

令和元年6月19日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19335

研究課題名(和文) 高血圧・レニン-アンジオテンシン系制御を介した肥満・NASH関連肝発癌抑制

研究課題名(英文) Suppression of obesity- and NASH-related liver carcinogenesis by regulating hypertension and renin-angiotensin system

研究代表者

河内 隆宏 (Kochi, Takahiro)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：00444282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧・肥満・糖尿病を呈するラットを用いて、レニン-アンジオテンシン系(RAS)の促進を特徴とし、ヒトのメタボリック症候群を反映するモデル動物を新規に作製した。本モデルはヒトNASH類似の肝組織像を呈するほか、高脂肪食・四塩化炭素により肝線維化および肝前癌病変が発生することが確認された。本モデルに対する緑茶カテキンの投与により、肝線維化および肝前癌病変発生が抑制され、肝におけるRASシグナルの抑制がみられたほか、酸化ストレスマーカーが低値となった。すなわち、RASおよび酸化ストレスの制御が、メタボリック症候群に関連する肝線維化・肝発癌の抑制に繋がることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や糖尿病、高血圧をはじめとする生活習慣病の増加は大きな社会問題であり、これらの疾患を合併した慢性肝疾患患者の増加が危惧される。また、NASHに関連した肝細胞癌の更なる増加も予想される。本研究によって、レニン-アンジオテンシン系および酸化ストレスの制御が、メタボリック症候群およびNASHに関連する肝線維化・肝発癌の抑制に繋がることが示唆された。既存あるいは新規の薬剤によって上記の病態を制御することで、肝発癌および肝癌再発のリスクの高い肥満や糖尿病を合併した慢性肝疾患患者、さらにはNASH患者の予後改善が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using rats exhibiting hypertension, obesity and diabetes, an animal model reflecting human metabolic syndrome was newly created, characterized by the promotion of renin-angiotensin system (RAS). In addition to presenting liver histopathology similar to human NASH, this model was also confirmed to show liver fibrosis and liver precancerous lesions by high-fat diet and carbon tetrachloride. Administration of green tea catechins suppressed liver fibrosis and hepatic carcinogenesis, suppressed RAS signaling in the liver, and reduced oxidative stress markers. It was suggested that regulation of RAS and oxidative stress leads to suppression of metabolic syndrome-related hepatic fibrosis and liver carcinogenesis.

研究分野：消化器内科

キーワード：NASH 肝発癌 肥満 高血圧 肝線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患患者の主要死因である肝細胞癌は、本邦のみならず海外においても癌死亡率の上位を占める悪性疾患である。従って、積極的な臨床介入によって発癌化学予防を実践することは、慢性肝疾患・肝細胞癌患者の予後改善に繋がる。近年、肝炎ウイルスの持続感染やアルコールの多量摂取とともに、肥満や糖尿病をはじめとする生活習慣病に伴った様々な病態が、肝細胞癌の発癌・進展に深く関与していることが明らかになりつつある。特に、肥満や糖尿病患者に合併しやすい NASH は、肝組織の炎症や壊死、線維化を伴い、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へ進展することが明らかになってきている。NASH の発生機序としては、肝細胞への中性脂肪の沈着が起こり(1st hit)、さらに酸化ストレス、エンドトキシンなどの肝細胞障害要因(2nd hit)が加わり発症する「two-hit theory」が提唱されているが、その詳細については十分に解明されておらず、適切な治療法や NASH 関連肝発癌に対する予防法も確立されていない。

近年、肥満や糖尿病のみならず高血圧が、NASH の発症・進展や肝線維化に関与している可能性が明らかになってきている。脂肪組織や肝臓など全身の様々な臓器で発現している RAS は、血圧や細胞外容量の調節において重要な役割を果たしているが、脂肪組織における RAS の活性は肥満度に応じて亢進していること、また RAS の main effector であるアンギオテンシン II は、特に肥満状態においてインスリン抵抗性を強く惹起することが報告されている。肝硬変患者において RAS は亢進状態にあること、またアンギオテンシン II は肝星細胞を活性化し、肝臓の炎症・線維化に関与していることが知られており、RAS は慢性肝疾患において病態進展の鍵を握る分子の一つであると考えられている。さらに、癌組織においても RAS は高発現し、癌細胞の増殖や血管新生に深く関連していることが明らかになってきている。我々は今までに、高血圧と RAS の活性化がラットの大腸発癌を促進すること、また RAS の阻害剤が、肥満・糖尿病・高血圧に関連したマウスおよびラットの大腸腫瘍形成を抑制することを報告してきたが(Biochem Biophys Res Commun. 2011, Int J Mol Sci. 2013, Oncol Lett.

2014)、これらの研究結果は、メタボリックシンドロームに伴った発癌を抑制する上で、RAS およびそれに関連した分子異常が重要な標的分子となりうる可能性を強く示唆するものである。メタボリックシンドロームや NASH に関連した肝発癌機序を解明し、新規発癌予防法を開発するためには、これらの病態を適切に反映した動物モデルの作製が重要である。我々は、高血圧・肥満・糖尿病を呈する SHRSP.Z-Lep^{fa}/IzmDmcr(SHRSP-ZF)ラットを用いて、全く新しい肥満・NASH・高血圧関連肝発癌モデルを作成した。本モデルは対照群と比較し、1 高血圧、肥満、高血糖、高インスリン血症、脂質異常症を発症すること、2NASH 様の肝組織像、肝障害、肝線維化を呈すること、3 肝前癌病変 glutathione S-transferase placental form(GST-P)陽性病変(GST-P⁺ foci)の発生が促進していることが確認された(Cancer Lett. 2014)。従って、SHRSP-ZF ラットを用いた本モデルは、よりヒトのメタボリックシンドローム関連肝発癌を反映した動物モデルであると考えられる。

