつ混和し、腸間膜静脈から *AIM*^{-/-} マウスの肝臓に移植した。移植 1 週間後に肝臓を採取したところ、移植した細胞によるコロニーの形成を確認した。*rab2* を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡によって解析した結果、そのほとんどが AIM 陰性であり、通常の Hepa1.6 由来のコロニーであることが確認された (図 25. D)。すなわち、AIM を細胞表面上に発現している MB-AIM/ Hepa1.6 は、肝臓にほとんど生着できないということが示唆された。このことから、細胞表面上に AIM が存在していると、生体内において何らかの機構によ

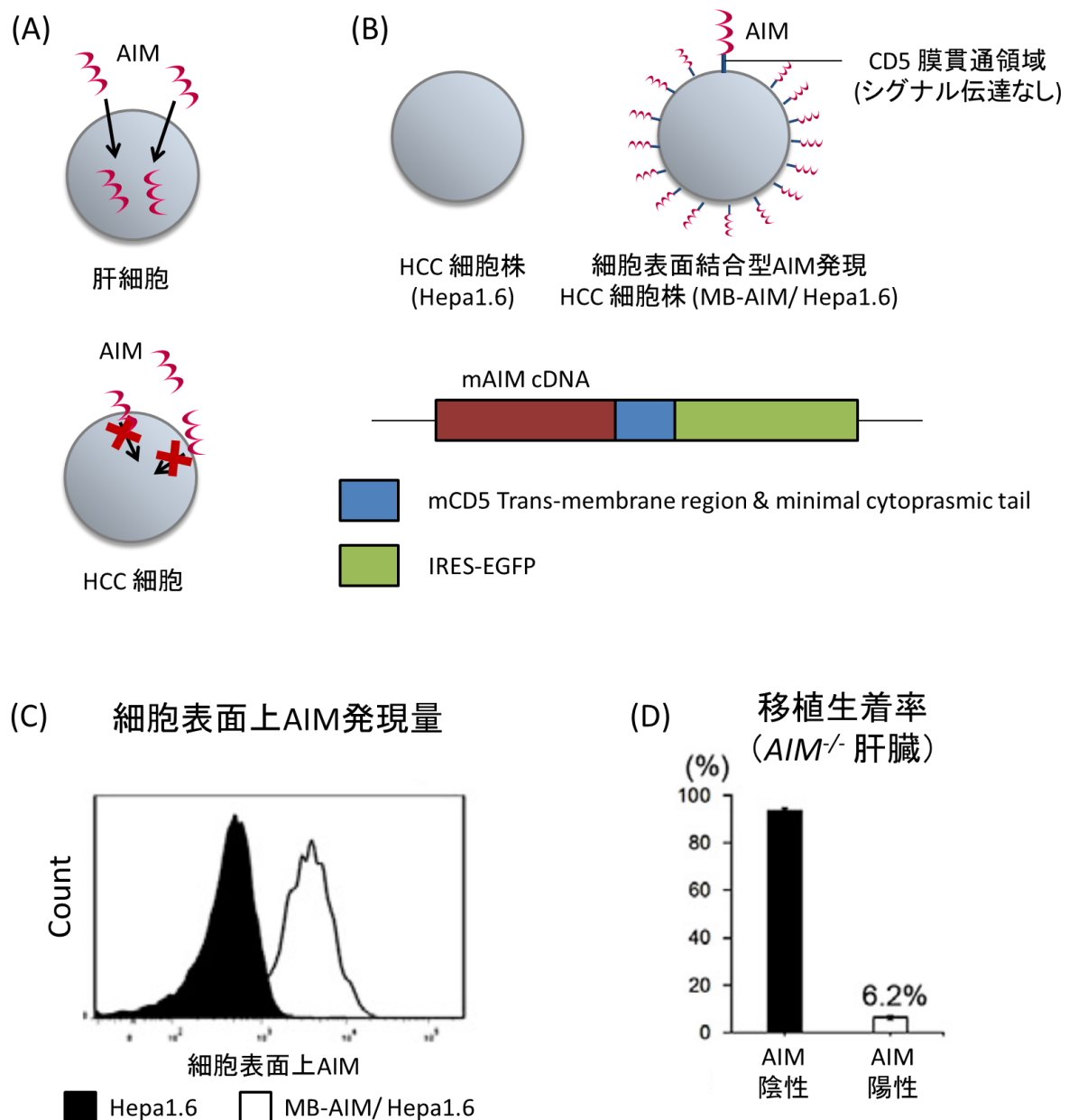


図 25. 細胞表面結合型 AIM 発現肝がん細胞株はマウス肝臓への生着率が低下する

(A) 肝細胞および HCC 細胞に対する AIM の動態の模式図

AIM は正常な肝細胞には細胞内に取り込まれるが、HCC 細胞においてはエンドサイトーシス不良の影響で細胞内に取り込まれず、細胞表面上に集積する。

(B) MB-AIM/ Hepa1.6 模式図

細胞表面上に恒常的に細胞表面結合型 AIM を発現させるために、CMV プロモーターを用い、AIM の C 末端にマウス CD5 細胞膜領域とシグナル伝達能を持たない細胞内領域を結合したベクターのトランスフェクションを行い、安定発現株 (MB-AIM/ Hepa1.6) を得た。

(C) MB-AIM/ Hepa1.6 安定発現株の細胞表面上 AIM の発現を、抗 AIM 抗体

(rab2) を用いて確認した。解析にはフローサイトメトリーを用いた。その結果、MB-AIM/ Hepa1.6 において細胞表面上に AIM を発現していることを確認した。

(D) Hepa1.6 および MB-AIM/ Hepa1.6 を 5×10^5 cells ずつ混和し、腸間膜静脈から *AIM^{-/-}* マウス肝臓に移植した。移植 1 週間後、肝臓を採取し、免疫組織化学法を用いて AIM 陰性コロニーと陽性コロニーをそれぞれ計測した。その結果、MB-AIM/ Hepa1.6 は細胞表面上に AIM を発現していない Hepa1.6 と比較して、肝臓への生着率が著しく低下することを確認した。

って排除されるということが示唆された。

そこで、生体内において、細胞表面上に AIM を集積した際、その細胞が除去される機構について、詳細に検討するために、細胞を肝臓に移植した後、コロニーを形成してから、細胞表面上に AIM を発現させることが可能である安定発現株

(inducible Membrane bound-AIM/ Hepa1.6: iMB-AIM/ Hepa1.6) を作製した。

iMB-AIM/ Hepa1.6 の作製には、ドキシサイクリン (Doxycycline: Dox) の存在下において、目的遺伝子を発現させる、Tet-On Gene Expression System

(Clontech) を用いた (図 26. A)。AIM⁺ マウスの肝臓に対し、iMB-AIM/

Hepa1.6 を 1x10⁶ cells 腸間膜静脈から移植した。移植 1 週間後から、AIM の発現を誘導するために、Dox を 5 mg/kg 用いて、静脈内に投与した。

まず、Dox の投与によって iMB-AIM/ Hepa1.6 のコロニーの細胞表面上に速やかに AIM が発現することを確認した (図 26. B)。Dox 投与後、HE 染色によって、コロニーの経時変化を追ったところ、6-12 時間後には炎症性細胞の浸潤やコロニーの消失など、コロニー内における HCC 細胞の細胞死が確認された (図 27)。さらに、AIM 発現後、コロニー内において、細胞死が生じていることを確認するために、細胞増殖マーカーである Ki67 の免疫染色を行った。その結果、Dox 投与後において、ki67 陽性細胞の減少が確認された (図 28)。さらに、電子顕微鏡によって観察した結果、Dox 投与後のコロニーにおいて、ネクロシスの特徴である細胞の核の縮小、凝集や細胞質にあるオルガネラの崩壊が観察された (図 29)。さらに、Dox 投与後、細胞死が生じたコロニーでは、TUNEL 染色陰性であったことから (図 30)、これらの細胞死は、アポトーシスではなくネクロシスであることが示唆された。以上の結果から、AIM が細胞表面上に集積した細胞において、ネクロシスが誘導されていることが明らかになった。

また、AIM の細胞表面への集積によって、ネクロシスが生じた後、クッパー細胞によって、ネクロシスを起こした細胞の残骸は貪食されることが想定された。

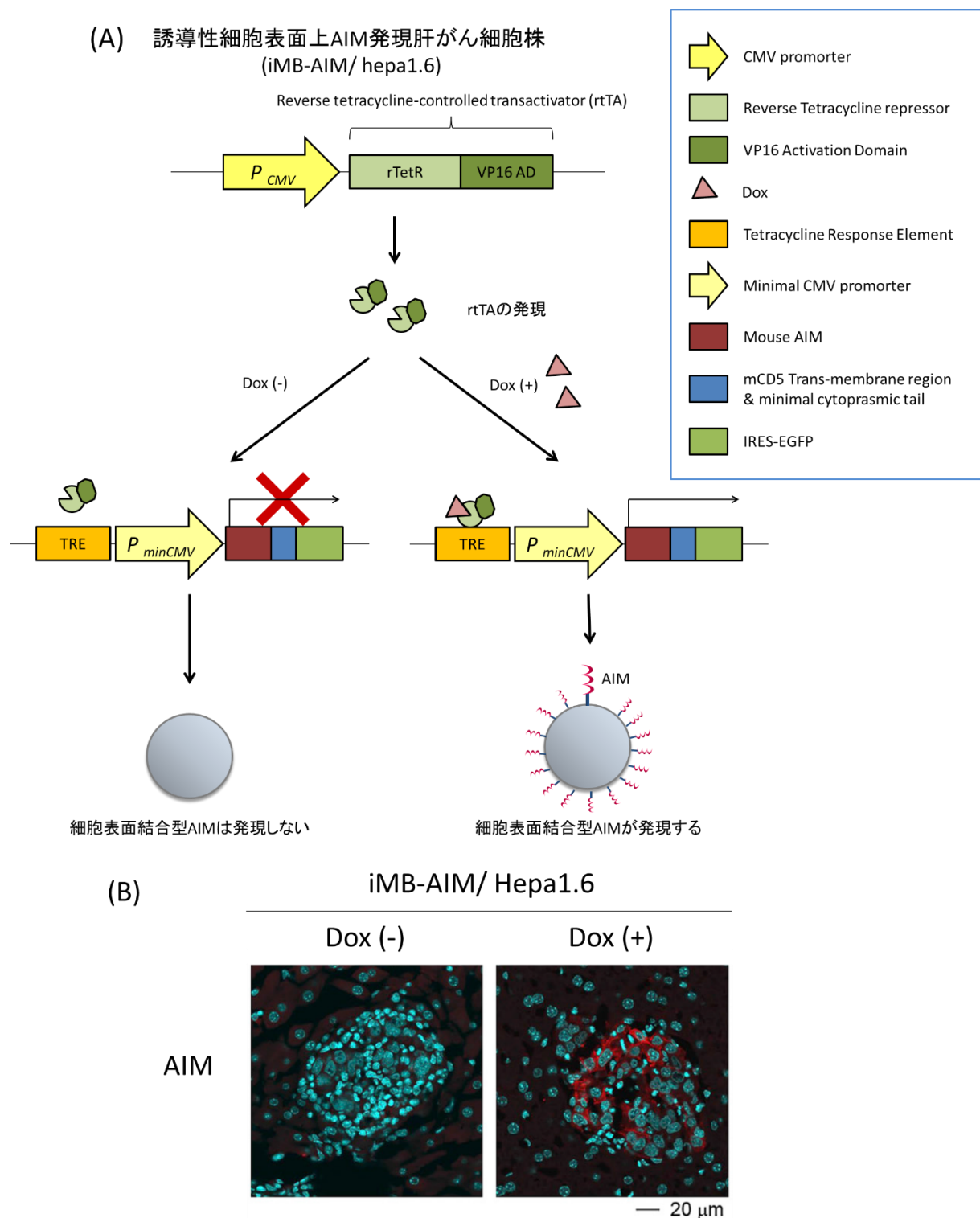


図 26. 誘導性細胞表面結合型 AIM 発現肝がん細胞株 (iMB-AIM/ Hepa1.6) の作製

(A) iMB-AIM/ Hepa1.6 の模式図

Tet-On Gene Expression System を用い、Dox の投与によって AIM を Hepa1.6 の細胞表面上に結合した状態で集積する安定発現株 (iMB-AIM/ Hepa1.6) を作製した。iMB-AIM/ Hepa1.6 は、rtTA を発現するための調節ベクターと rtTA と Dox の

作用によって目的遺伝子である mouse AIM / CD5 transmembrane region and minimal cytoplasmic tail/ IRES-EGFP を発現するための応答ベクターをコトランスフェクションすることによって作成した。

(B) Dox 投与後、iMB-AIM/ Hepa1.6 由来コロニーにおいて AIM 発現を確認した (赤 : AIM)。

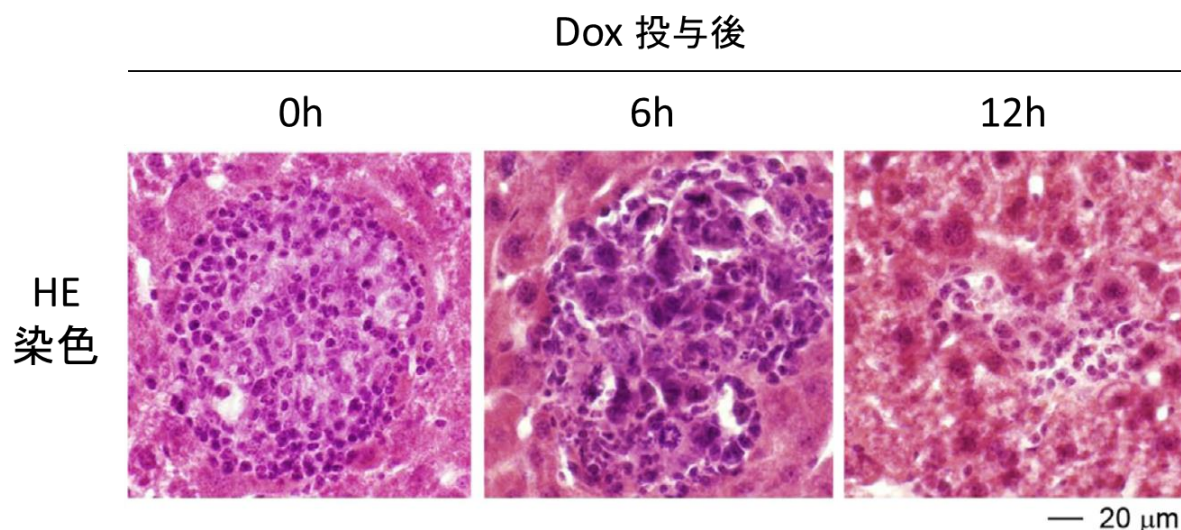


図 27. iMB-AIM/ Hepa1.6 由来コロニーは Dox 投与後、細胞死を生じる

AIM^{fl} マウスに iMB-AIM/ Hepa1.6 を 1×10^6 cells 用い、腸間膜静脈からの移植を行った。1 週間後、Dox を 5 mg/kg で投与し、継時的に肝臓を採取した。HE 染色法を用いて解析したところ、Dox 投与 6-12 時間後にかけて細胞の膨張や炎症性細胞の浸潤、コロニーの崩壊が観察されたことから、コロニー内における細胞死を確認した。

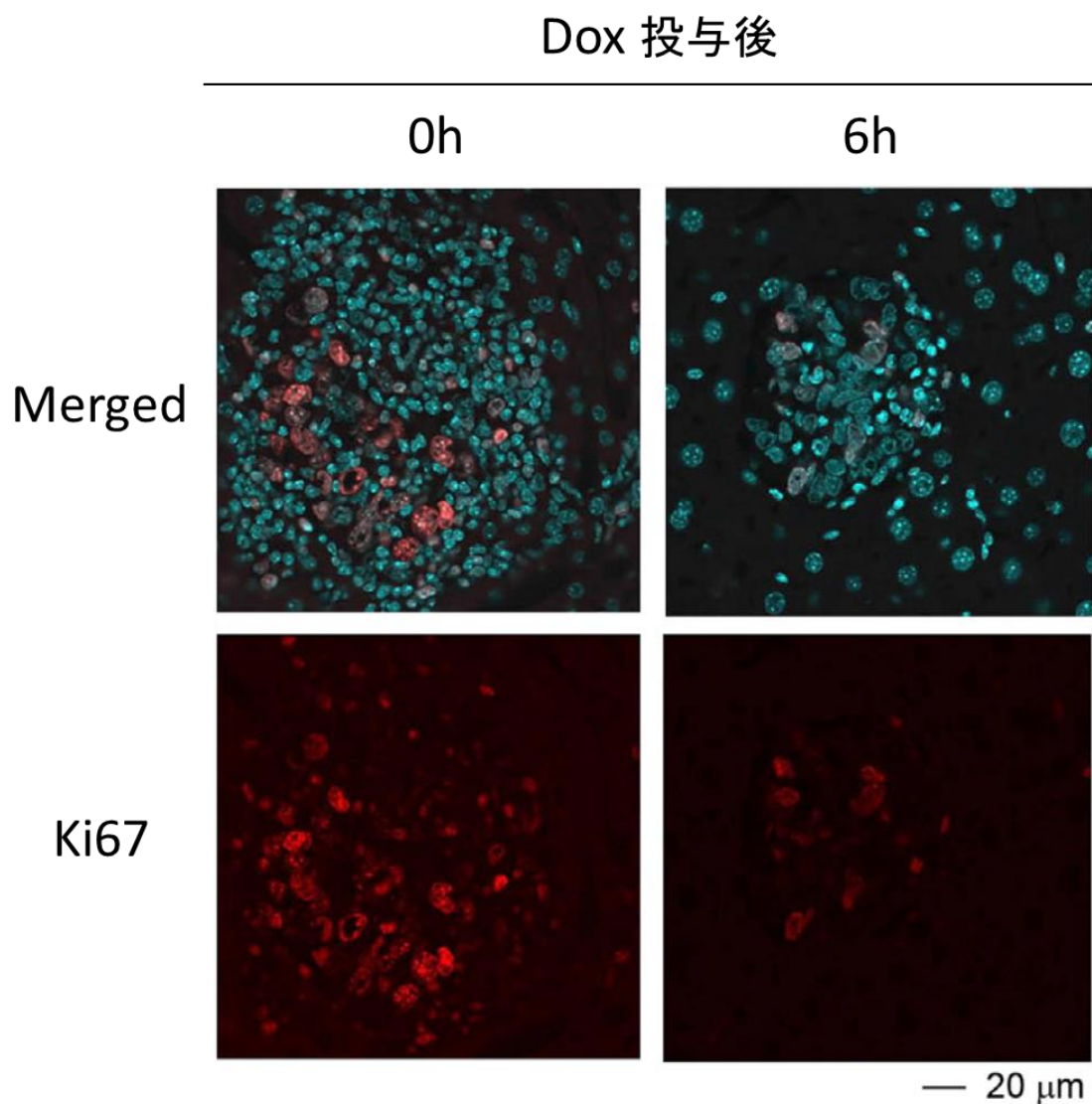


図 28. Dox 投与後の iMB-AIM/ Hepa1.6 由来コロニーにおいて、Ki67 陽性細胞が減少する

AIM^{-/-} マウスに iMB-AIM/ Hepa1.6 を 1×10^6 cells 用い、腸間膜静脈からの移植を行った。1 週間後、Dox を 5 mg/kg で投与し、継時的に肝臓を採取した。免疫組織化学法を用いて Ki67 の免疫染色を行ったところ、Dox 投与 6 時間後において Ki67 陽性細胞の減少を確認した。(赤 : Ki67)

