

平成30年6月6日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09013

研究課題名(和文) NASHからの肝発癌における酸化的DNA傷害程度と修復能の検討と治療応用

研究課題名(英文) Oxidative stress in hepatocarcinogenesis from NASH

研究代表者

宮西 浩嗣 (Miyanishi, Koji)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60372819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：in vivoでMUTYH gene null miceにSurwit dietに45%スクロース水投与を併用したMUTYH欠損NASHマウスモデルを作製した。NASHモデルでは約4ヶ月間で半数にNASH肝硬変が生じることが知られている。まず本研究で、マウスがNASHを発症していることが確認された。NASH患者の半数に認められる肝内鉄過剰症の肝発癌における意義を検討するため、鉄過剰食群、鉄過剰食群+NAC群ならびに通常食群(コントロール)において12月間にわたる腫瘍の発生観察をおこなった。現在までのところ鉄過剰食群のMUTYHヘテロ欠損およびホモ欠損マウスにおいて肝腫瘍の発生がみとめられた。

研究成果の概要(英文)：MUTYH deficient NASH mouse model with MUTYH gene null mice in combination with 45% sucrose water administration in Surwit diet was prepared in vivo. It is known that NASH cirrhosis occurs in about half of NASH models in about 4 months. First of all, in this study, it was confirmed that the mouse developed NASH. In order to examine the significance of hepatic iron overload in half of NASH patients in hepatic carcinogenesis, observation of the occurrence of tumor over 12 months in the iron overdose group, the iron overdose + NAC group and the normal diet group (control) It was. Up to now, development of hepatic tumor was found in MUTYH hetero-deficient and homo-deficient mice in the iron overdose group.

研究分野：消化器病学

キーワード：NASH 鉄代謝異常

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は肝硬変へと進行し肝癌(HCC)の発生母地となることが明らかとなっている。NASHの成因としては、最初に脂肪肝が起こりその後脂肪性肝炎へ移行するとする”multi-hit theory”が現在支持されている。1st hitは肝細胞への脂肪沈着であり、肝炎の発症原因であるhitには酸化ストレス増加やエンドトキシンなどが関与していると推測されているが、その機序は未だ不明である。そのためNASHの治療法は確立しておらず、また肝発癌の危険因子も明らかではない。C型慢性肝炎の撲滅が期待される一方で、NASHならびにNASHを背景としたHCCが増加しており、肝線維化阻止や発癌予防法の樹立が急務である。2nd hitの要因である酸化ストレスの要因としてNASH患者の肝における鉄過剰蓄積が挙げられている。申請者はこれまでに科学研究費補助金助成を受け検討を重ねてきた結果、C型慢性肝炎患者では肝での鉄代謝ペプチドであるヘプシジンの発現低下と十二指腸粘膜の鉄吸収関連分子の発現増加により鉄吸収が亢進することによって肝内鉄過剰沈着が生じており、細胞内の過剰遊離鉄が活性酸素種(ROS)の産生を亢進させ、肝細胞傷害や肝線維化を惹起する原因になることや、肝内に8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)が増加することによりG:C A:T型の遺伝子変異を誘発しHCCの原因となることを見出し、除鉄療法により肝炎を鎮静化でき、肝の線維化を改善させ、8-OHdG量を正常化できること(Cancer Res, 2001)、さらに実際にHCCの発生率が低下することを明らかにした(J.Gastroenterology,2007)。そしてNASHにおいても半数以上に肝組織に鉄が過剰沈着しており、肝発癌者において8-OHdGが非癌部肝組織において非肝癌患者に比べ有意に増加していることを明らかにした(J.Gastroenterol. 2013)。更にNASHからの肝癌患者でMUTYH SNP(rs3219487)のhetero/minor homo形質が有意に検出されること、ならびに、このminor allele保有者の肝発癌率はmajor homo形質保有者のそれに比べて有意に高いことを新たに見出した。DNAの酸化損傷に対して、MUTYHは、DNA複製時にアデニンが誤って鋳型鎖に存在する8-oxoGに対して取り込まれた際に、このアデニン:8-oxoGの誤対合からアデニンを切除することで突然変異の生成を回避する。さらに、アデニンの酸化体2-ヒドロキシアデニン(2-OH-A)が鋳型鎖のグアニンに対して取り込まれた場合も、同じくMutYHが2-OG-A:G誤対合を認識して2-OH-Aを切除する。またOGG1は8-oxoGを切除する。従って、このDNA修復酵素活性の低下した個体では慢性炎症を背景とした発癌の危険がより高いものと予測されるが、NASHからの肝発癌において遺伝子修復能の意義はこれまで検討されていない。2. 研究の目的

