

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

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、肝炎ウィルスやアルコール、肥満・脂肪肝など、様々な要因から生じることが知られている。しかし、肝臓は「沈黙の臓器」と呼称されるように、障害が進んでも自覚症状がでにくく、肝硬変や肝がんの早期発見や治療は困難である。

本研究では、これまでにメタボリックシンドローム病態の基盤にある慢性炎症において重要な役割を担うことが知られてきた Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) と、メタボリックシンドロームにおける肝疾患である、非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) との関連を解析することにした。NAFLD は、近年患者数の増加が注目されている疾患であり、肥満の亢進に伴い脂肪肝のみを発達する単純性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver: NAFL) と、肥満・脂肪肝の亢進によって肝硬変や肝がんを発症する非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) とに分かれる。

まず、AIM が NAFLD の病態に影響するかを検討するために、野生型 ( $AIM^{+/+}$ ) マウスおよび AIM 欠損 ( $AIM^{-/-}$ ) マウスを用いて検討した。NAFLD は、肥満・脂肪肝の亢進によって生じる疾患であり、その病態をマウスモデルで再現するために、 $AIM^{+/+}$  マウスおよび  $AIM^{-/-}$  マウスに対し、肥満を引き起こす高脂肪食の負荷を行った。高脂肪食負荷前、および高脂肪食負荷後 6、12、20、45、55 週後の肝臓を比較したところ、 $AIM^{-/-}$  マウスの肝臓において顕著な肝細胞がん (Hepatocellular Carcinoma: HCC) の腫瘍形成を確認した。一方で、 $AIM^{+/+}$  マウスでは高脂肪食を 55 週間負荷しても HCC の腫瘍形成を認めなかった。この結果から、AIM には、NASH におけるがんの発生・発達を防ぐ作用があることが示唆された。そこで本研究では、肝臓での AIM による抗がん作用着目し、そのメカニズムの解明に向けて詳細な検討を行った。

まず、HCC 細胞の発生過程における、AIM の影響を検討した。NASH の病態として知られている脂肪肝、各種細胞内ストレス、炎症、線維化について、高脂肪食を負荷した  $AIM^{+/+}$  マウスおよび  $AIM^{-/-}$  マウスの肝臓を用い、リアルタイム PCR や各種染色、メタボロームやマイクロアレイによる解析を行い、詳細に検討した。その結果、AIM は、脂肪細胞と同様に、肝細胞においても細胞内に取り込まれ、脂肪融解を促進するため、 $AIM^{-/-}$  マウスにおいて、脂肪肝が亢進することを確認した。しかし、その他の病態については、 $AIM^{+/+}$  マウスと  $AIM^{-/-}$  マウスの間において、HCC の発生を促すような差異を認めなかった。この結果から、肝臓における AIM の抗がん作用は、HCC の発生過程ではなく、発生した HCC の排除に影響しているのではないかと考え、AIM による HCC の排除機構に

について検討することにした。

AIM による HCC の排除機構を解明するために、まず、AIM による HCC への直接的な細胞障害作用について検討することとした。マウス HCC 細胞株である Hepa1.6 に対し、AIM を添加して培養し、Hepa1.6 に対する AIM の作用を解析した。AIM の添加には、リコンビナント AIM (rAIM) または *AIM*<sup>+/+</sup> マウスの血清を用いた。この解析の過程で、AIM を添加しても、Hepa1.6 に細胞障害は起こらないことを確認した。しかし、この結果から、AIM は HCC 細胞の細胞表面上に集積することが明らかになった。前述のように、正常な肝細胞においては、AIM は細胞内に取り込まれる。よって、HCC 細胞特異的な AIM の細胞表面上への集積は、AIM によって生じる HCC の排除に関係があると考えた。