Dox 投与後

電子
顕微鏡

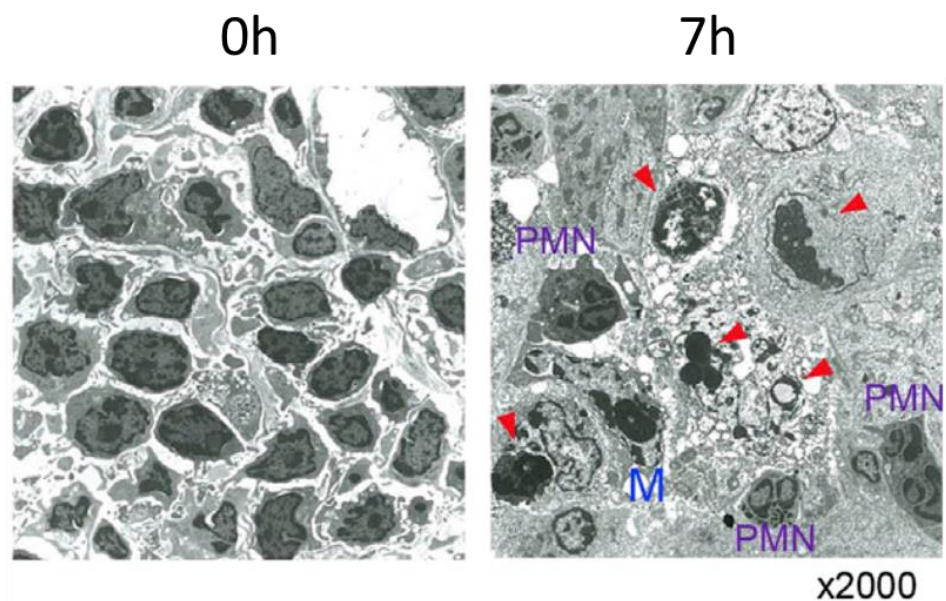


図 29. iMB-AIM/ Hepa1.6 由来コロニーでは Dox 投与後にネクローシスが生じる

AIM^{-/-} マウスに iMB-AIM/ Hepa1.6 を 1×10^6 cells 用い、腸間膜静脈からの移植を行った。1 週間後、Dox を 5 mg/kg で投与し、継時的にサンプリングを行った。電子顕微鏡を用いた観察を行ったところ、Dox 投与後 7 時間の時点において、コロニー内の細胞のネクローシス（細胞の核の縮小、凝集およびオルガネラの崩壊）を確認した。（PMN : Polymorphonuclear leukocytes, M : Macrophage, 赤矢印 : 細胞死に陥った Hepa1.6）

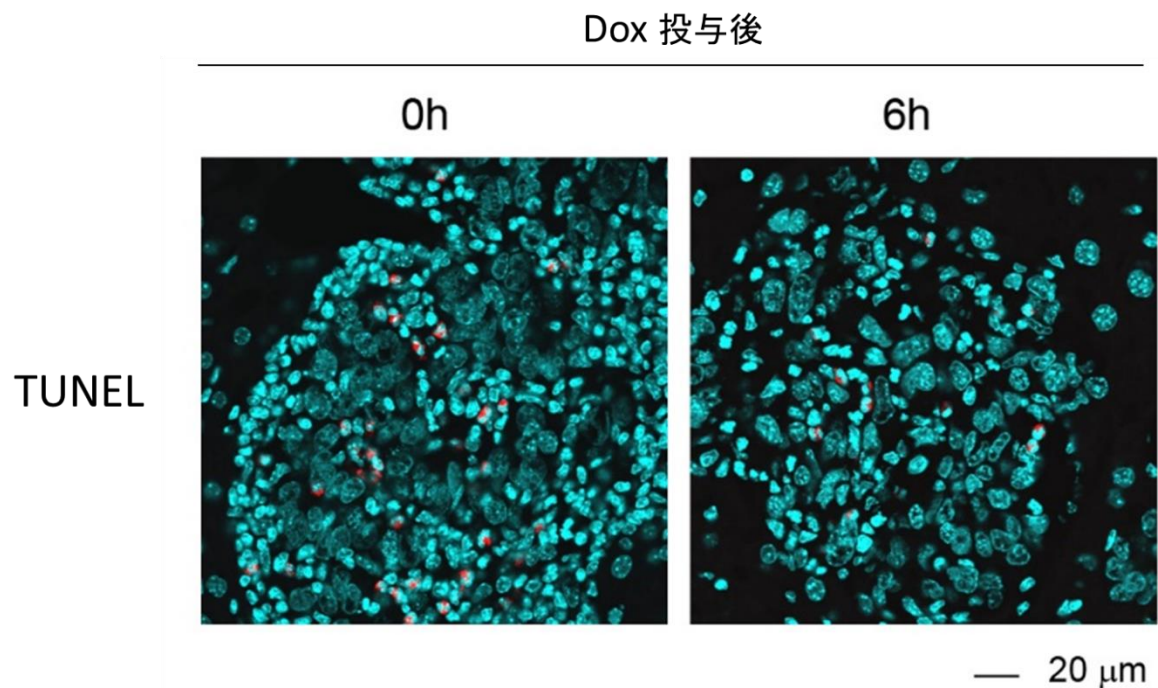


図 30. iMB-AIM/ Hepa1.6 由来コロニーにおける Dox 投与後の細胞死はアポトーシスではない

iMB-AIM/ Hepa1.6 を 1×10^6 cells 用い、腸間膜静脈からの移植法によって、*AIM*^{-/-} マウス肝臓に移植した。1 週間後、Dox を 5 mg/kg で投与し、継時的にサンプリングを行った。TUNEL 染色によって解析したところ、細胞表面上に AIM を集積することでアポトーシスを起こした細胞は確認しなかった。

そこで、抗 F4/80 抗体を用いた、免疫染色を行った結果、F4/80 陽性細胞がコロニー内部に浸潤している像が認められた（図 31）。この結果から、ネクローシスに陥った細胞の残骸を処理するためにクッパー細胞が集積していることが考えられた。これまでの実験では、MB-AIM/ Hepa1.6 および iMB-AIM/Hepa1.6 など、HCC 細胞株に対し、人為的に AIM を細胞表面上へ集積させることで、AIM の HCC 細胞表面上集積による影響を解析してきた。その結果、細胞表面上に AIM を発現した細胞は、ネクローシスに陥ることが明らかになった。次に、人為的に AIM を細胞表面上に集積させる手法ではなく、マウスに AIM を投与する手法によっても、これまでと同様にネクローシスが観察されるかを検討した。Hepa1.6 を移植した *AIM*^{+/+} マウスにおいて、rAIM を毎日 200 µg、5 日間にわたって腹腔内に投与したところ、抗 AIM 抗体を用いた免疫染色の結果から、いくつかのコロニーにおいて AIM の集積および細胞死を確認した（図 32）。この結果から、移植した Hepa1.6 において、投与した AIM が集積し、ネクローシスが誘導されることを示した。

上記の結果を受けて、内因性の AIM による細胞死の影響を調べるために、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスに対し、Hepa1.6 を 1x 10⁶ cells ずつ移植し、移植 1 週間後のコロニー数を比較した。その結果、*AIM*^{-/-} マウスでは *AIM*^{+/+} マウスと比較して顕著にコロニー数が多く、AIM を欠損した状態において移植した細胞の生着率が上昇することが明らかになった（図 33）。

さらに、AIM の投与は、高脂肪食の負荷により、既に肝臓において形成された HCC 腫瘍に対しても効果的であるかを検証するために、高脂肪食負荷 46 週間後の *AIM*^{-/-} マウスに対し、rAIM を継続的に 3 週間投与した（200 µg/回、週 3 回、静脈内投与、各投与群 2 匹ずつ）。その結果、コントロール PBS を投与した群においては、巨視的な観察から、2 匹ともに HCC の形成を認めたが、AIM 投与群の 2 匹中 1 匹においては、HCC の形成を認めなかった（図 34. A, B）。AIM 投与群においても、HCC を形成した個体が存在した原因として、投与した AIM が HCC の細胞表

Dox 投与後

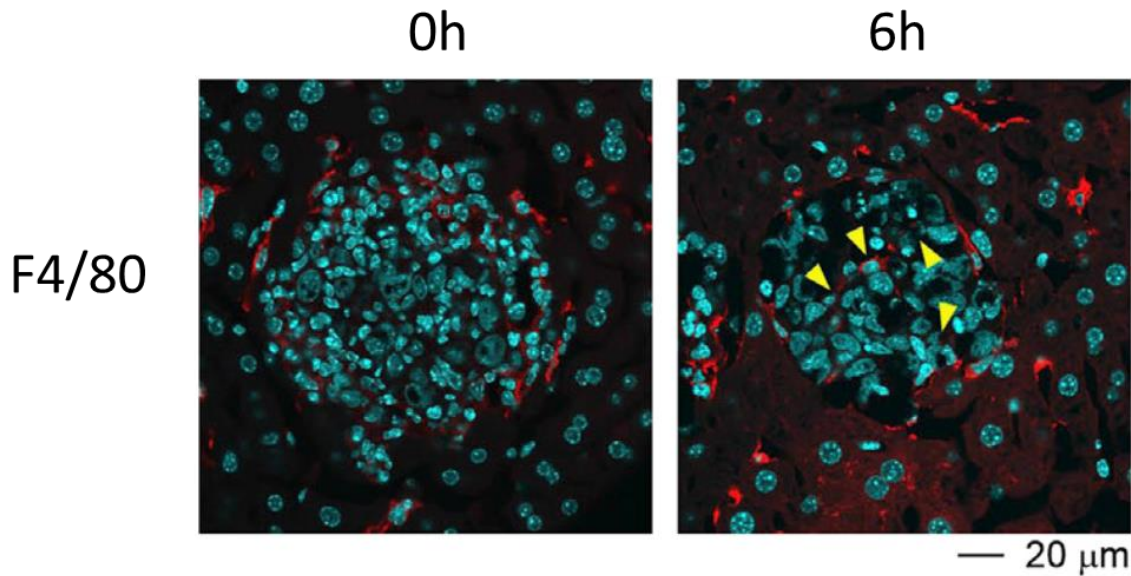


図 31. iMB-AIM/ Hepa1.6 由来コロニーでは Dox 投与によってネクローシスを起こした細胞がクッパー細胞によって除去される

iMB-AIM/ Hepa1.6 を 1×10^6 cells 用い、腸間膜静脈からの移植法によって、*AIM^{-/-}* マウス肝臓に移植した。1 週間後、Dox を 5 mg/kg で投与し、継時的に肝臓を採取した。F4/80 の染色を行ったところ、Dox 投与 6 時間後において、コロニー内に F4/80 陽性細胞の浸潤を確認した。（赤：F4/80, 黄矢印：コロニー内に浸潤したマクロファージ）

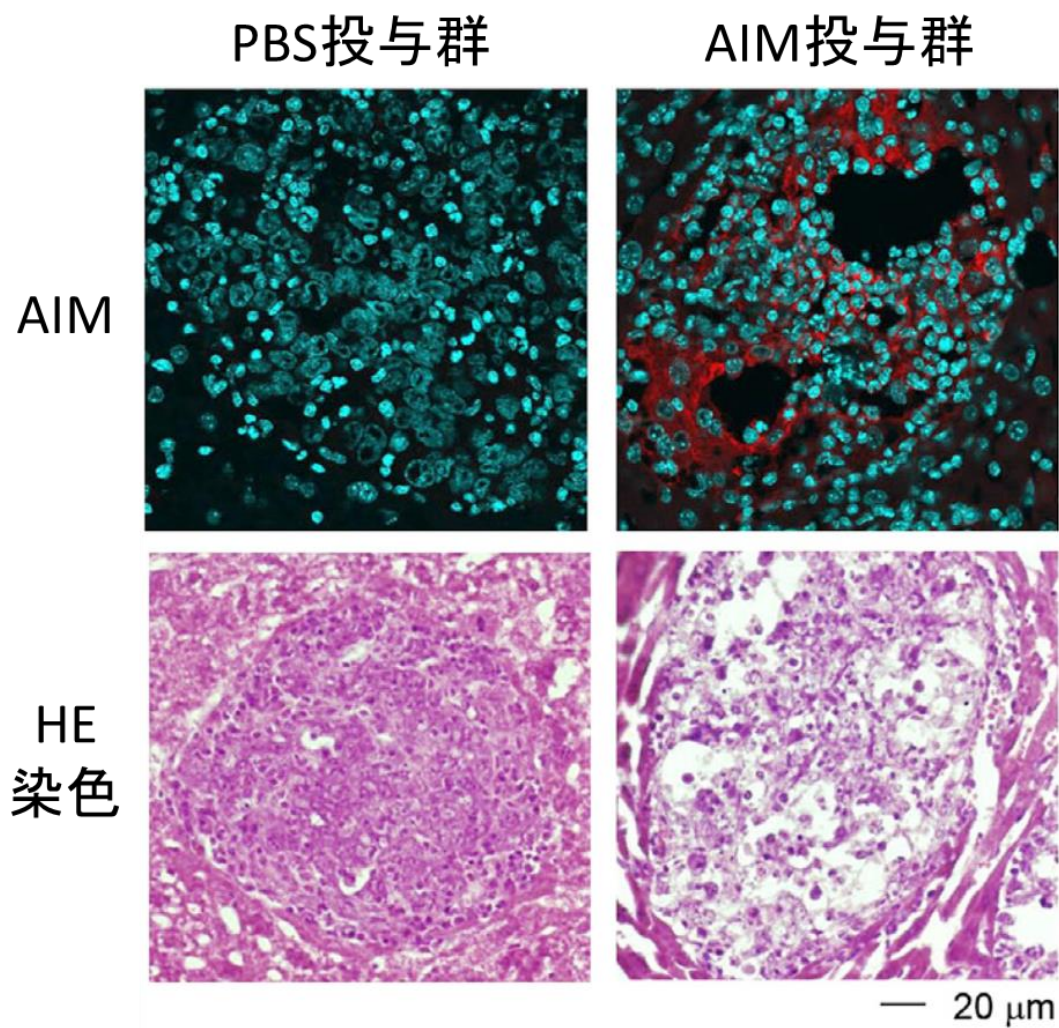
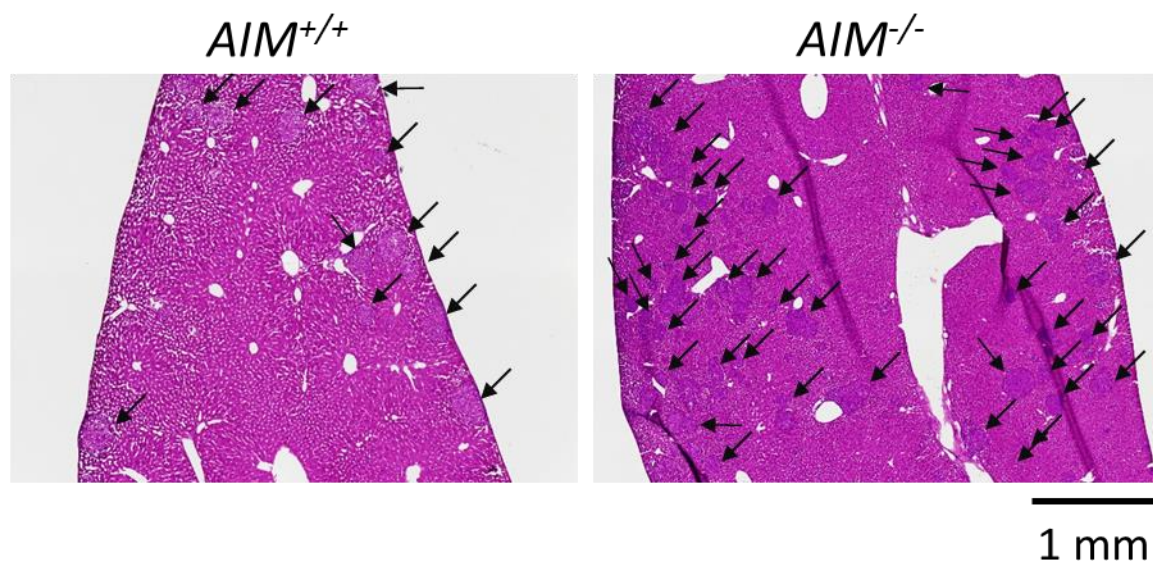