1) 酸化的DNA傷害修復酵素(OGG1,MUTYH)のSNP分布を検索し、発癌患者と非発癌患者間での差異を検討することにより酸化的DNA傷害修復酵素活性の個体差の点からNASH肝発癌危険群を同定する。2)MUTYHノックアウト(KO)マウスとOGG1 KOマウスを用い、high-fat high-carbohydrate diet+鉄過剰食あるいは通常食を与え肝発癌の差を検討することにより、脂肪肝炎からの肝発癌における過剰鉄によるラジカル負荷とMUTYH,OGG1機能の因果関係を明らかにする。併せて同モデルを用いてN-acetylcysteineなどの抗酸化療法や鉄吸収抑制薬の有用性を検討する。4)さらにNASHに対する治療法として除鉄療法(瀉血+低鉄栄養療法)あるいは鉄吸収抑制治療を行い、増加している8-OHdG量を除鉄療法により低下させ肝発癌を抑制するかについて検討する。同時に同療法によって酸化ストレス増加を回避でき、肝内の炎症や線維化を改善し得ることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 末梢血の採取

本研究の内容に対して十分なインフォームドコンセントを行い、同意が得られた脂肪肝・NASH・肝硬変・肝細胞癌患者および対照としてEDTA・Na<sub>2</sub>採血管に5mlの末梢血を採取する。

#### (2) 酸化DNA傷害修復遺伝子のSNP検索

定法に従い患者末梢血から分離したPBMCよりgemonic DNAを抽出し、long PCRによりMUTYHおよびOGG1配列を増幅する。

#### (3) OGG1 KOマウスとMutYH KOマウスを用いた肝発癌機構の検討

Surwit diet(リサーチダイエツト社)に45%スクロース水を併用(high-fat high-carbohydrate;HFHC)すると約4ヶ月で50%にNASH肝硬変モデルが生じることが知られている(Hepatology, 2010)。鉄過剰食(鉄450mg/kg diet)群、鉄過剰食+N-acetylcysteine(鉄450mg/kg diet + NAC 0.2% diet)群ならびに通常食群(コントロール)において約12か月間にわたり、腫瘍の発生を観察する。鉄過剰食による組織へのラジカル負荷、DNA損傷ならびに発癌へのOGG1とMUTYHの関与の有無と抗酸化薬の発癌抑制効果を証左する。

#### (4) OGG1 KOマウスとMUTYH KOマウス肝組織におけるROS測定・脂質過酸化反応、鉄含量、DNA損傷・遺伝子発現変化の評価

OGG1 KOマウスとMUTYH KOマウス各群の肝組織を1.15% KCl溶液中でホモジナイズした後、1/12N硫酸存在下でリンタンゲステン酸と反応させ脂質およびタンパク質を沈殿除去する。その後cytochrome C peroxidase法にてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>定量を行ない、lipid peroxidationはTBA法で評価する。また、OFR(oxygen free radicals)の測定は、常法に

準じて肝細胞中の OFR は DHR を基質として反応させ、FACS あるいは autogamma を用いて蛍光信号を定量する。総鉄量は塩酸処理後、non-heme 鉄は 50%硫酸の沈殿分画を塩酸で可溶化後、それぞれ 2-2'bipyridyl および sodium sulfate にて発色させ 520 nm の吸光度より鉄量を測定する。組織内 free 鉄量は bleomycin 結合鉄を tiobarbiturate で発色させ 532 nm の吸光度で測定する。肝組織 Ferritin 鉄は、ホモジネートの ferritin 濃度を ELISA 法で測定し、標準蛋白の鉄含量より鉄量を換算する。DNA 損傷は既報 (Kato J et al, Cancer Res) に準じて測定する。高分子 DNA 5-10 μg を nuclease P1 で消化し spin column で精製した後、HPLC で分画して electro chemical detector (ECD) によって 8-OHdG ピークを検出する。なお定量には 8-OHdG および dG 標準品 (和光) を同様にロードして行い、dG との含有比率を算出する。肝癌部背景肝組織より total RNA を抽出し、SurePrint G3Mouse GE マイクロアレイキット (プローブセット数 39429) を用いて遺伝子発現量を測定し、データマイニングにより MUTYH 活性欠損 MUTYH 活性欠損+鉄過剰が脂肪肝に与える遺伝子発現変化を解析する。