そこで次に、マウス生体内において、HCC 細胞表面上に AIM が集積量することによって、HCC 細胞の排除が誘導されるかを検討することにした。この検討を行うにあたり、HCC 細胞の細胞表面上に、AIM を集積させる必要があった。そこで、細胞表面上に AIM が集積する状態を模倣し、AIM を Hepa1.6 の細胞膜に結合した状態で発現する安定発現細胞株 (Membrane bound-AIM/ Hepa1.6: MB-AIM/ Hepa1.6) を作製した。まず、同一個体内において、細胞の生着を確認するために、MB-AIM/ Hepa1.6 を通常の Hepa1.6 と等量混和し、*AIM*<sup>-/-</sup> マウスの肝臓に移植した。移植 1 週間後に、肝臓を採取し、解析した結果、同時に移植した Hepa1.6 と比較して、MB-AIM/ Hepa1.6 はマウス肝臓への生着率が著しく低下することを認めた。次に、AIM を細胞表面上に集積することで生じる、HCC 細胞排除機構について検討した。しかし、細胞膜に AIM を結合した状態で発現する MB-AIM/ Hepa1.6 は、肝臓にほとんど生着しないため、HCC 細胞排除機構の詳細な解析は困難であった。そこで、移植後に AIM を発現することのできる細胞株が必要であると考え、細胞膜に結合した AIM の発現を、ドキシサイクリン (Doxycyclin: Dox) によって誘導することの可能な安定発現細胞株 (inducible membrane bound-AIM/ Hepa1.6: iMB-AIM/ Hepa1.6) を、Tet-On Gene Expression System (Clontech) を用いて作製した。iMB-AIM/ Hepa1.6 を *AIM*<sup>-/-</sup> マウスの肝臓に移植し、移植 1 週間後から Dox の投与を開始し、継時的なコロニーの変化を解析した。その結果、Dox 投与後、約 2 時間経過時点には、細胞表面上に AIM を発現するが、その約 4 時間後 (投与 6 時間) という短時間において、コロニー内において、細胞壊死が誘導されることを各種染色や電子顕微鏡を用いた観察によって確認した。以上のように、AIM が細胞表面に集積した後、迅速な細胞壊死が誘導されることや、肝臓が主な補体系構成因子の主な産生場であることを踏まえ、AIM の細胞表面上への集積は補体系の活性化を誘導し、HCC 細胞特異的な細胞障害を引き起こしているのではないかと考えた。補体系は、病原体に対する生体防御機構の一つであり、IgG、IgM 依存性の古典経路、病原体細胞表面上のマンノースを認識するレクチン経路、そして補体系活性化において中心的な役割を担う補体構成成分である C3

(Complement 3) の直接的な活性化によって起こる第二経路の三つが存在する。AIM による補体系の活性化においては、AIM が血中で IgM と結合して存在することから古典経

路の活性化を誘導する可能性と、C3の活性化に寄与し、第二経路の活性化を誘導する可能性が考えられた。しかし、古典経路の活性化については、HCC細胞表面上に集積したAIMが、必ずしもIgMと共局在しないことから、AIMによるHCC排除において主な作用機構ではないと考えた。このことから、AIMによる補体系活性化を介したHCC排除機構は、第二経路によって生じることが想定された。そこで次に、AIMにはC3の直接的な活性化作用があるのか、もしくは間接的にC3の活性化を誘導しているのかを検討することにした。まず、AIMがC3の直接的な活性化作用を持つかを確認するため、*in vitro*において、ヒト血清中のAIMによる第二経路活性化を測定した。その結果、AIMはC3の直接的な活性化作用を持たないことが明らかになった。そこで、HCC細胞表面上にAIMが集積することで間接的に補体系第二経路の活性化が誘導される仮説として、AIMがHCC細胞表面上において、補体制御因子 (Regulators of Complement system: RCA) の機能を阻害するのではないかと考えた。RCAはC3の活性化や膜侵襲複合体 (Membrane attack complex: MAC) の形成を阻害し、補体系による自己細胞に対する攻撃を抑制しており、血中や細胞表面上に存在することが知られている。また、RCAの阻害によってがん細胞に補体依存性細胞障害 (Complement dependent cytotoxicity: CDC) が誘導されるという報告があることから、AIMはHCC細胞表面上において、RCAの機能を阻害し、CDCを誘導するのではないかと考えた。RCAとAIMの結合を免疫沈降によって検討した結果、その結合を確認した。この結果から、AIMはRCAに直接結合してその機能を阻害することでCDCを生じ、HCC細胞の排除を誘導することが示唆された。

また、NASHに非依存的なHCCに対するAIMの抗がん作用を確かめるために、ジエチルニトロソアミン (Diethylnitrosamine: 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。その結果、*AIM*<sup>+/+</sup> マウスおよび *AIM*<sup>-/-</sup> マウスのどちらにおいてもHCCの腫瘍形成を確認したが、HCCの腫瘍数や腫瘍の大きさについては、*AIM*<sup>-/-</sup> マウスで亢進していた。さらに、AIM投与によって、DEN誘導性HCCの細胞表面上にもAIMが集積することを確認した。以上のことから、NASH由来のHCCのみではなく、DEN誘導性HCCにおいても、AIMによる抗がん作用を認めた。

本研究成果によって今後、AIMによる新規肝がん治療法の開発が期待できる。