図 32. 投与した AIM が移植した Hepa1.6 の細胞表面上に集積すると、細胞死を生じる

AIM^{-/-} マウスに Hepa1.6 を 1×10^6 cells 用い、腸間膜静脈からの移植を行った。1 週間後、AIM あるいはコントロールとして PBS を 5 日間、200 μg ずつ投与した。各肝臓を免疫染色（上段、赤：AIM）および HE 染色法（下段）によって解析したところ、AIM を細胞表面上に集積したコロニーにおいて細胞死を確認した。

(A)



(B)

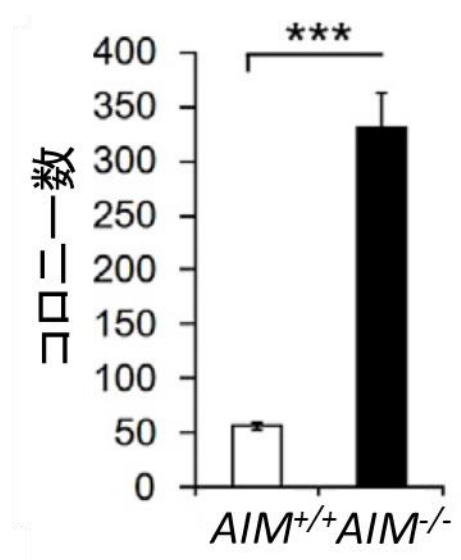


図 33. *AIM*^{+/+} マウス、*AIM*^{-/-} マウスへの Hepa1.6 移植後、コロニー数の計測

AIM^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスに Hepa1.6 を 1×10^6 cells 用い、腸間膜静脈からの移植を行った。1 週間後、HE 染色法で染色したサンプルのコロニー数を計測した。その結果、*AIM*^{-/-} マウスにおいてコロニーの形成が増加していることを認めた。解析には *AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスは各 3 匹ずつ用い、さらにそれぞれの肝臓の異なるローブから 6 切片分解析した。

(A) HE 染色の撮影像

(B) コロニー数計測結果

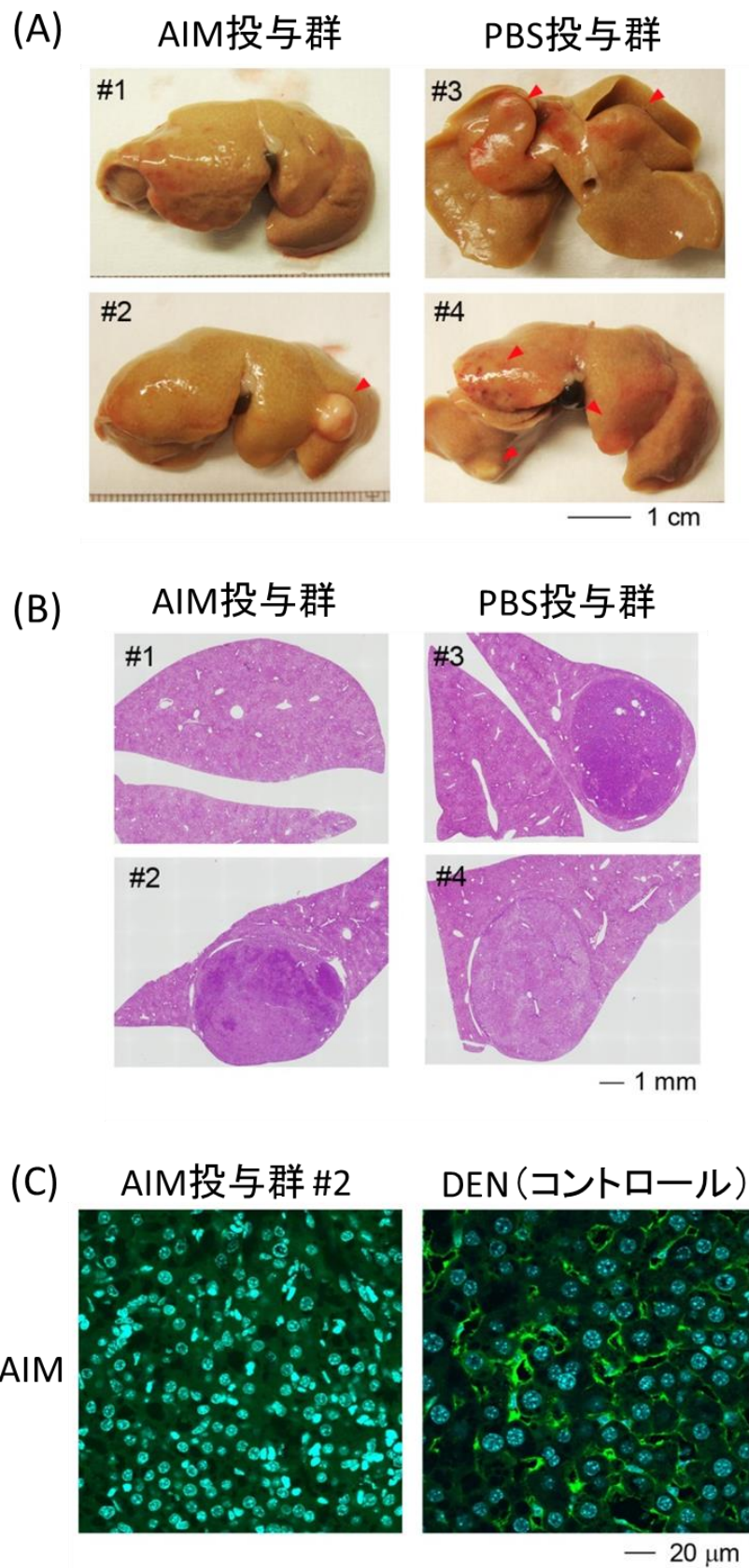


図 34. AIM の継続的な投与は、高脂肪食負荷した *AIM*^{-/-} マウスでの HCC 発達を抑制する

高脂肪食負荷 46 週間後から 3 週間、AIM を週 3 回、1 回当たり 200 μ g ずつ継続的に投与を行った。また、コントロール群として AIM の代わりに PBS の投与を行った。

(A) AIM 投与群および PBS 投与群の肝臓を撮影した。PBS 投与群では 2 匹中 2 匹ともに HCC の腫瘍形成を確認したが、AIM 投与群では 2 匹中 1 匹で HCC の腫瘍形成が抑制された。

(B) AIM 投与群および PBS 投与群の肝臓を HE 染色法によって解析した。

(C) AIM 投与群の内 HCC が発達した個体 (#2) の HCC 部位を、免疫組織化学法を用いて解析した。その結果、AIM 投与群#2 の HCC 部位に AIM の集積が認められなかった。HCC 部位での AIM の免疫染色におけるコントロールとして、DEN によって HCC を発達したマウスに AIM を投与した個体の肝臓を用いた。

面上に集積しなかったことが考えられた。そこで、AIM 投与群においても HCC を形成した個体の肝臓を、抗 AIM 抗体を用いた免疫染色によって解析した。この際、第 3 章において後述する、高頻度に HCC の腫瘍形成を誘導するジエチルニトロソアミン (Diethylnitrosoamine: DEN) を用い、HCC の腫瘍を形成させた *AIM^{-/-}* マウスに対し、rAIM の投与後に採取した肝臓組織を、HCC 細胞表面上への AIM の集積を確認するためのポジティブコントロールとして用いた。その結果、AIM 投与群の内、HCC の形成が認められた個体において、AIM の投与を行ったにも関わらず、HCC 部位への AIM の集積は認められなかった (図 34. C)。このことから、AIM 投与群においても、HCC の腫瘍形成が確認された原因として、投与した AIM が、十分に到達しなかったために、一部 HCC 細胞に対して AIM の細胞表面への集積による細胞障害が誘導されなかったのではないかと推察された。

2-4. AIM は補体系を介した HCC 特異的な細胞障害を誘導する

これまでの結果から、HCC 細胞表面上に AIM が集積すると、6 時間後には細胞障害が観察され、ネクロシスが誘導されることを証明した。そこで、このように迅速なネクロシスを引き起こす機構として、補体系に着目した。補体系は、自然免疫の一つであり、病原体に対する防御機構である。補体系の活性化経路には、抗体依存的な古典経路や、病原体の細胞表面に存在するマンノースを認識するレクチン経路、C3 が加水分解を受けることで生じる第二経路が存在する。これらの補体系活性化経路は、活性化の発端は異なるものの、C3 が活性化され、最終的に細胞膜上に MAC が形成されることで、病原体に細胞障害を誘導する経路は共通している。そこで、AIM が HCC 細胞の細胞表面上に集積した際に、補体系活性化経路において、中心的な因子である C3 の局在を検討した。iMB-AIM/ Hepa1.6 を移植した *AIM*^{-/-} マウスの肝臓を用い、抗 C3 抗体を使用した免疫染色によって解析した。その結果、Dox 投与 2 時間後において、細胞表面上に C3 の蓄積を確認した (図 35)。同様に、補体依存性細胞障害の実行因子である MAC (C5b-C9) について、抗 MAC 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、C3 と同様に、HCC コロニーにおいて、MAC の染色像を確認した (図 35)。これらの結果から、細胞表面上への AIM の集積による HCC 細胞へのネクロシスの誘導には、補体系の関与が示唆された。さらに、HCC 細胞の細胞表面上に AIM が集積することによって、HCC 細胞にネクロシスが誘導される機構において、補体系が関与していることを確かめるために、C3 欠損 (*C3*^{-/-}) マウスを用いた解析を行った。*C3*^{-/-} マウスは、生体内に AIM を有するが、C3 が欠損している。そこで、もしも AIM によるネクロシスの誘導において、補体系が関与しているならば、*C3*^{-/-} マウスにおいては、細胞表面上に AIM が集積しても、ネクロシスは誘導されないことが想定された。Hepa1.6 と MB-AIM/ Hepa1.6 を 5×10^5 cells ずつ *AIM*^{-/-} マウスまたは *C3*^{-/-} マウスの肝臓に移植し、1 週間後の MB-AIM/ Hepa1.6 由来がん細胞の生着率をフローサイトメトリー

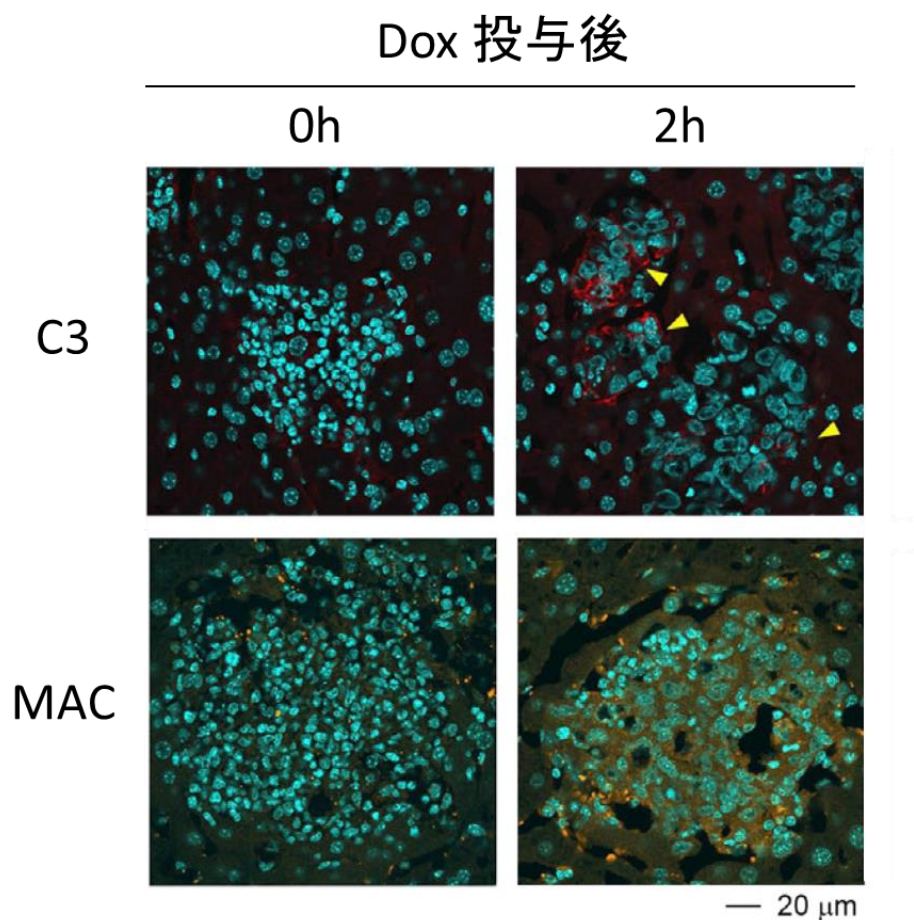


図 35. Dox 投与後の iMB-AIM/ Hepa1.6 由来コロニーにおいて、C3 および MAC 陽性細胞が存在する

AIM^{-/-} マウスに iMB-AIM/ Hepa1.6 を 1×10^6 cells 用い、腸間膜静脈からの移植を行った。1 週間後、Dox を 5 mg/kg で投与し、継時的にサンプリングを行った。免疫組織化学法を用いて C3、MAC の局在を確かめたところ、Dox 投与後 2 時間の時点でコロニー内に C3（赤）および MAC（オレンジ）の局在を確認した。

および免疫染色法を用いて解析した。その結果、*C3*^{-/-} マウスでは *AIM*^{-/-} マウスと比較して AIM 陽性、つまり MB-AIM/ Hepa1.6 由来がん細胞の生着率が高いことを確認した (図 36)。

また、高脂肪食を 1.5 年 (75 週間) 負荷した *AIM*^{+/+} マウスにおいて、*AIM*^{-/-} マウスと比較すると頻度や数は低いものの、HCC の形成を確認した。これらの肝臓組織を、*rab2* と抗 C3 抗体を使用した免疫染色によって解析したところ、HCC 部位において、内在性の AIM と C3 が共に集積しているエリアを確認した。興味深いことに、AIM と C3 が陽性である細胞においては、核膜や細胞自体の歪みが観察され、細胞障害を受けていることが示唆された。(図 37. 白矢印)。一方、AIM の集積が見られない細胞では核膜、細胞等の歪みなどの形態変化は確認できなかった (図 37. 赤矢印)。

これらのことから、HCC 細胞表面上への AIM の集積によって補体系第二経路が活性化され、HCC 細胞特異的に細胞障害をきたすため、HCC の発達を抑制することが考えられた。

さらに、AIM の集積による、補体系第二経路の活性化の機序について検討した。まず、AIM による直接的な C3 の活性化作用について検討するため、Complement System Alternative Pathway Kit (Wieslab AB) を用い、ヒト血清中の AIM が C3 の活性化を誘導するかを、LPS をポジティブコントロールとして確認した [74, 75]。その結果、ヒト血清中 AIM は、C3 の活性化を直接的に誘導しないことが明らかになった (図 38. A)。また、iMB-AIM/ Hepa1.6 を用い、細胞表面上 AIM の有無によって細胞死が誘導されるか、つまり AIM によって直接的に細胞死が誘導されていないかを、死細胞の核酸を染色する色素である Propidium Iodide (PI) を用いて染色し、フローサイトメトリーによって解析した。その結果、Dox 添加による AIM の発現の有無に関わらず、PI 陽性細胞数に変化はなかった (図 38. B)。これらのことから、AIM 自体には、直接的な補体系活性化作用も、細胞死誘導作用もないこと

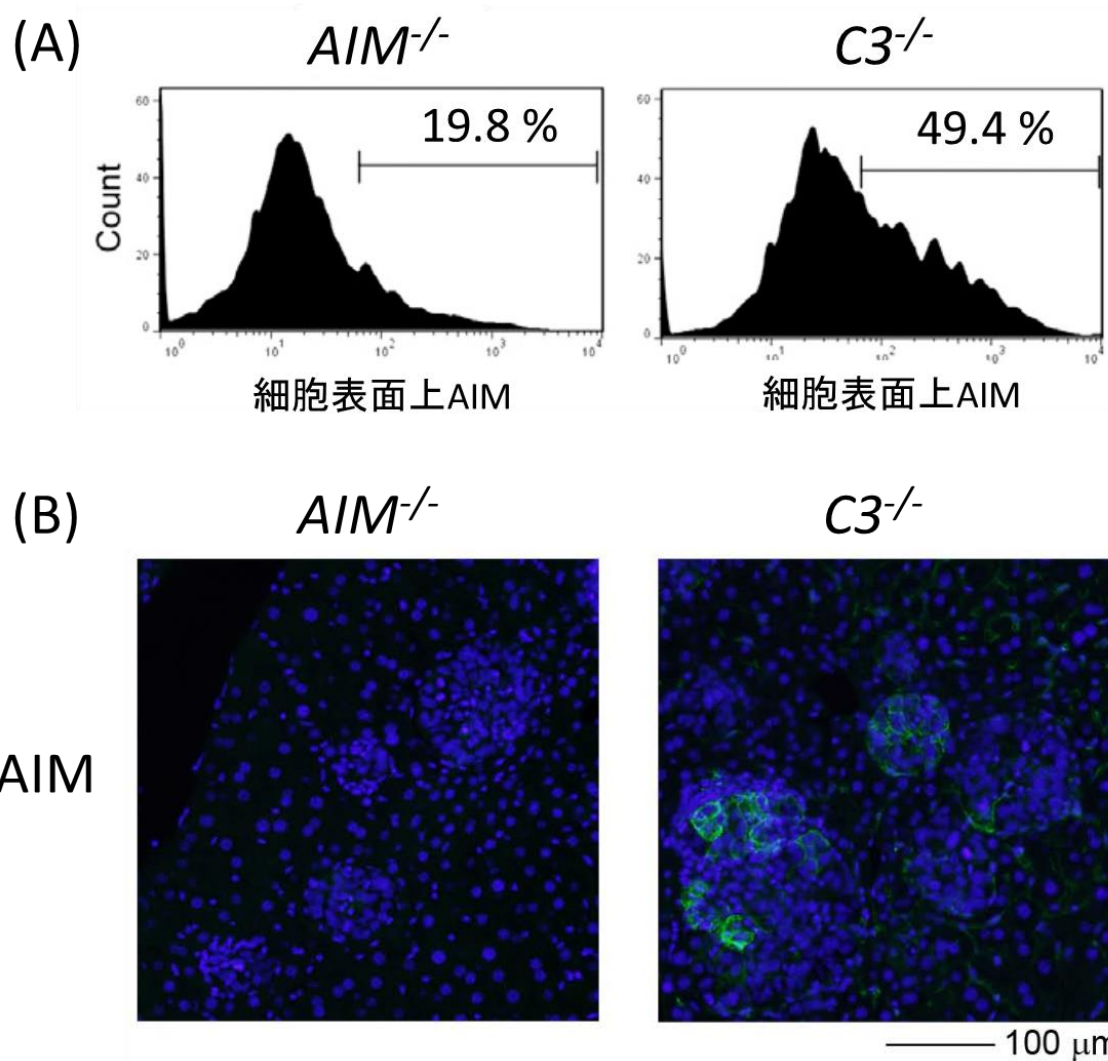


図 36. *C3*^{-/-} マウス肝臓では MB-AIM/ Hepa1.6 の生着率が著しく増加する

Hepa1.6 および MB-AIM/ Hepa1.6 を 5×10^5 cells ずつ、等量を用い腸間膜静脈から *AIM*^{-/-} マウスまたは *C3*^{-/-} マウスの肝臓に移植した。移植 1 週間後、サンプリングし、免疫組織化学法を用いて AIM 陰性コロニーと陽性コロニーをそれぞれ計測した。その結果、*C3*^{-/-} マウスでは *AIM*^{-/-} マウスと比較して AIM 陽性細胞数が多く、肝臓への MB-AIM/ Hepa1.6 の生着率が著しく増加することを確認した。