#### 4. 研究成果

in vivo では MUTYH gene null mice に Surwit diet に 45%スクロース水投与を併用した MUTYH 欠損 NASH マウスモデルを作製した。Surwitdiet に 45%スクロース水投与を併用する NASH モデルでは約 4 ヶ月間で半数に NASH 肝硬変が生じることが知られている (Hepatology 2010)。まず本研究で、マウスが NASH を発症していることが確認された (図 1, 2)。

一方で MUTYH 欠損単独での肝発癌は報告されていない。NASH 患者の半数に認められる肝内鉄過剰症の肝発癌における意義を検討するため、鉄過剰食 (鉄 450mg/kg diet) 群、鉄過剰食+N-acetylcystein (鉄 450mg/kg diet +NAC 0.2% diet) 群ならびに通常食群 (コントロール) において 12 月間にわたる腫瘍の発生観察をおこなった。現在までのところ鉄過剰食 (鉄 450mg/kg diet) 群の MUTYH ヘテロ欠損およびホモ欠損マウスにおいて肝腫瘍の発生がみとめられた (表 1)。さらに鉄過剰食+N-acetylcystein 群の観察を継続し、鉄過剰食による組織へのラジカル負荷、DNA 損傷ならびに発癌への OGG1 と MUTYH 関与の有無と抗酸化薬の発癌抑制効果、発生した肝腫瘍の遺伝子異常を検討する。

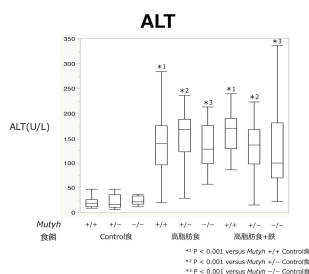
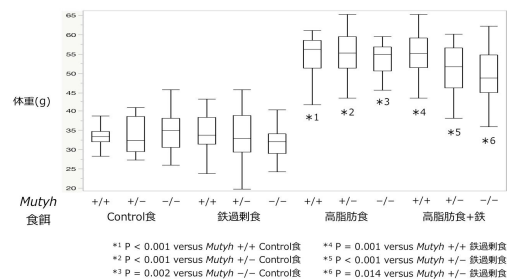


図 2

高脂肪食 (Surwit diet+55%グルコース 45%スクロール水)、高脂肪食+鉄過剰食を与え肝発癌を観察した。



\*1 P < 0.001 versus Mutyh +/+ Control食 \*2 P < 0.001 versus Mutyh +/- Control食 \*3 P < 0.002 versus Mutyh -/- Control食 \*4 P < 0.001 versus Mutyh +/+ 鉄過剰食 \*5 P < 0.001 versus Mutyh +/- 鉄過剰食 \*6 P < 0.014 versus Mutyh +/- 鉄過剰食

表 1

#### 肝発癌

観察期間	食餌	Mutyh	マウス(匹)	肝腫瘍(匹)
9ヶ月	高脂肪食	+/+	20	0 (0%)
	高脂肪食	+/-	18	2 (11%)
	高脂肪食	-/-	23	1 (4%)
	高脂肪食+鉄	+/+	21	0 (0%)
	高脂肪食+鉄	+/-	29	2 (7%)
	高脂肪食+鉄	-/-	20	5 (25%)

本研究の内容に対して同意が得られた脂肪肝、NASH、肝細胞癌患者より末梢血を採取、また組織生検針を用いた肝組織編片の採取と十二指腸検体の採取を行い蓄積している。得られた肝組織ならびに十二指腸組織から RNeasy を用いて total RNA を抽出し cDNA Cycle Kit で cDNA とした。また同時に末梢血単核球も採取保存し、DNAeasy を用いて DNA を抽出し保存中である。しかし解析可能な検体数には到達しておらず、肝発癌者と非発癌者の酸化的 DNA 損傷修復遺伝子の genotyping は今後進行予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Non-alcoholic steatohepatitis induced by induction chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. Yamamoto M, Hori T, Igarashi K, Iesato K, Saito M, Miyanishi K, Kikuchi N, Fujita H, Tsutsumi H. Int J Hematol. 2018 Apr;107(4):390-391 査読あり

Small molecule CP-31398 induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human multiple myeloma. Arihara Y, Takada K, Kamihara Y, Hayasaka N, Nakamura H, Murase K, Ikeda H, Iyama S, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Oncotarget. 2017 Jul 22;8(39):65889-65899 査読有り

Activated p53 with Histone Deacetylase Inhibitor Enhances L-Fucose-Mediated Drug

Delivery through Induction of Fucosyltransferase 8 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells.

Okagawa Y, Takada K, Arihara Y, Kikuchi S, Osuga T, Nakamura H, Kamihara Y, Hayasaka N, Usami M, Murase K, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. PLoS One. 2016 Dec 15;11(12):e0168355 査読あり

Relationship Between Increased Fucosylation and Metastatic Potential in Colorectal Cancer.

Osuga T, Takimoto R, Ono M, Hirakawa M, Yoshida M, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Sato Y, Tamura F, Sato T, Iyama S, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. J Natl Cancer Inst. 2016 Sep 14;108(9). 査読あり

The iron chelator deferasirox induces apoptosis by targeting oncogenic Pyk2/ -catenin signaling in human multiple myeloma. Kamihara Y, Takada K, Sato T, Kawano Y, Murase K, Arihara Y, Kikuchi S, Hayasaka N, Usami M, Iyama S, Miyanishi K, Sato Y, Kobune M, Kato J. Oncotarget. 2016 Sep 27;7(39):64330-64341. 査読有り

BAK is a predictive and prognostic biomarker for the therapeutic effect of docetaxel treatment in patients with advanced gastric cancer.

Kubo T, Kawano Y, Himuro N, Sugita S, Sato Y, Ishikawa K, Takada K, Murase K, Miyanishi K, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Nobuoka T, Hirata K, Takayama T, Mori M, Hasegawa T, Kato J. Gastric Cancer. 2016 Jul;19(3):827-38.

〔学会発表〕(計8件)

宮西浩嗣, 田中信悟、佐藤昌則、櫻田晃、保木寿文、加藤淳二  
NASH/C型肝炎における鉄過剰  
日本臨床ストレス応答学会. 2017年11月5日、  
東京女子医科大学(東京都新宿区)

Koji Miyanishi, Masanori Sato, Shingo Tanaka, Akira Sakurada, Hiroki Sakamoto, Yutaka Kawanano, Toshifumi Hoki, Masayoshi Kobune and Junji Kato. INCREASED DUODENAL IRON ABSORPTION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C AND NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS.

International Biolron Society (IBIS) Biennial World Meeting (Biolron 2017):2017 May 7-11: Los Angeles, USA

Masanori Sato, Koji Miyanishi, Masayoshi Kobune, Toshifumi Hoki, Akira

Sakurada, Tomohiro Kubo, Kazuma Ishikawa, Yutaka Kawano, Junji Kato

\_Abnormal iron metabolism in patients with chronic hepatitis C

Asian Pacific Association for the study of the liver conferences. 2016 Feb 23:Minato-ku, Tokyo

Koji Miyanishi. NASH and Iron  
Asian Pacific Association for the study of the liver conferences. 2016 Feb 23:Minato-ku, Tokyo

田中信悟, 宮西浩嗣, 河野豊, 林毅, 佐藤勉, 佐藤康史, 小船雅義, 瀧本理修, 加藤淳二. 非アルコール性脂肪肝炎からの発癌における酸化的 DNA 傷害の関与についての検討. 日本内科学会講演会. 2013年4月12-14日, 東京国際フォーラム(東京都, 千代田区)

Kato J. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. Fifth Congress of the International Biolron Society (IBIS), Biennial World Meeting (Biolron2013): 2013 Apr 14-18: London, UK

宮西浩嗣, 小船雅義, 加藤淳二. 鉄の肝毒性を考慮した肝疾患における鉄剤の適正使用  
日本鉄バイオサイエンス学会. 2016年9月11日, 名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)

宮西浩嗣, 小船雅義, 加藤淳二. 鉄吸収試験による NASH 患者の鉄代謝異常の機序解明と治療選択への応用.  
日本肝臓学会総会. 2015年5月21日. ホテルキャッスル(熊本県熊本市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮西 浩嗣 (Koji Miyanishi)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60372819

### (2) 研究分担者

加藤 淳二 (Junji Kato)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20244345

### (3) 連携研究者

河野 豊 (Yutaka Kawano)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：80398320