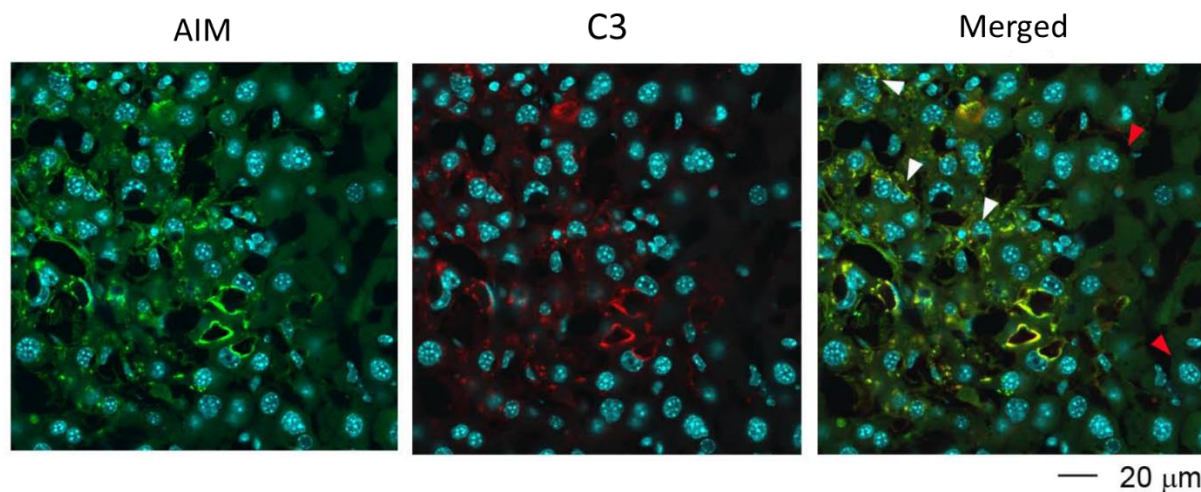


図 37. 高脂肪食負荷 1.5 年後の *AIM*^{+/+} マウス肝臓において発達した HCC の細胞表面上に AIM、C3 が局在する

高脂肪食負荷 1.5 年後の *AIM*^{+/+} マウスにおいて発達した HCC を免疫組織化学法によって AIM と C3 の染色を行った。その結果、HCC 部位において AIM および C3 陽性細胞を確認した。さらに、AIM および C3 陽性細胞（白矢印）は核が歪んでいるが、AIM および C3 陰性細胞（赤矢印）の核は正常であった。このことから、AIM および C3 陽性細胞は細胞障害を受けていると考えられる。（AIM：緑、C3：赤）

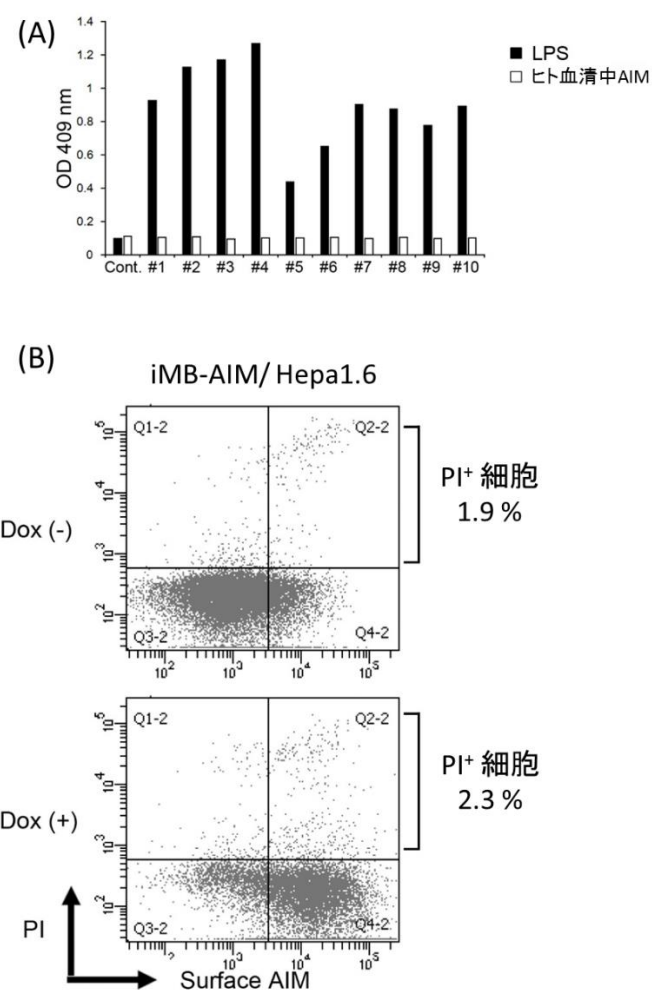


図 38. AIM は直接的な補体系活性化作用をもたない

(A) ヒト血清 (#1-10) を用いて、AIM によって補体系が活性化するかを Complement System Alternative Pathway Kit (Wieslab AB) によって解析した。ポジティブコントロールとして AIM の代わりに LPS を用いた。その結果、AIM は直接的な補体系活性化作用をもたないことが明らかになった。

(B) in vitro において iMB-AIM/ Hepa1.6 に Dox を添加し、16 時間後にフローサイトメトリーによって解析した。その結果、Dox 添加によって AIM の発現が上昇するが、PI 陽性細胞は増加しなかった。

が明らかになった。

補体系は元来、病原体などの非自己細胞を認識し、非自己細胞特異的に細胞障害を引き起こす防御システムである。その仕組みの中で、自己細胞が、誤って補体系からの攻撃を受けないように、自己細胞表面上において、補体系の活性化を制御する RCA が存在している。HCC 細胞は、自己細胞であるため、通常は、補体系からの攻撃は受けないが、RCA を阻害することによって、がん細胞に補体依存性細胞障害を誘導することが報告されている [76-78]。以上を踏まえて、AIM は、HCC 細胞表面上に集積することによって、RCA の働きを阻害し、HCC 細胞への補体系のアプローチを可能にしているのではないかと考えた。そこで、C3 の活性化を阻害する RCA (CD55、Crry、Complement factor H: CFH) または MAC 形成を阻害する RCA (CD59) と AIM との相互作用について、免疫沈降法を用いて検討した。その結果、それぞれの RCA と AIM の結合が認められ (図 39)、AIM と RCA の結合によって、RCA が阻害され、HCC 細胞特異的に CDC を誘導することが示唆された。

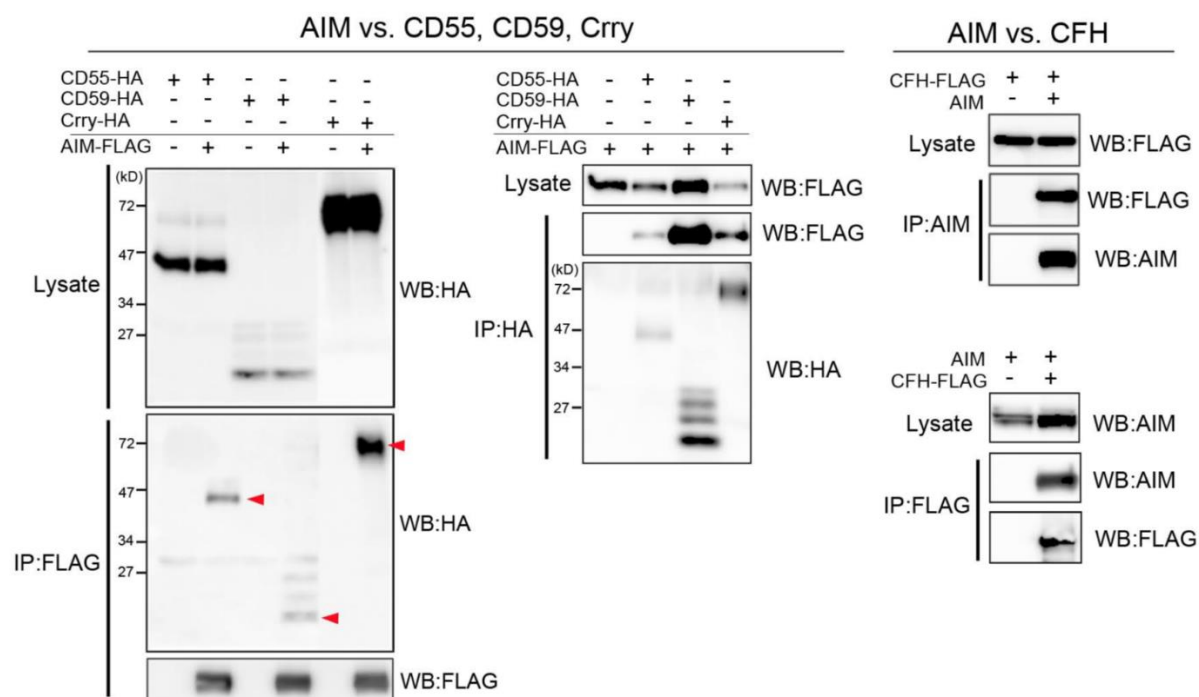


図 39. AIM は RCAs と結合する

HEK293T 細胞を用いて AIM と各種 RCA をそれぞれ産生した。抗 Flag タグ抗体、抗 HA タグ抗体、抗 AIM 抗体を使用し、免疫沈降法で AIM と RCA の結合を解析した（HA タグ：CD55、CD59、Crry、Flag タグ：CFH、AIM）。その結果、AIM は RCA と結合することを確認した。

第3章 高脂肪食負荷以外の原因に由来する HCC に対する AIM の抗がん作用

HCC の原因は、肥満および脂肪肝に伴う NASH 以外にも、肝炎ウイルスへの感染や発がん性のある毒素への暴露など、多岐にわたる。そこで、AIM の HCC 抑制作用は、高脂肪食負荷以外の HCC 発症モデルにおいても、効果があるかを確かめるため、DEN による高頻度の HCC 誘発モデルを用いて解析することにした [79]。

3-1. AIM は DEN 由来の HCC に対しても有効である

まず、*AIM*^{-/-} マウスとその同腹子である *AIM*^{+/+} マウス、または *AIM*^{+/+} マウスに対し、生後 2 週間目に DEN の投与を行った。4 カ月齢、6 カ月齢、9 カ月齢において、HCC の発生率を解析した。通常、DEN によって HCC の発生を認めるのは 8-9 カ月齢であるとされているが、*AIM*^{-/-} マウスにおいては、それよりも早い時期から、HCC を確認できるのではないかと考えた。

実際に、4 カ月齢、6 カ月齢の時点で、*AIM*^{-/-} マウスにおいて、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスと比較して、顕著な HCC の形成が観察された (図 40)。特に 4 カ月齢においては、*AIM*^{-/-} マウスにおいてのみ、HCC の形成を確認した (図 41)。

また、9 カ月齢の DEN 投与マウスにおいて、HCC の数自体は、*AIM*^{-/-} マウスと、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{+/+} マウスで同程度であったが、HCC の大きさに関しては、*AIM*^{-/-} マウスにおいて亢進していることを確認した (図 40、41. A)。

次に、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスにおいて、DEN の投与によって発生した HCC の性質を比較した。*AFP* の遺伝子発現を、リアルタイム PCR によって解析した結果、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスの HCC は、同様な遺伝子発現レベルを示した。よって、これらの HCC は同じ特徴をもった集団であると考えられた (図 42. B)。さらに、DEN の投与によって誘導された HCC においても、AIM が細胞表面上に集積することを確認した。DEN 投与後 9 カ月齢の *AIM*^{-/-} マウスに AIM を投与したところ、高脂肪食負荷によって生じた HCC と同様に、細胞表面上

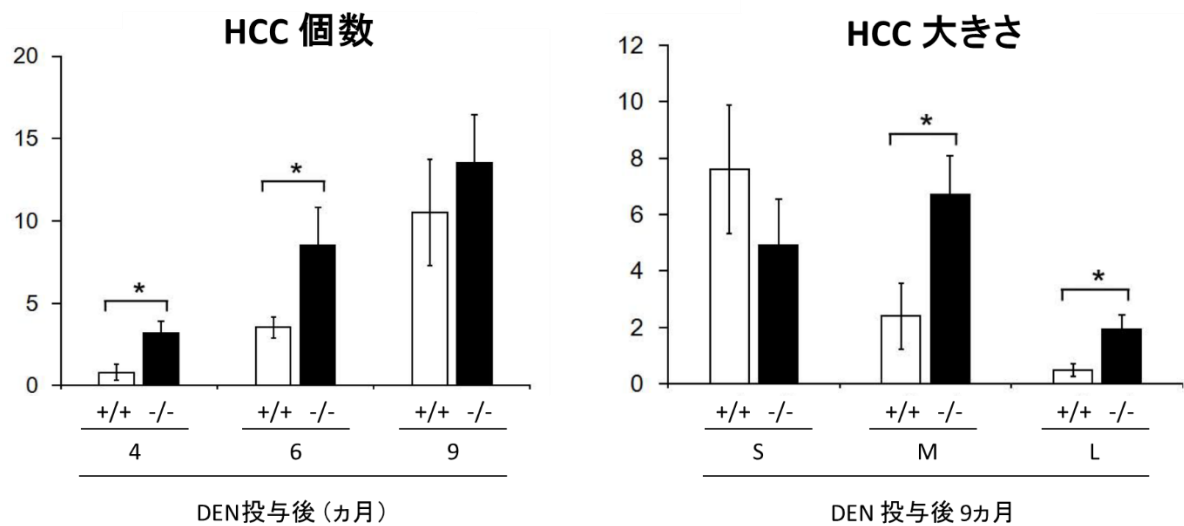


図 40. DEN の投与による HCC の形成は、*AIM^{-/-}* マウスにおいて亢進する

DEN 投与マウスの 4 ヶ月齢および 6 ヶ月後齢では *AIM^{-/-}* マウスにおいて HCC の発生数が増加していた。一方、9 ヶ月齢では HCC の発生数に差は認められなかったものの、HCC の大きさは *AIM^{-/-}* マウスの方が亢進していた。

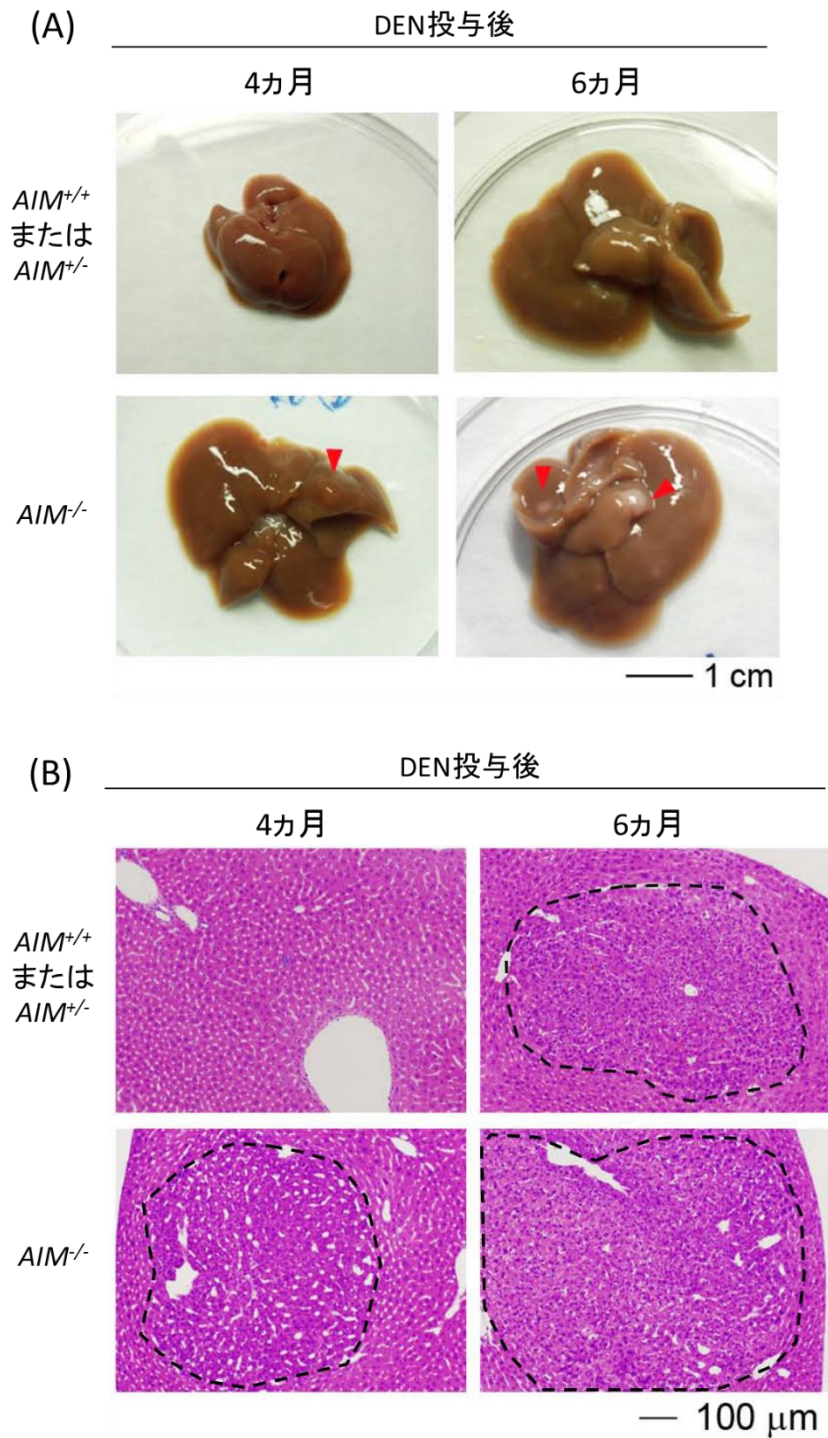


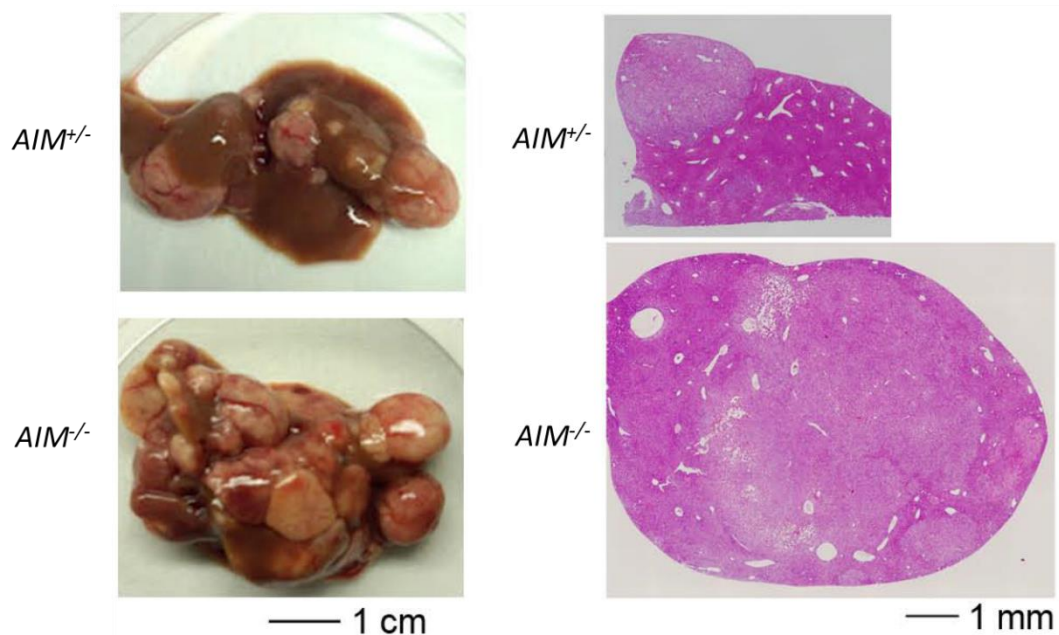
図 41. DEN 投与マウス 4 ヶ月齢および 6 ヶ月齢における HCC の解析

(A) DEN 投与マウス 4 ヶ月齢および 6 ヶ月齢の肝臓を撮影した。その結果、*AIM*^{-/-} マウスにおいて、HCC の形成が亢進していることを確認した。

(B) DEN 投与マウス 4 ヶ月齢、6 ヶ月齢の肝臓を HE 染色法によって解析した。その結果、*AIM*^{-/-} マウスにおいて顕著な HCC の形成を確認した。

(A)

DEN投与後9ヵ月



(B)

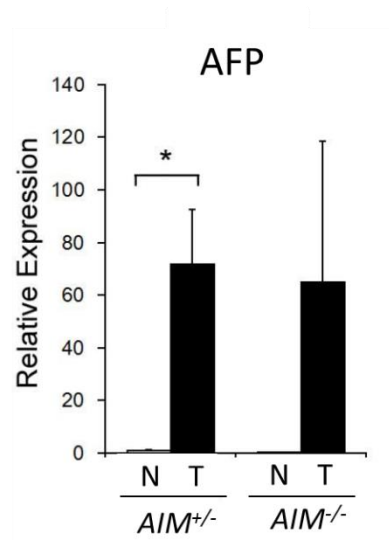


図 42. DEN 投与マウス 9 ヶ月齢における HCC の解析

(A) DEN 投与マウス 9 ヶ月齢の肝臓を撮影し、HE 染色法によって解析した。その結果、*AIM*^{-/-} マウスにおいて顕著な HCC の亢進を確認した。

(B) DEN 投与マウス 9 ヶ月齢の肝臓の非がん部位 (N)、がん部位 (T) での AFP の遺伝子発現を確認した。その結果、がん部位において AFP の発現亢進を確認した。

に AIM の集積を確認した (図 43)。

以上の結果から、高脂肪食負荷と同様に、DEN によって誘導された HCC の細胞表面上においても、AIM の集積が認められ、また、*AIM^{+/+}* マウスと比較して、*AIM^{-/-}* マウスにおいて HCC の形成が亢進することが示された。しかし、DEN 誘導性 HCC モデルと、高脂肪食負荷による HCC モデルを比較すると、高脂肪食負荷モデルにおいて、AIM による抗がん作用がより顕著に認められた。この原因を検討するために、それぞれの血中 AIM 値を解析したところ、高脂肪食負荷によって、血中 AIM 値がより高い値であることが明らかになり、DEN 誘導性 HCC においては、HCC を完全に排除できるほどの AIM が不足していたと考えられた (図 44)。

以上の結果から、AIM は高脂肪食負荷による HCC 以外の HCC に対してもその抑制能を持つことが明らかになり、血中 AIM 値が高い程、AIM による抗がん作用も高くなることが示唆された。

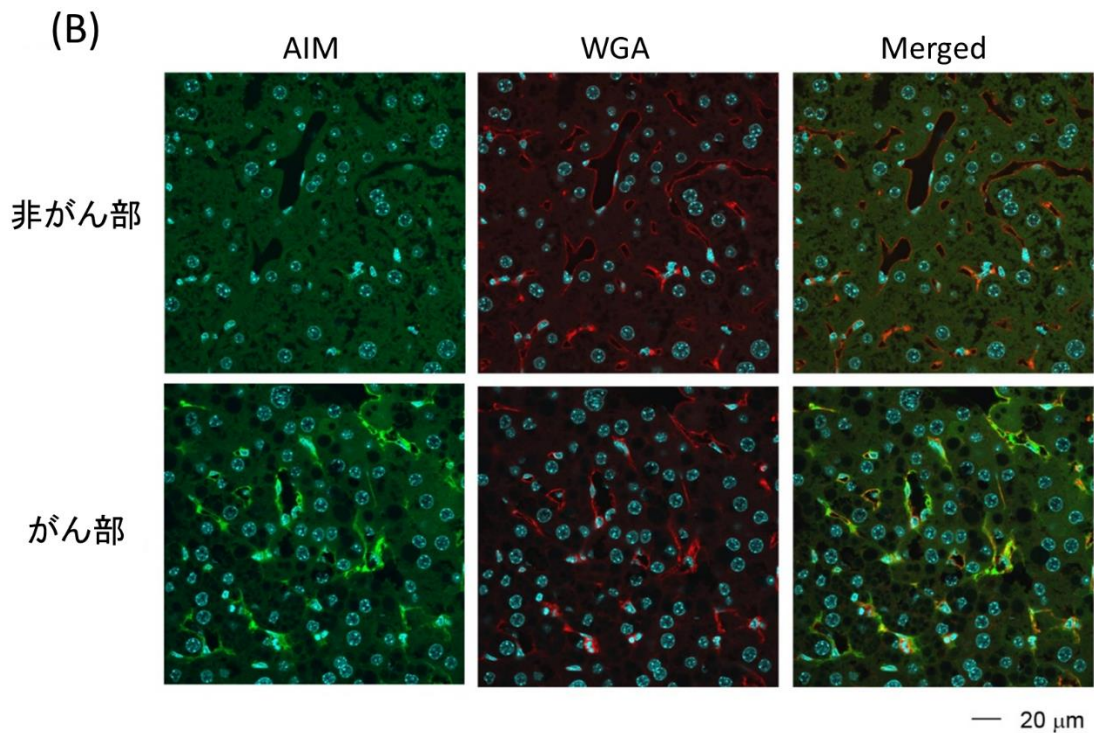
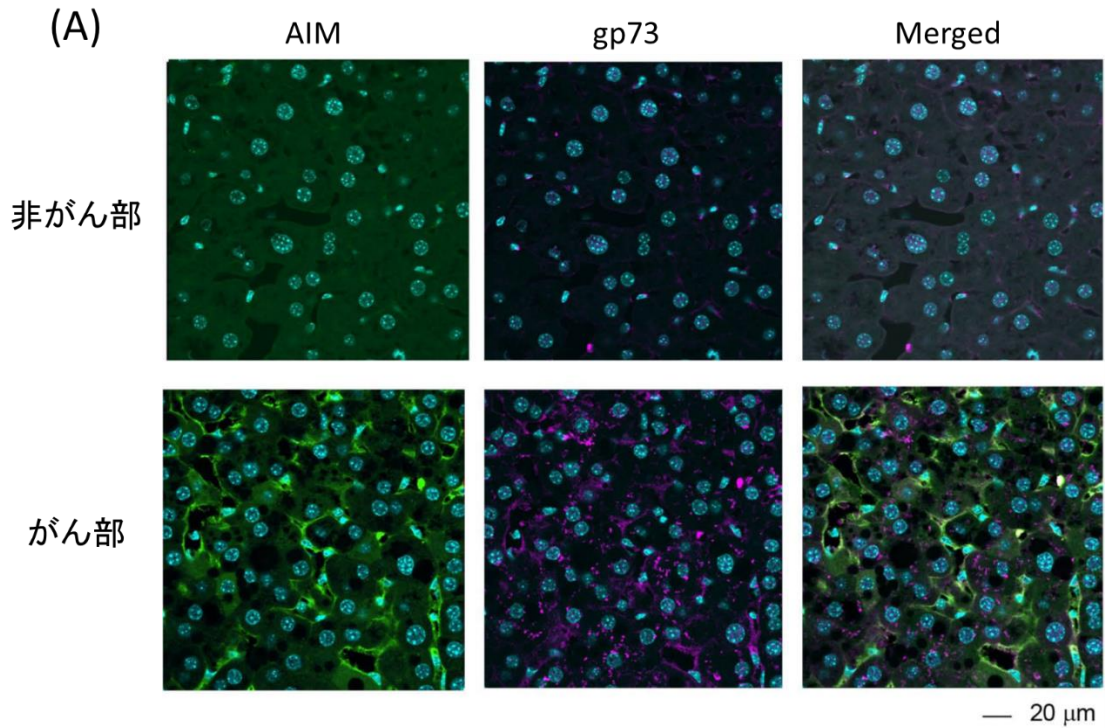


図 43. DEN 投与マウス 9 ヶ月齢の HCC においても AIM の細胞表面上に集積する

(A) DEN 投与 *AIM*^{-/-} マウス 9 ヶ月齢に腸間膜静脈から AIM を 500 μ g 投与し、4 時間後にサンプルを採集した。免疫組織化学法によって AIM、gp73 について解析した。その結果、HCC 細胞表面上に AIM の集積を認めた。

(B) DEN 投与 *AIM*^{-/-} マウスに腸間膜静脈から AIM を 500 μ g 投与して 4 時間後の

肝臓サンプルを、WGA（wheat germ agglutinin: 小麦胚細胞凝集素）を用いて、免疫組織化学法によって解析したところ、がん部位で WGA と AIM の共局在を確認した。

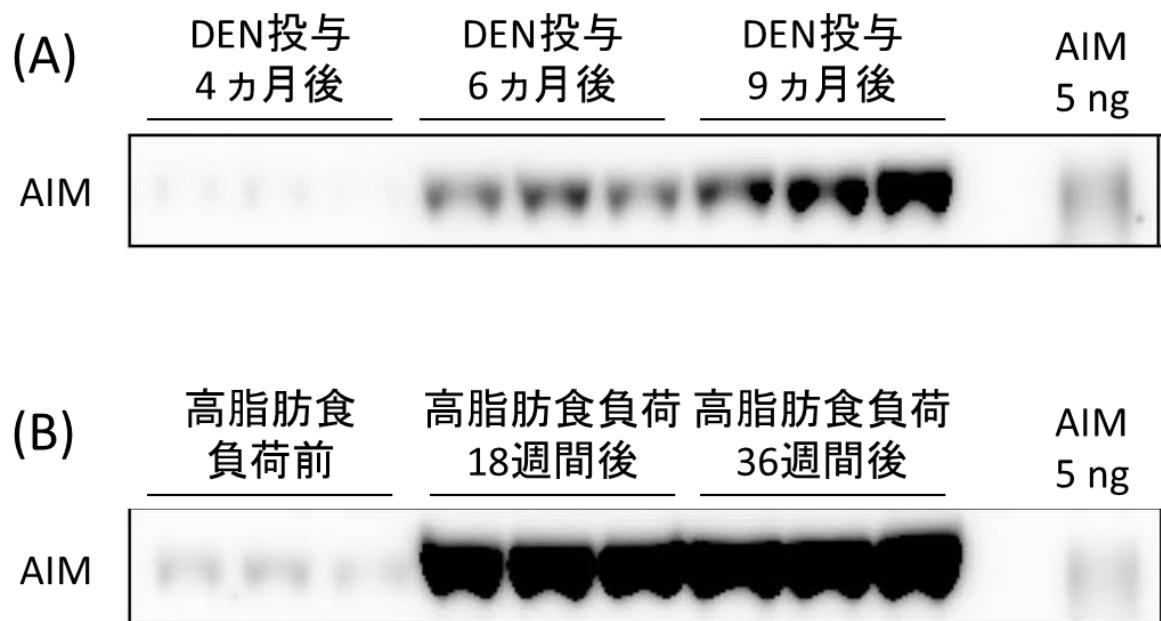


図 44. DEN 投与 *AIM*^{+/+} マウスの血中 AIM 値は高脂肪食負荷 *AIM*^{+/+} マウスの血中 AIM 値と比較して低濃度である

DEN 投与 *AIM*^{+/+} マウスおよび高脂肪食負荷 *AIM*^{+/+} マウスの血清中 AIM 値をイムノブロット法によって解析した。各マウスの血清は 0.5 μ l/well の条件でアプライした。

(A) DEN 投与 *AIM*^{+/+} マウスの血中 AIM 値をイムノブロット法によって解析した。

(B) 高脂肪食負荷 *AIM*^{+/+} マウスの血中 AIM 値をイムノブロット法によって解析した。

***AIM*^{+/+} マウスの肝臓では AIM によって補体系を介した HCC への細胞障害が誘導された結果、HCC の発達が抑制される**

本研究では、これまでに、メタボリックシンドロームの病態基盤と深く関係があることを報告されてきた、AIM について、新たな知見を得るべく、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型である、NAFLD に着目し、研究に取り組んだ。その結果、AIM は、FASN の機能阻害による脂肪肝抑制能、および補体系を介した HCC 抑制能を有することが明らかになった。AIM による HCC 抑制能において、AIM は HCC の発生過程ではなく、AIM が HCC 細胞のエンドサイトーシス不良によって、特異的に細胞表面上に集積し、HCC 細胞表面上の RCA と結合することでその機能を阻害し、HCC 細胞への CDC を誘導すると考えられた (図 45)。

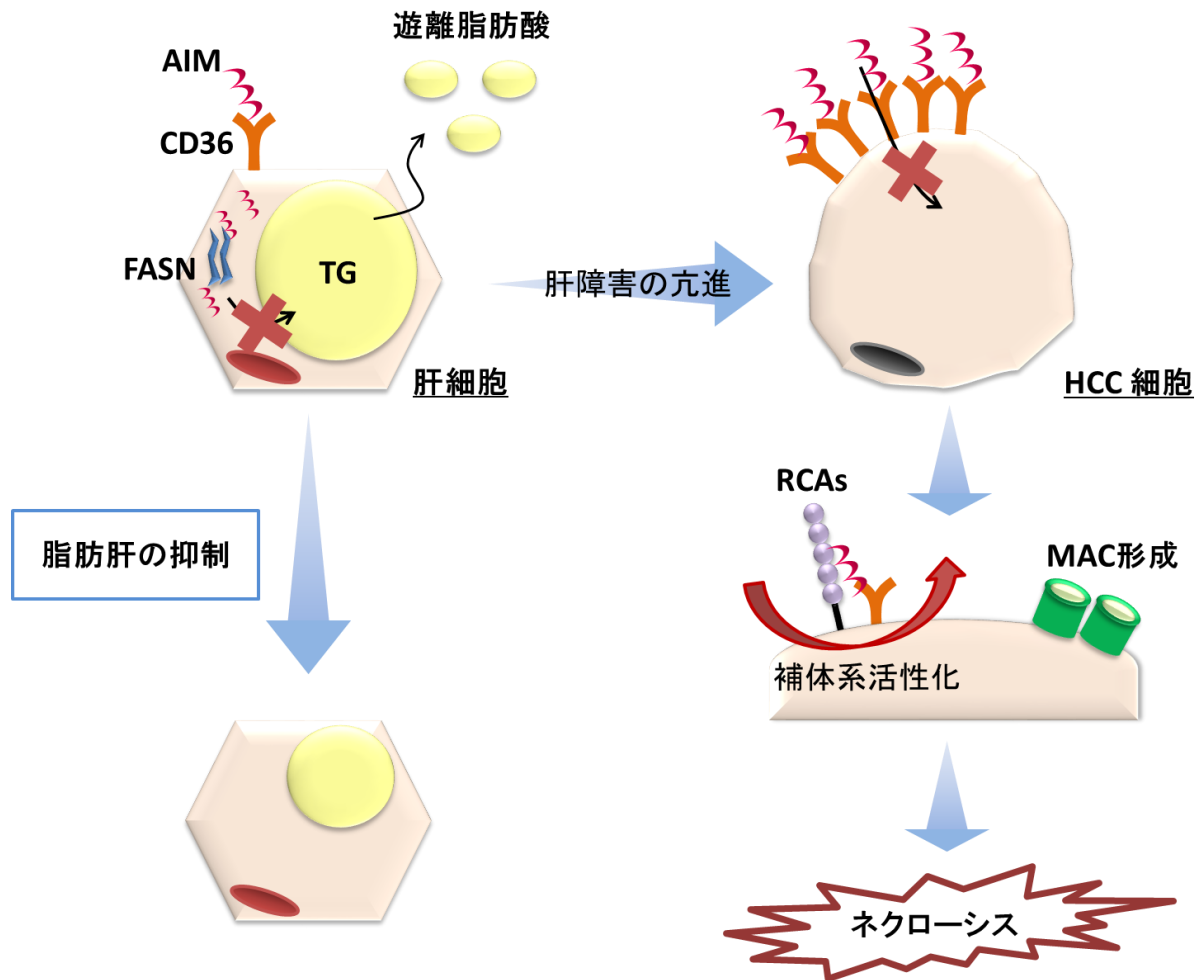


図 45. 本研究のまとめ

肝細胞において、AIM は脂肪細胞と同様に、細胞内に取り込まれ、FASN の機能を阻害することによって、脂肪融解を促進し、脂肪肝を抑制することが明らかになった。一方、脂質蓄積や発がん性物質などを原因とする肝障害の亢進によって、がん化した肝細胞（HCC 細胞）においては、がん化に伴うエンドサイトーシス不良によって、AIM は細胞内に取り込まれず、細胞表面上に集積する。細胞表面上に集積した AIM は、細胞表面上の RCAs と結合することで、その機能を阻害し、HCC 細胞への補体系の活性化、MAC 形成を誘導し、HCC 細胞特異的なネクローシスを引き起こす。

【考察】

本研究成果より、肝臓において、AIM は HCC に対し抗がん作用を有することが明らかになった。さらに、AIM による HCC 抑制メカニズムとして、補体系の活性化を介した機構の存在が示唆された。AIM による HCC 排除作用を利用し、AIM を用いた新しい治療法の開発を実現するために、今後の詳細な検討が必要であると考ええる。

I. NAFLD および NASH 病態によって誘発される HCC の発生メカニズム解明における *AIM*^{-/-} マウスの有用性

本研究成果から、NASH の病態背景と知られている細胞内ストレス、炎症、線維化が同等であっても、AIM の欠損によって HCC の腫瘍形成が起こることが明らかになった。また、本研究において、NASH 様病態に起因する HCC モデルの作製には、高脂肪食の負荷のみを用いた。先行文献において、高脂肪食の負荷のみで HCC を発生する動物モデルは存在していなかった。これは、内因性の AIM によって、発生した HCC が除去されることに起因していると考えられる。近年の臨床報告では、NAFLD/ NASH 患者において、線維化、肝硬変を伴わずに HCC を亢進する症例が報告されている [14-20]。このような、肝線維化に依存しない肝細胞のがん化メカニズムの解明、つまり *AIM*^{-/-} マウスは、NAFLD による HCC 発生のメカニズムを明らかにする上で、*AIM*^{-/-} マウスは、非常に有用なモデル動物となることが考えられる。

II. AIM の抗がん作用における補体依存性細胞障害の活性化メカニズム

本研究では HCC 細胞の細胞表面上に AIM が集積することを明らかにし、RCA の働きを阻害することで HCC 細胞特異的に CDC を誘導することを示唆するデータを

得た。しかし、AIM がどのようにして RCA の機能を阻害するかは未だ明確ではない。この疑問を解決するための検討として、RCA における AIM の結合部位を同定することが考えられる。RCA は、それぞれに Short consensus repeat (SCR) ドメインを複数個持っており、細胞や補体因子への結合能を持つドメインや、活性型となった補体因子の不活性化を担うドメイン、現在のところ機能を持たないとされているドメインが存在している。これらのどのドメインに対し、AIM が作用するかを確かめるために、HEK293T などの細胞に、AIM と各ドメインを産生する安定発現細胞株を作製し、共免疫沈降によって相互作用を解析すべきであると考ええる。RCA における、AIM の結合部位が判明した後、AIM が結合しないように結合部位に変異を入れた RCA を、安定に発現する細胞株を、Hepa1.6 を用いて作製する。作製した安定発現細胞株を、腸間膜静脈からマウス肝臓に移植し、マウス肝臓内における生着率や、補体系の活性化について検証することによって、AIM の抗がん作用における RCA の機能阻害の重要性が検討できると考える。

また、本研究においては、HCC 細胞の細胞表面上に集積した AIM が、RCA の機能を阻害することにより、HCC 細胞特異的に補体系第二経路の活性化を誘導することが示唆された。しかし、RCA の機能阻害以外にも、AIM による補体系活性化機序が存在する可能性があると考えている。

まず、AIM と LPS が結合するという報告 [36] を踏まえると、HCC 細胞表面上に結合した AIM が、小腸から肝臓に流入した LPS と結合し、LPS を認識して補体系の活性化が誘導される可能性も考えられる。AIM による LPS を介した補体系活性化の有無は、LPS を検出できる全ての微生物を体内、体外に持たない無菌マウスに、MB-AIM/ Hepa1.6 もしくは iMB-AIM/ Hepa1.6 の移植を行い、通常飼育のマウスと比較して、移植した細胞の生着または細胞障害の程度に差がないかを検証することで明らかになると考えられる。

さらに、図 25、26 で示したように、HCC 細胞表面上に AIM と IgM の共局在を

確認したことから考えると、C1q と IgM の結合をきっかけとして誘導される抗体依存性の補体系活性化（古典経路）も AIM によって誘導される可能性が示唆される。AIM は血中において IgM と結合し、安定化しているため、内因性の AIM による補体系活性化は、古典経路の活性化を介する可能性があると考えられる。

このように、AIM の HCC 細胞表面上への集積をきっかけとして、AIM による RCA の機能阻害以外にも、様々な補体経路が活性化されることにより、HCC に対する細胞障害が増強される可能性も考えられる。

III. HCC 治療における AIM 投与の実用性

本研究では、AIM の抗がん作用を明らかにし、AIM を用いた HCC の新規治療法開発の基盤となることを目的とし、研究に取り組み、図 8 で示すように、高脂肪食を負荷した AIM^{hi} マウスに対する長期間の AIM 投与によって、HCC の発達を抑制できることを確認した。しかし、AIM を投与した#1-5 のマウスにおいて、血中 AIM 値に個体間でばらつきがあり、血中 AIM 値が高いほど HCC を形成しにくいことが明らかになった。HCC を抑制するためには、AIM の投与によって、血中 AIM 値を高濃度に保つことが必要であると考えられるが、同様の AIM 投与を行ったにも関わらず、なぜ血中 AIM 値にばらつきが生じるのかを考察した。

ひとつの要因として、血中 AIM 値は血中 IgM 値と相関があること [41, 42] が関係していると考えられる。実際、各マウスの血中 AIM 値は、血中 IgM 値に比例しており、過剰量の AIM を投与しても、その血中濃度は IgM 値に依存するため、IgM 値が低い個体において、AIM 値の保持および上昇が抑制された可能性がある。なぜ IgM 値に差があったのかについては明確ではないが、おそらく AIM による脂肪融解にその一因があると推測される。脂肪融解によって、血中に放出された遊離脂肪酸は、B 細胞に作用し、IgM の産生を増加させる。IgM の増加は AIM の安定化につながり、血中 AIM 値も上昇することが考えられる。血中 AIM 値の高い個体

においては、上記の過程を通して IgM の産生が上昇し、血中 IgM 値も上昇し、IgM 値の上昇に伴って、投与した AIM をより多く血中に保持することができた結果、血中 AIM 値も上昇したのではないかと考える。さらに、血中 AIM 値の増加は脂肪組織における脂肪融解を促進し、さらなる IgM の産生増強へとつながることが示唆される。以上に述べたような過程によって、血中 AIM 値にばらつきが生じている場合、投与する AIM に対し、血中において IgM の産生量に左右されず、安定化するような工夫をする必要があると考える。

また、図 40 において、高脂肪食負荷 46 週間後の AIM^{-/-} マウスに対し、3 週間継続的に AIM を投与したところ、一部の HCC 発達のみ抑制することを確認した。一方で、図 33-35 で示すように、iMB-AIM/ Hepa1.6 を用いた移植実験の結果から、Dox の投与後、AIM の発現によって、速やかに細胞死が誘導されることを示した。このように、AIM 投与実験、および AIM 発現実験における、HCC 抑制作用の効果の違いは、細胞表面上に集積した AIM の濃度が原因であると考えられる。つまり、iMB-AIM/ Hepa1.6 の移植実験においては、Dox の投与によって、人工的に AIM を細胞表面上に集積することが可能であるが、高脂肪食負荷マウスへの AIM 投与実験においては、HCC 細胞表面上のみに投与した AIM を全て集積させるのは困難である。その理由として、まず、AIM は脂肪組織や、正常な肝細胞などに取り込まれることが挙げられる。このことは、治療実験を始める前から予測できた問題点であったため、マウス生体内において、AIM をより効果的に HCC まで到達させるための方法を考案することが必要であった。そこで本研究においては、腸間膜静脈からの投与法を考案し、実験を行った。その結果、腸間膜静脈からの AIM の投与法は、HCC に高濃度の AIM を集積させるために有効であると、図 28 の検討で確認した。

一方で、HCC は肝動脈から血液を供給されているため、肝動脈を通して AIM を肝臓に送り込む方が、AIM を HCC 部位に対し、より多く集積させることができるのではないかと考えている。マウスを用いた実験においては、技術的に困難である

が、ヒトの治療において AIM を投与する際は、鼠蹊部から肝動脈までカテーテルを挿入し、局所的に抗がん剤を投与する肝動注療法と同様の投与方法を用いた方が、腸間膜静脈からの投与方法を用いるよりも、HCC の治療において、より効果的であると考ええる。

以上の点も踏まえ、HCC 治療に向けて、HCC を除去するために AIM 集積の適した濃度や、投与回数、投与方法詳細に検討することが、効果的な治療プロトコールの基礎作りとして必要であると考えている。

IV. 肝臓以外の臓器におけるがんと AIM による抗がん作用

本研究において、AIM によって様々な原因に起因する HCC の抑制をすることが可能であることを証明した。そこで、次に検討すべきことは、他の臓器でのがんに対し、AIM は抗がん作用を発揮できるかということである。先行研究から、AIM のレセプターの一つとして CD36 が同定されている [11]。つまり、CD36、あるいはその他の AIM のエンドサイトーシスに関わるスカベンジャーレセプターを発現しているがん細胞に対しては、AIM の抗がん作用は期待できる。しかし、補体因子は主に肝細胞において発現していることや、クッパー細胞による AIM 産生の影響などから、他の臓器と比較して、肝臓は AIM 濃度が高く、AIM による抗がん作用を発揮するために、非常に適した臓器であることが考えられる。よって、AIM は、他臓器で発生したがんに対し、抗がん作用を発揮できる可能性はあるが、肝臓以上に AIM の抗がん作用を発揮することが可能な臓器は明確でなく、他の臓器での発がんモデルで AIM の有無による影響を確認することが必要であると考ええる。

【結語】

本研究は、肥満抑制作用を持つ Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) による非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) および非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) 病態への影響を解析し、NAFLD および NASH 病態における新たな知見を得ることを目的として取り組み始めた。NAFLD および NASH の病態モデルとして、*AIM*^{+/+} マウスおよび *AIM*^{-/-} マウスに高脂肪食を負荷し、肥満および脂肪肝を進行させたところ、*AIM*^{-/-} マウスと比較して、*AIM*^{+/+} マウスにおいて、脂肪肝が抑制されることを認めた。これは、脂肪細胞と同様に、肝細胞においても AIM が取り込まれ、細胞内で FASN の機能を阻害することで脂肪融解を促進するためであることが明らかになった。

また、高脂肪食負荷によって、*AIM*^{+/+} マウスの肝臓においては、脂肪肝が亢進するのみであったが、*AIM*^{-/-} マウスの肝臓においては、顕著な HCC の腫瘍形成を認めた。そこで、*AIM*^{-/-} マウスに高脂肪食を負荷しつつ、長期的かつ継続的に AIM を投与することで、HCC の腫瘍形成が抑制されたことから、AIM は HCC 抑制作用を持つことが明らかになり、本研究ではその作用機序を解明することとした。

AIM による HCC 抑制作用機序として、正常な肝細胞においては細胞内に取り込まれる AIM が、HCC 細胞においては、エンドサイトーシス不良によって細胞内に取り込まれず、細胞表面上に集積することによって、HCC 細胞特異的に補体系の活性化を誘導することが明らかになった。また、AIM の細胞表面上集積することによって補体系が活性化される機序としては、AIM が細胞表面上において、RCA と結合し、その機能を阻害することで、HCC 細胞に対する補体系による攻撃を可能にしていることが示唆された。

本研究成果を基に開発される新規 HCC 治療法は、がん治療の次世代の扉を開く新

しいアプローチであると考えており、既存の治療法よりも有効でかつ、負担の少ない治療法の開発につながれば幸いである。

【材料と方法】

試薬、抗体および細胞

試薬類は Wako 社または Sigma 社の製品を使用した。免疫染色法、免疫沈降法他に用いた抗体は以下の通りである。

一次抗体：

抗 F4/80 抗体 (clone: RM2900、Caltag)

抗 AIM 抗体 (rab2、当研究室作製)

抗 α SMA 抗体 (clone: 1A4、SIGMA)

抗 gp73 抗体 (Santa Cruz)

抗 Hep Per 1 抗体 (clone: OCH1E5、Dako)

抗 ki67 抗体 (clone: SP6、Thermo Scientific)

抗 FASN 抗体 (Santa Cruz)

抗 HA-tag 抗体 (clone: 3F10、Roche)

抗 Flag-tag 抗体 (clone: M2、Sigma-Aldrich)

抗 total AKT 抗体 (clone: 11E7, Cell Signaling Technology)

抗 phosphorylated AKT 抗体 (clone: 244F9, Cell Signaling Technology)

抗 total ERK1 抗体 (Cell Signaling)

抗 phosphorylated ERK1/2 抗体 (Cell Signaling)

抗 C3 抗体 (clone: 11H9、Sigma-Aldrich)

抗 MAC 抗体 (Abcam)

二次抗体：

抗 rabbit IgG 抗体 Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)

抗 rabbit IgG 抗体 Alexa Fluor 647 (Molecular Probes)

抗 goat IgG 抗体 Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)

抗 goat IgG 抗体 Alexa Fluor 647 (Molecular Probes)

抗 rat IgG 抗体 Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)

抗 goat IgG 抗体 Alexa Fluor 647 (Molecular Probes)

抗 mouse IgM 抗体 Alexa Fluor 594

WGA Alexa Fluor 594 (Life Technologies)

また、本研究において使用したマウスまたはヒト HCC 細胞株は ATCC より購入した。

動物

AIM^{-/-} マウスの作製は、参考文献の通りであり [3]、*AIM*^{-/-} マウスは、C57BL/6J と 13 代以上戻し交配したものを用いた。また、本研究においては、*AIM*^{+/-} マウスと *AIM*^{-/-} マウス、または *AIM*^{-/-} マウスと *AIM*^{-/-} マウスを交配させて得られた、*AIM*^{+/+} マウス、*AIM*^{-/-} マウスを 8-12 週齢まで飼育したのち、高脂肪食負荷の実験や、HCC 細胞株移植実験に使用した。DEN 投与実験については、生後 2 週間目に、12.5 mg/ kg の条件で、DEN の単回投与を行った。また、*AIM*^{+/+} マウスに関しては、日本クレアより購入する場合もあった。*C3*^{-/-} マウスは the Jackson laboratory から購入した。実験に用いた動物は全て、東京大学動物施設において、特定病原菌不在 (Specific Pathogen Free: SPF) 環境下、12 時間の明暗周期、自由食餌下で飼育した。通常食としては、CE-2 (日本クレア) を、高脂肪食としては High Fat Diet 32 (日本クレア) をそれぞれ、飼料として用いた。本研究における動物実験は、東京大学医学系研究科動物実験審査委員会の承認を受け、同委員会の定める動物実験規則を遵守して行った。

細胞培養

C57BL/6 マウス由来の HCC 細胞株である Hepa1.6、さらに Hepa1.6 の細胞表面

上に恒常的、あるいは Dox 依存的に細胞表面結合型 AIM を発現する MB-AIM/ Hepa1.6、iMB-AIM/ Hepa1.6 は、10 % FBS (Gibco)、0.1 % Gentamicin regent solution (Invitrogen) を含む DMEM (Invitrogen) 培地を用い、37 °C、5 % CO₂ の条件下で培養した。各細胞は、80-90 %コンフルエントになるまで培養後、0.25 % Trypsin-EDTA (Invitrogen) 処理を行って細胞培養ディッシュから剥離し、1:9-2:8 の割合で継代した。また、MB-AIM/ Hepa1.6 と iMB-AIM/ Hepa1.6 については、継代により AIM 発現量が低下するため、継代数 3-4 回までの細胞を実験に使用することとし、使用する前は、抗 AIM 抗体を使用して細胞を染色後、フローサイトメトリーを用いて AIM の発現を確認した。

PCR

AIM の遺伝子型決定には PCR を用いた。サーマルサイクラーは Gen Amp PCR System9700 (Applied Biosystem) を使用した。DNA ポリメラーゼは rTaq polymerase (TaKaRa) を用い、反応溶液の調製は付属のプロトコールに従った。アニーリング温度は、GC%法で計算した各プライマーの T_m 値から決定し、時間は 30 秒とした。伸長温度は 72°C で行った。

In vitro における補体活性化アッセイ

ヒト血清を用いた補体活性化アッセイは、Complement System Alternative Pathway kit (Wieslab) を用いて解析した。10 名の異なるヒトから採集した血清を、LPS (2 µg/well) またはヒト AIM (2 µg/well) をコートした ELISA プレートに、それぞれ添加した。MAC 形成は、kit 付属のアルキルフォスファターゼ結合型抗ヒト MAC 抗体を用いて検出した。

高脂肪食負荷マウスの継時的解析

AIM^{+/+} または *AIM^{-/-}* に、8 週齢から高脂肪食（High Fat Diet 32、日本クレア）を負荷し、6、12、20、45 週間後、または 1 年後に肝臓の採取を行った。摘出した肝臓は巨視的な観察および免疫組織化学法による染色、HE 染色によって、がんの発生率を確認した。

マウス肝臓への HCC 細胞株移植実験

移植実験には 8-12 週齢のマウスを用いた。マウスにアバチンを 500 μ l 投与し、麻酔をかけた。マウスを仰臥位にし、剣状突起から 1.5 cm 程下の腹部の毛を剃り、正中線と直角な方向に 1 cm 程切開した。腹膜も同様に切開し、上腸管を 3 cm 程露出し、腸間膜静脈を確認した。あらかじめ用意していた細胞懸濁液（ 1×10^7 cells/ml、PBS に懸濁）を、1 ml シリンジに 100 μ l 充填し、30 G の注射針を用いて腸間膜静脈から細胞懸濁液を投与した。投与 1 分後に針を抜き、止血後、37 °C に温めた PBS を 1 ml 腹腔内に加え、腹膜および皮膚を縫合した。縫合後は麻酔が覚めるまで、約 37 °C のホットパッド上で体温保持を行った。

マウス肝細胞単離法

マウス肝細胞の単離は、二段階コラゲナーゼ灌流法を用いて行った。マウスにアバチンを用いて麻酔をかけた後、腹腔を十字に切開し、門脈を露出した。門脈に 25 G 注射針を挿入し、灌流バッファー（Hank's balanced salt solution、0.5 mM EGTA、25 mM HEPES）を用いて灌流を行った。さらに、消化バッファー

（Dulbecco's modified Eagle's medium、100 CDU/ml 4 型コラゲナーゼ、50 μ g/ml トリプシンインヒビター、15 mM HEPES）を灌流した。灌流後、肝臓をペトリ皿に採取し、消化バッファーを約 10 ml 加え、パスツールピペットを用いてピペッティングを行った。十分にほぐれた細胞懸濁液を、150 μ m のナイロンフィルターを通して回収した。回収した細胞懸濁液は、消化停止バッファー（Dulbecco's modified

Eagle's medium、10 % FBS) を加えた後、遠心分離 (50 x g, 4 °C, 1 分間) を行った。

マウスの肝臓からのクッパー細胞単離法

マウスの肝臓からクッパー細胞を単離するために、肝細胞単離の遠心によって生じた上清をさらに遠心 (200 x g, 4 °C, 5 分間) を行った。上清を除去した後、消化停止バッファーを加えて、転倒混和した。さらに、これまでに使用した 2 種類の遠心条件を 3 回以上繰り返し、肝細胞を除去した後、抗 F4/80 ビオチン化抗体とストレプトアビジンマイクロビーズで標識し、MACS 細胞分離カラム (Miltenyi Biotec) を用いて単離した。

肝臓採取法

肝臓の採取は解析方法に応じて、灌流固定法または浸出液固定法を用いて行った。組織学的解析を行う場合は灌流固定法を用いて採取した。マウスに 10 U ヘパリン/ PBS を 100 µl/ 10 g の量で投与し、5 分経過後にアバチンで麻酔をかけた。その後、腹部を十字に切開し、肋骨と横隔膜を切開して心臓を露出させ、右心耳を切開し、左心房から灌流を始めた。1 U ヘパリン/ PBS を用いて、5 分間灌流を行った後、4 % パラフォルムアルデヒド/ PBS を用いて、1 時間灌流を行った。摘出した肝臓は、4 % パラフォルムアルデヒド/ PBS に一晩処理し、パラフィン包埋を行った後、パラフィンプロックを作製した。凍結ブロックの作製においては、4 % パラフォルムアルデヒド/ PBS で一晩処理した後、30 %スクロース液を用いて二晩処理した。さらに、Tissue-Tek O.C.T. compound (サクラファインテック株式会社) を用いて包埋し、凍結ブロックを作製した。

組織学的解析以外の解析も行う場合のサンプリングは、パラフィンプロック作製用、凍結ブロック作製用、液体窒素内での急速冷凍の 3 通りを行った。麻酔下にお

いて採血を行った後、腹部を十字に切開し、心臓を露出した。右心耳を切開した後、左心房から 25 G 注射針と 20 ml シリンジを用いて PBS または生理食塩水を 20 ml 灌流して脱血を行った。脱血後、速やかに肝臓を回収し、一部は 4 % PFA/PBS に漬け、一部は 200-500 mg 程度に分けて液体窒素で急速冷凍した。4 % PFA/PBS に一晩漬けたサンプルの一部はパラフィンプロックの作製に使用し、一部は 30 % スクロース液に二晩漬けた後、凍結ブロックの作製に使用した。採集した血液は血清を回収した。

免疫組織化学法／細胞免疫化学染色／FACS

凍結切片を PBS で 2 回洗浄し、Tissue-Tek O.C.T. compound を除去し、G-Block を用いて、湿潤箱内でブロッッキング（室温, 40 分間）を行った。G-Block を 1/50 倍量含む TBS を用いて一次抗体を希釈し、湿潤箱内で、4 °C、一晩反応させた。本研究において用いた一次抗体の希釈率は以下の表の通りである。

表 4. 一次抗体希釈率

一次抗体	希釈率
抗 AIM 抗体 (rab2)	1: 500
抗 F4/80 抗体	1: 200
抗 gp73 抗体	1: 200
抗 Hep Per 1 抗体	1: 200
抗 C3 抗体	1: 200
抗 MAC 抗体	1: 200

一次抗体反応後、TBST を用いて 3 回洗浄し、G-Block を 1/50 倍量含む TBST を用

いて二次抗体を希釈し、湿潤箱内で、室温、遮光の条件で 1 時間反応させた。本研究において使用した二次抗体の希釈率は全て 1 : 500 で使用した。二次抗体反応後、TBST で 3 回洗浄し、1 μ g/ ml の Hoechst33258 (Sigma) を用いて、室温、3 分間の条件で核染色を行った。その後、TBST を用いて 3 回洗浄し、退職防止剤含有水系封入剤 ProlongGold (Invitrogen) を用いて封入し、封入剤が乾燥した後、マニキュアでカバーガラスの周囲をコーティングした。観察には蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡を使用した。

TUNEL 染色

凍結切片の O.C.T. Compound を洗浄し、付属のプロトコールに従って染色を行った。染色後、ProLong Gold を用いて封入し、共焦点顕微鏡で観察を行った。

Hematoxylin-Eosin (HE) 染色法

パラフィン切片は、脱パラフィン操作 (100 % Xylene 10 分 2 槽、100 % エタノール 10 分 2 槽、90 % エタノール 5 分 1 槽、80 % エタノール 5 分 1 槽、70 % エタノール 5 分 1 槽) を行った。脱パラフィン操作を行ったパラフィン切片、あるいは凍結切片を、PBS で 2 回洗浄し、エタノールもしくは Tissue-Tek O.C.T. compound を除去した。milliQ に通した後、Hematoxylin (武藤化学) を用い、パラフィン切片は 5 分間、凍結切片は 10 分間の条件でそれぞれ染色した。

Hematoxylin による染色の後、流水で 15 分間洗浄、100 % エタノールで 2 回洗浄し、Eosin (Sigma) を用いて、1 分間染色を行った。Eosin による染色の後、100 % エタノールを用いて、脱色を行った。適度な染色像が確認できた後、100 % キシレンに 2 回槽を変えて置換し、脱水操作を行った。脱水後、Malinol (武藤化学) を用いて封入し、観察した。

マウス肝細胞における FASN 活性の測定

マウスの肝細胞、または肝臓からライセートを回収し、酵素源とした。測定用キュベット（容量 1ml、光路長 1cm）中において、ライセートと FASN 酵素活性測定溶液（0.2 M リン酸化カリウム、0.3 mM NADPH、0.05 M アセチル CoA、pH 7.0）を混和し、30 °C に保温した恒温ホルダーに、測定用キュベットを設置し、340 nm の波長でブランク反応を追跡測定した。内在性基質による NADPH 消費の影響を除外するために、OD340 値の減少率が一定になるまで測定を続け、減少率が一定になったことを確認後、0.2 mM マロニル CoA を 0.02 ml 添加し、FASN 酵素反応を開始した。OD340 値の減少率が一定になったことを確認し、FASN 酵素活性を測定した。FASN 酵素活性の算出に必要な NADPH の分子吸光係数は、NADPH 分子吸光度係数：6220 M⁻¹cm⁻¹を用いた。

イムノブロット法

マウスの血清、またはマウスの肝臓から抽出したタンパク質（ライセート）を、イムノブロット法によって解析した。血清および肝臓ライセートに、2x サンプルバッファー（125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 20 % グリセロール, 0.004 % ブロモフェノールブルー, 10 % 2-メルカプトエタノール）または 1x サンプルバッファーを加え、97 °C、15 分間の条件で還元した。血清は 0.5-1 µl、肝臓から抽出したタンパク質は 100-200 µg を用い、e-PAGEL（ゲル濃度：5-20 %, 10 %, 15 %, アトー株式会社）ゲルを使用した SDS-PAGE 法により分離した。SDS-PAGE 後、タンパク質を PVDF 膜（Immobilon, Millipore）に転写し、5 % BSA/ TBST を用いて室温、1 時間の条件でブロッキングした。ブロッキング溶液で一次抗体を希釈し、4 °C で一晩反応させた。本研究において用いた一次抗体の種類と希釈率は以下の表の通りである。

表 5. 一次抗体の希釈率

一次抗体	希釈率
抗 AIM 抗体 (rab2)	1: 2000
抗 FASN 抗体	1: 500
抗 β アクチン抗体	1: 5000
抗 FLAG 抗体 (HRP 結合)	1: 5000
抗 HA 抗体 (HRP 結合)	1: 5000
抗 ERK1 (pan) 抗体	1: 1000
抗リン酸化 Akt (T308) 抗体	1: 1000
抗リン酸化 Akt (S437) 抗体	1: 1000
抗リン酸化 p44 抗体	1: 1000
抗リン酸化 p42 抗体	1: 1000

一次抗体反応後、TBST を用いて 3 回洗浄し、二次抗体反応を行った。本研究において用いた二次抗体の希釈率は以下の表のとおりである。

表 6. 二次抗体の希釈率

二次抗体	希釈率
抗 mouse IgG 抗体 (HRP 結合)	1: 2000–5000
抗 rabbit IgG 抗体 (HRP 結合)	1: 2000–5000

二次抗体反応後、TBST を用いて 3 回洗浄した。検出試薬として、Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) を用い、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare) を使用してシグナルの検出を行った。

トリグリセリド含有量の測定

マウス肝臓のトリグリセリド含有量測定には、TG assay kit (Biovision cat.#K622-100) を使用した。マウス肝臓を 10 mg 程、5%NP-40/ milliQ を 1 ml 用いてホモジナイズした後、付属のプロトコールに従って操作を行った。

RNA 抽出および cDNA の作製

マウス肝臓からの RNA 抽出には、TRIzol Regent (Invitrogen) を用いた。回収した RNA は、濃度測定後、1 μ g を cDNA 作製に用いた。cDNA 合成においては、DNase 処理を行った後、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。実験操作はそれぞれに付属のプロトコールに従って行った。

リアルタイム PCR

遺伝子発言量の定量的解析は、7500Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を使用し、 $\Delta\Delta C_t$ 法によって解析した。各遺伝子の発現量は、*GAPDH* の遺伝子発現量で標準化した。PCR 反応溶液には、POWER SYBR GREEN PCR MASTER MIX (Applied Biosystems) を使用し、実験操作および機器の取り扱いについては、付属プロトコールの通りに行った。リアルタイム PCR に用いたプライマー配列は下記の表の通りである。

表 7. リアルタイム PCR プライマー配列

遺伝子名	配列 (5' - 3')
f-GAPDH	AACTTTGGCATTTGTGGAAGG
r-GAPDH	GGATGCAGGGATGATGTTCT
f-F4/80	CCTGGACGAATCCTGTGAAG
r-F4/80	GGTGGGACCACAGAGAGTTG
f-MCP1	CATCCACGTGTTGGCTCA
r-MCP1	GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
f-FSP27	CTGGAGGAAGATGGCACAATCGTG
r-FSP27	CAGCCAATAAAGTCCTGAGGGTTCA
f-IL1 β	TGTAATGAAAGACGGCACACC
r-IL1 β	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
f-IL6	GATGGATGCTACCAAACCTGGA
r-IL6	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
f-TNF α	TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG
r-TNF α	GGTCTGGGCCATAGAACTGA
f-catalase	CCTTCAAGTTGGTTAATGCAGA
r-catalase	CAAGTTTTTGGATGCCCTGGT
f-SOD1	CAGGACCTCATTTTAATCCTCAC
r-SOD1	TGCCCAGGTCTCCAACAT
f-SOD2	TGCTCTAATCAGGACCCATTG
r-SOD2	GTAGTAAGCGTGCTCCCACAC
f-Tfam	CAAAGGATGATTCGGCTCAG
r-Tfam	AAGCTGAATATATGCCTGCTTTTC
f-GRP78	CGATACTGGCCGAGACAAC
r-GRP78	GACGACGGTTCTGGTCTCA
f-CHOP	GCGACAGAGCCAGAATAACA
r-CHOP	GATGCACTTCCTTCTGGAACA
f-GADD34	ATCGCTTTTGGCAACCAG
r-GADD34	CTCCAGTGCAGGACATGCT
f-GPX	TTTCCCGTGCAATCAGTTC
r-GPX	TCGGACGTA CTTGAGGGAAT
f-18S rRNA	CATTCGAACGTCTGCCCTATC
r-18S rRNA	CCTGCTGCCTTCCTTGGA
f-dynamin2	AACTCAGACGCCCTCAAGC
r-dynamin2	ATGACACCGATGGTCCGTAG

f-EPS15	TTCAAGTACGGACCCTTTCAG
r-EPS15	GGGTCATTGTGCTTCCAAGT
f-Pard3	CCCTCTACAGTGGGATCGAG
r-Pard3	GGCAAATCCTATGTTCCCATTA
f-Spry2	GATTCAAGGGAGAGGGGTTG
r-Spry2	CAGGTCTTGGCAGTGTGTTC
f-Cbl	GTCTGCCAACGCCATTTACT
r-Cbl	AGGTGGCAGTTTTGGCATAG

マウス肝臓からのタンパク質抽出

マウスの肝臓組織片を 200-500 μ g 程用いて、タンパク質抽出を行った。細胞膜破壊溶液としては、10% NP40/TBS にプロテアーゼインヒビター (cOmplete mini, Roche) を加えたものを使用した。細胞膜破壊溶液は、マウス肝臓 1 mg 当たり 1 μ l 添加し、ホモジナイザーを用いて細胞膜を破壊した。さらに、15,000 rpm、4°C の条件で 20 分間遠心し、上清を回収した後、BCA 法によってタンパク質濃度を測定した。

培養細胞からのタンパク質抽出

培養細胞からのタンパク質抽出は、免疫沈降を目的として行った。細胞を回収後、PBS によって洗浄した。次に、1% NP-40 lysis buffer (1%NP-40, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 10% glycerol, cOmplete mini) に懸濁し、10 分毎に vortex を行いながら、氷上で 30 分間静置した。懸濁した細胞を遠心 (14,000rpm, 4 °C, 30 分間) し、上清を回収し、ライセートとした。

RCA 発現細胞株の作製

RCA (CD55-HA, CD59-HA, Crry-HA または CFH-FLAG) および AIM を共産生する HEK293T 細胞を作製した。CD55-HA、CD59-HA、Crry-HA 発現ベクターは

AIM-FLAG 発現ベクターと共に、CFH-FLAG 発現ベクターは AIM-HA 発現ベクターと共に、HEK293T にリポフェクションによって導入した。HA タグを付加した発現ベクターものについては pCAGGS を、FLAG タグを付加したものは pFLAG CMV 5.1 (SIGMA) を用いて構築した。リポフェクションは、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、付属のプロトコールに従って行った。

細胞表面結合型 AIM 発現 HCC 細胞株 (MB-AIM/ Hepa1.6, iMB-AIM/ Hepa1.6) の作製

細胞表面結合型 AIM 発現ベクター (MB-AIM/ Hepa1.6)、または rtTA を発現する調節ベクターおよび Dox の存在下において、細胞表面結合型 AIM を発現する応答発現ベクター (iMB-AIM/ Hepa1.6) はそれぞれ、Hepa1.6 にエレクトロポレーションによって導入した。その後、シングルセルクローニングを行い、48well プレートを用いて、各クローンを培養した。80-90% コンフルエントまで培養した後、rab2 で染色し、FACS を用いて AIM の発現を確認した。なお、iMB-AIM/ Hepa1.6 については、Dox を培地中に添加することによって、AIM の発現が生じるかを確認した。

免疫沈降法

CD55-HA および CD59-HA、Crry-HA の免疫沈降には、anti-HA-matrix (Roche) を用い、AIM-FLAG および CFH-FLAG の免疫沈降には、anti-FLAG M2 agarose (SIGMA) を用いた。また、AIM の免疫沈降には Protein G

(SIGMA) 30 μ l に対し、抗 AIM 抗体を 3 ml 加え、30 分間室温で結合させた後、ライセートの抽出に使用した、1 % NP-40 lysis buffer で洗浄した担体を用いた。

それぞれの担体に、各ライセートを加え、4 $^{\circ}$ C で 4 時間攪拌した。その後、担体

に 1% NP-40 lysis buffer を加えて懸濁し、遠心（10,000 rpm, 室温, 10 秒間）を行い、洗浄した。洗浄を 5 回行った後、2x SDS sample buffer（125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 20 % グリセロール, 0.004 % ブロモフェノールブルー）を加え、95 °C で 5 分間加熱し、タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質は、各検出抗体を用いたイムノブロット法によって、解析を行った。

統計解析

本研究の結果は、two-tailed Mann-Whitney test を用いて、p 値を計算し、解析した（***p < 0.001、**p < 0.01、*p < 0.05）。エラーバーには標準誤差を用いた。

【参考文献】

1. Bosch FX., Ribes J., Cléries R. and Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis.* 9(2): 191-211. (2005)
2. El-Serag HB. and Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 132(7): 2557-76. (2007)
3. Powell E.E., Cooksley W.G., Hanson R., Searle J., Halliday J.W., and Powell L.W. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 11, 74–80. (1990)
4. Ertle J., Dech[^]ene A., Sowa J.P., Penndorf V., Herzer K., Kaiser G., Schlaak J.F., Gerken G., Syn W.K. and Canbay A. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int. J. Cancer* 128, 2436–2443. (2011)
5. Day C.P., and Saksena S. Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17 (Suppl 3), S377–S384. (2002)
6. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* 346, 1221–1231. (2002)
7. Harrison S.A., Torgerson S. and Hayashi P.H. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 2042–2047. (2003)
8. Ascha M.S., Hanouneh I.A., Lopez R., Tamimi T.A., Feldstein A.F., and Zein N.N. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 51, 1972–1978. (2010)
9. Nordenstedt H., White D.L., and El-Serag H.B. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig. Liver Dis.* 42 (Suppl 3), S206–

S214. (2010)

10. Blonski W., Kotlyar D.S., and Forde K.A. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 16, 3603–3615. (2010)
11. Hytiroglou P., Park Y. N., Krinsky G., Theise ND. Hepatic precancerous lesions and small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am.* 36(4): 867-87. (2007)
12. Farrell G.C., Rooyen D., Gan L, and Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver.* 6(2), 149–171. (2012)
13. Seki S., Kitada T., Yamada T., Sakaguchi H., Nakatani K. and Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J. Hepatol.* 37, 56-62. (2002)
14. Chagas, A.L., Kikuchi, L.O., Oliveira, C.P., Vezozzo, D.C., Mello, E.S., Oliveira, A.C., Cella, L.C., Herman, P., Bachella, T., Caldwell, S.H., et al. Does hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis exist in cirrhotic and non-cirrhotic patients? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 958–962. (2009)
15. Kawada, N., Imanaka, K., Kawaguchi, T., Tamai, C., Ishihara, R., Matsunaga, T., Gotoh, K., Yamada, T., and Tomita, Y. Hepatocellular carcinoma arising from non-cirrhotic nonalcoholic steatohepatitis. *J. Gastroenterol.* 44, 1190–1194. (2009)
16. Paradis, V., Zalinski, S., Chelbi, E., Guedj, N., Degos, F., Vilgrain, V., Bedossa, P., and Belghiti, J. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology* 49, 851–859. (2009)
17. Starley, B.Q., Calcagno, C.J., and Harrison, S.A. Nonalcoholic fatty liver

- disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 51, 1820–1832. (2010)
18. Takuma, Y., and Noso, K. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma: our case series and literature review. *World J. Gastroenterol.* 16, 1436–1441. (2010)
 19. Ertle, J., Dech[^]ene, A., Sowa, J.P., Penndorf, V., Herzer, K., Kaiser, G., Schlaak, J.F., Gerken, G., Syn, W.K., and Canbay, A. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int. J. Cancer* 128, 2436–2443. (2011)
 20. Torres, D.M., and Harrison, S.A. Nonalcoholic steatohepatitis and noncirrhotic hepatocellular carcinoma: fertile soil. *Semin. Liver Dis.* 32, 30-38. (2012)
 21. 平成 27 年度 肝がん白書 (一般社団法人 日本肝臓学会)
 22. Bosch FX., Ribes J., Cléries R. and Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis.* 9(2): 191-211. (2005)
 23. El-Serag HB. and Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 132(7): 2557-76. (2007)
 24. Jemal A., Bray F., Center MM., Ferlay J., Ward E. and Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61(2):69-90. (2011)
 25. Takaki A. and Yamamoto K. Control of oxidative stress in hepatocellular carcinoma: Helpful or harmful? *World J Hepatol.* 7(7):968-79.(2015)
 26. Takaki A., Kawai D. and Yamamoto K. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci.* 15(5):7352-79. (2014)
 27. Capece D., Fischietti M., Verzella D., Gaggiano A., Cicciarelli G., Tessitore A., Zazzeroni F. and Alesse E. The inflammatory microenvironment in

- hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages. *Biomed Res Int.* (2013)
28. Johnson C., Han Y., Hughart N., McCarra J., Alpini G. and Meng F.
Interleukin-6 and its receptor, key players in hepatobiliary inflammation and cancer. *Transl Gastrointest Cancer.* 1(1): 58-70. (2012)
 29. Miyazaki, T., Hirokami, Y., Matsushashi, N., Takatsuka, H., and Naito, M.
Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *J. Exp. Med.* 189: 413–422. (1999)
 30. Sarrias MR., Padilla O., Monreal Y., Carrascal M., Abian J., Vives J., Yélamos J. and Lozano F. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpa. *Tissue Antigens.* 63(4): 335-44. (2004)
 31. Lian X., Yan C., Qin Y., Knox L., Li T. and Du H. Neutral lipids and peroxisome proliferator-activated receptor- γ control pulmonary gene expression and inflammation-triggered pathogenesis in lysosomal acid lipase knockout mice. *Am J Pathol.* 167(3): 813-21. (2005)
 32. Kuwata K., Watanabe H., Jiang SY., Yamamoto T., Tomiyama-Miyaji C., Abo T., Miyazaki T. and Naito M. AIM inhibits apoptosis of T cells and NKT cells in *Corynebacterium*-induced granuloma formation in mice. *Am J Pathol.* 162(3): 837-47. (2003)
 33. Haruta I., Kato Y., Hashimoto E., Minjares C., Kennedy S., Uto H., Yamauchi K., Kobayashi M., Yusa S., Müller U., Hayashi N. and Miyazaki T. Association of AIM, a novel apoptosis inhibitory factor, with hepatitis via supporting macrophage survival and enhancing phagocytotic function of macrophages. *J Biol Chem.* 276(25): 22910-4. (2001)
 34. Zou T., Garifulin O., Berland R. and Boyartchuk VL. *Listeria monocytogenes*

- infection induces prosurvival metabolic signaling in macrophages. *Infect Immun.* 79(4): 1526-35. (2011)
35. Yusa S., Ohnishi S., Onodera T. and Miyazaki T. AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF-beta1. *Eur J Immunol.* 29(4): 1086-93. (1999)
 36. Sarrias MR., Roselló S., Sánchez-Barbero F., Sierra JM., Vila J., Yélamos J., Vives J., Casals C. and Lozano F. A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. *J Biol Chem.* 280(42): 35391-8. (2005)
 37. Oh JH., Yang MJ., Heo JD., Yang YS., Park HJ., Park SM., Kwon MS., Song CW., Yoon S. and Yu IJ. Inflammatory response in rat lungs with recurrent exposure to welding fumes: a transcriptomic approach. *Toxicol Ind Health.* 28(3): 203-15. (2012)
 38. Li Y., Qu P., Wu L., Li B., Du H. and Yan C. Api6/AIM/Spa/CD5L overexpression in alveolar type II epithelial cells induces spontaneous lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 71(16): 5488-99. (2011)
 39. Joseph SB., Bradley MN., Castrillo A., Bruhn KW., Mak PA., Pei L., Hogenesch J., O'connell RM., Cheng G., Saez E., Miller JF. and Tontonoz P. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell.* 119(2): 299-309. (2004)
 40. Valledor AF., Hsu LC., Ogawa S., Sawka-Verhelle D., Karin M. and Glass CK. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Pharmacol Ther.* 71(1-2): 57-81. (1996)
 41. Arai S, Maehara N, Iwamura Y, Honda S, Nakashima K, Kai T, Ogishi M, Morita K, Kurokawa J, Mori M, Motoi Y, Miyake K, Matsushashi N, Yamamura K, Ohara O, Shibuya A, Wakeland EK, Li QZ, Miyazaki T.

- Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells. *Cell Rep.* 25:3(4): 1187-98. (2013)
42. Kai T., Yamazaki T., Arai S., Miyazaki T. Stabilization and augmentation of circulating AIM in mice by synthesized IgM-Fc. *PLoS One.* 7:9(5): e97037. (2014)
 43. Yamazaki T., Mori M., Arai S., Tateishi R., Abe M., Ban M., Nishijima A., Maeda M., Asano T., Kai T., Izumino K., Takahashi J., Aoyama K., Harada S., Takebayashi T., Gunji T., Ohnishi S., Seto S., Yoshida Y., Hiasa Y., Koike K., Yamamura K., Inoue K. and Miyazaki T. Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans. *PLoS One.* 9(10): e109123. (2014)
 44. Gangadharan B., Antrobus R., Dwek RA. and Zitzmann N. Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem.* 53(10): 1792-9. (2007)
 45. Gray J., Chattopadhyay D., Beale GS., Patman GL., Miele L., King BP., Stewart S., Hudson M., Day CP., Manas DM. and Reeves HL. A proteomic strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease. *BMC Cancer.* 9: 271. (2009)
 46. Kim WK., Hwang HR., Kim do H., Lee PY., In YJ., Ryu HY., Park SG., Bae KH. and Lee SC. Glycoproteomic analysis of plasma from patients with atopic dermatitis: CD5L and ApoE as potential biomarkers. *Exp Mol Med.* 40(6): 677-85. (2008)
 47. Yu HR., Kuo HC., Sheen JM., Wang L., Lin IC., Wang CL. and Yang KD. A unique plasma proteomic profiling with imbalanced fibrinogen cascade in

- patients with Kawasaki disease. *Pediatr Allergy Immunol.* 20(7): 699-707. (2009)
48. Kolialexi A., Anagnostopoulos AK., Papantoniou N., Vougas K., Antsaklis A., Fountoulakis M., Mavrou A. and Tsangaris GT. Potential biomarkers for Turner in maternal plasma: possibility for noninvasive prenatal diagnosis. *J Proteome Res.* 9(10):5164-70. (2010)
 49. Arai, S., Shelton, J.M., Chen, M., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bookout, A.L., Mak, P.A., Edwards, P.A., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., and Miyazaki, T. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development. *Cell Metab.* 1, 201–213. (2005)
 50. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 91(9): 2488-96. (1995)
 51. Kurokawa J., Nagano H., Ohara O., Kubota N., Kadowaki T., Arai S. and Miyazaki T. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(29): 12072-7. (2011)
 52. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6): 2548-56. (2004)
 53. Smitka K, Marešová D. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague Med Rep.* 116(2): 87-111. (2015)
 54. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* (2014)
 55. Kurokawa, J., Arai, S., Nakashima, K., Nagano, H., Nishijima, A., Miyata, K., Ose, R., Mori, M., Kubota, N., Kadowaki, T., et al. Macrophage-derived AIM is

- endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. *Cell Metab.* 11: 479–492. (2010)
56. Raza A. and Sood GK. Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine. *World J Gastroenterol.* 20(15):4115-27. (2014)
 57. Ge S, Huang D. Systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Drug Discov Ther.* 9(5):352-62. (2015)
 58. Cainap C., Qin S., Huang WT., Chung IJ., Pan H., Cheng Y., Kudo M., Kang YK., Chen PJ., Toh HC., Gorbunova V., Eskens FA., Qian J., McKee MD., Ricker JL., Carlson DM., El-Nowiem S. Linifanib versus Sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 33(2):172-9. (2015)
 59. Prieto J., Melero I., Sangro B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 12(12):681-700. (2015)
 60. Sawada Y., Yoshikawa T., Shimomura M., Iwama T., Endo I., Nakatsura T. Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Oncol.* 46(1):28-36. (2015)
 61. Sangro B., Gomez-Martin C., de la Mata M., Iñarrairaegui M., Garralda E., Barrera P., Riezu-Boj JL., Larrea E., Alfaro C., Sarobe P., Lasarte JJ., Pérez-Gracia JL., Melero I. and Prieto J. A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 59(1): 81-8. (2013)
 62. Bao Y.X., Cao Q., Yang Y., Mao R., Xiao L., Zhang H., Zhao H.R., and Wen H. Expression and prognostic significance of golgiglycoprotein73 (GP73) with epithelial-mesenchymal transition (EMT) related molecules in hepatocellular

- carcinoma (HCC). *Diagn. Pathol.* 8, 197. (2013)
63. Fan Z., van de Rijn M., Montgomery K., and Rouse R.V. Hep par 1 antibody stain for the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma: 676 tumors tested using tissue microarrays and conventional tissue sections. *Mod. Pathol.* 16, 137–144. (2003)
 64. Yoshimoto S., Loo T.M., Atarashi K., Kanda H., Sato S., Oyadomari S., Iwakura Y., Oshima K., Morita H. and Hattori M. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 499, 97–101. (2013)
 65. Hill-Baskin A.E., Markiewski M.M., Buchner D.A., Shao H., DeSantis D., Hsiao G., Subramaniam S., Berger N.A., Croniger C., Lambris J.D. and Nadeau J.H. Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2975–2988. (2009)
 66. Browning J.D., and Horton J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114, 147–152. (2004)
 67. Hill-Baskin A.E., Markiewski M.M., Buchner D.A., Shao H., DeSantis D., Hsiao G., Subramaniam S., Berger N.A., Croniger C., Lambris J.D. and Nadeau J.H. Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2975–2988. (2009)
 68. Browning J.D., and Horton J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114, 147–152. (2004)
 69. Polo S., Pece S. and Di Fiore P.P. Endocytosis and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 156–161. (2004)
 70. Mosesson Y., Mills G.B. and Yarden Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 835–850. (2008)
 71. Fang C.M. and Xu Y.H. Down-regulated expression of atypical PKCbinding

- domain deleted asip isoforms in human hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 11, 223–229. (2001)
72. Fong C.W., Chua M.S., McKie A.B., Ling S.H., Mason V., Li R., Yusoff P., Lo T.L., Leung H.Y., So S.K. and Guy G.R. Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 66, 2048–2058. (2006)
73. Bamberger M., Santos A.M., Gonc, alves C.M., Oliveira M.I., James J.R., Moreira A., Lozano F., Davis S.J. and Carmo A.M. A new pathway of CD5 glycoprotein-mediated T cell inhibition dependent on inhibitory phosphorylation of Fyn kinase. *J. Biol. Chem.* 286, 30324–30336. (2011)
74. Fredrikson G.N., Truedsson L. and Sjöholm A.G. New procedure for the detection of complement deficiency by ELISA. Analysis of activation pathways and circumvention of rheumatoid factor influence. *J. Immunol. Methods* 166, 263–270. (1993)
75. Seelen M.A., Roos A., Wieslander J., Mollnes T.E., Sjöhol A.G., Wurznier R., Loos M., Tedesco F., Sim R.B. and Garred, P. Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J. Immunol. Methods* 296, 187–198. (2005)
76. Hörl S., Bánki Z., Huber G., Ejaz A., Windisch D., Muellauer B., Willenbacher E., Steurer M. and Stoiber H. Reduction of complement factor H binding to CLL cells improves the induction of rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Leukemia* 27, 2200–2208. (2013)
77. Imai M., Ohta R., Okada N. and Tomlinson S. Inhibition of a complement regulator in vivo enhances antibody therapy in a model of mammary adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 110, 875–881. (2004)

78. Ohta R., Kondor N., Dohi N., Tomlinson S., Imai M., Holers V.M., Okada H. and Okada N. Mouse complement receptor-related gene y/p65⁻ neutralized tumor vaccine induces antitumor activity in vivo. *J. Immunol.* 173, 205–213. (2004)
79. Verna L., Whysner J. and Williams G.M. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.* 71, 57–81. (1996)

【謝辞】

本研究は東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター分子病態医科学研究室において行われました。

当研究室の宮崎徹教授には、本研究に取り組む上で、恵まれた研究環境を与えて頂きましたことを感謝いたします。また、研究に取り組む姿勢や論理的思考、実験手技など、研究活動の全てにおいて、御指導御鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。

当研究室の新井郷子准教授には、本研究を遂行するにあたり、常日頃から多大な御指導御鞭撻を賜りました。特に、免疫沈降法を用いた解析や、免疫組織化学法による解析において、情報の御提供、ならびに多大なる御指導を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

University Medical Center Hamburg の森真弓博士には、フローサイトメトリーを用いた解析や、DEN 投与マウスを用いた実験において、情報の御提供、ならびに多大な御指導を賜りました。心から感謝の意を表します。

大日本住友製薬の岩村善博研究員には、本研究を遂行する上で、リアルタイム PCR を用いた解析において、情報の御提供、ならびに多大な御指導を賜りました。深く感謝いたします。

慶応大学先端生命科学研究所の池田和貴博士には、メタボローム解析において情報の御提供、ならびに御助言を頂きました。深く感謝いたします。

かずさ DNA 研究所の小原収博士、大日本住友製薬の甲斐敏裕研究員には、マイクロアレイを用いた解析において、情報の御提供、ならびに多大な御指導を賜りました。深く感謝いたします。

熊本大学生命資源・研究センター 山村プロジェクト研究室の山村研一教授、当研究室の卒業生である黒川淳博士、谷口香織博士には、マウスを用いた実験におい

て、多大なる御指導および御高配を賜りました。深く感謝いたします。

最後に、本研究の遂行にあたり、様々な形で協力して頂いた東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター分子病態医科学部門のスタッフの皆様、並びに学生の皆様に感謝いたします。