2. 研究の目的

肥満や糖尿病は肝発癌の危険因子である。また、肝細胞癌の発生母地である非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の発症・進展に、肥満・糖尿病に加え高血圧が深く関与していることが明らかになってきている。本研究は、高血圧・肥満・糖尿病を発症する

SHRSP.Z-Lep^{fa}/IzmDmcr(SHRSP-ZF)ラットを用いて作製した、新規 NASH 関連肝発癌モデルを解析することで、1 高血圧、特にレニン-アンギオテンシン系(RAS)の肥満・NASH 関連肝発癌における役割を明らかにすること、また、2 高血圧・RAS の異常に関連した病態・分子

異常を target とする新規肝発癌予防法(薬)を開発し、肥満や糖尿病、高血圧をはじめとする生活習慣病を合併した慢性肝疾患患者、NASH 患者の予後改善をめざすことを目標とする。

3 . 研究の方法

今回の研究では、まず SHRSP-ZF ラットを用いたメタボリックシンドローム関連肝発癌モデルの有用性を検証するとともに、様々な肥満・高血圧症モデル動物を用いた新規肝発癌動物モデルを樹立する。次に、これらの動物モデルや培養細胞系を用いて、メタボリックシンドローム関連肝発癌において critical な役割を果たす新規遺伝子・蛋白・シグナル異常を明らかにする。最終的には、それらの分子異常を標的とする薬剤や、RAS 阻害剤を含むメタボリックシンドローム治療薬、phytochemical 等のメタボリックシンドローム関連肝発癌に対する抑制効果に関する検討を行い、臨床介入試験に向けた データベースの作成・準備をすすめる。

4 . 研究成果

高血圧・肥満・糖尿病を呈する SHRSP-ZF ラットを用いて、レニン-アンジオテンシン系の促進を特徴とし、ヒトのメタボリック症候群を反映していると考えられる、肥満・非アルコール性脂肪肝炎(NASH)・高血圧モデル動物を新規に作製した。本モデルは対照群と比較し、高血圧、肥満、高血糖、高インスリン血症、脂質異常症を呈するとともに、ヒト NASH 類似の肝組織像、肝障害を呈することが確認された。また、SHRSP-ZF ラットに大腸発癌剤 azoxymethane を投与したところ、対照群と比較して大腸前癌病変の発生数が有意に高値であり、その機序としてメタボリック症候群を背景とする慢性炎症や酸化ストレスが、大腸発癌を促進している可能性が考えられた。

SHRSP-ZF ラットに高脂肪食および四塩化炭素を投与することで、肝線維化だけでなく肝前癌病変(glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性病変)の発生も認められた。本モデルに対して緑茶カテキン(EGCG)を飲水投与し、その効果を検討した。その結果、EGCG 投与群において肝線維化および肝前癌病変発生の抑制がみられた。また、血清および肝における mRNA 発現の解析からレニン-アンジオテンシン系シグナルの抑制が考えられたほか、全身および肝における酸化ストレスマーカーが有意に低値であった。すなわち、EGCG によるレニン-アンジオテンシン系および酸化ストレスの制御が、NASH に関連する肝線維化・肝発癌の抑制に繋がったことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件) 下記全ての論文、査読有

1. Shirakami Y, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Ibuka T, Yoshimi K, Kuramoto T, Tanaka T, Shimizu M, Seishima M. Inhibitory effects of pentoxifylline on inflammation-related tumorigenesis in rat colon. *Oncotarget* 2018;9:33972-33981. doi: 10.18632/oncotarget.26119.
2. Ideta T, Shirakami Y, Ohnishi M, Maruta A, Obara K, Miyazaki T, Kochi T, Sakai H, Tomita H, Tanaka T, Blaner WS, Shimizu M. Non-alcoholic steatohepatitis-related liver tumorigenesis is suppressed in mice lacking hepatic retinoid storage. *Oncotarget* 2017;8:70695-70706. doi: 10.18632/oncotarget.

3. Obara K, Shirakami Y, Maruta A, Ideta T, Miyazaki T, Kochi T, Sakai H, Tanaka T, Seishima M, Shimizu M. Preventive effects of the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic mice.
Oncotarget 2017;8:58353-58363. doi: 10.18632/oncotarget.
4. Fukuta K, Shirakami Y, Maruta A, Obara K, Iritani S, Nakamura N, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M. Preventive effects of pentoxifylline on the development of colonic premalignant lesions in obese and diabetic mice.
Int J Mol Sci 2017;18. pii: E413. doi: 10.3390/ijms18020413.
5. Shirakami Y, Sakai H, Kochi T, Seishima M, Shimizu M. Catechins and Its Role in Chronic Diseases.
Adv Exp Med Biol 2016;929:67-90 なし
6. Tanaka T, Kochi T, Shirakami Y, Mori T, Kurata A, Watanabe N, Moriwaki H, Shimizu M. Cimetidine and clobenpropit attenuate inflammation-associated colorectal carcinogenesis in male ICR mice.
Cancers 2016;8:E25. doi: 10.3390/cancers9070080.
7. Miyazaki T, Shirakami Y, Kubota M, Ideta T, Kochi T, Sakai H, Tanaka T, Moriwaki H, Shimizu M. Sodium alginate prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and liver carcinogenesis in obese and diabetic mice.
Oncotarget 2016;7:10448-10458. doi: 10.18632/oncotarget.7249.
8. Hanai T, Shiraki M, Ohnishi S, Miyazaki T, Ideta T, Kochi T, Imai K, Suetsugu A, Takai K, Moriwaki H, Shimizu M. Rapid skeletal muscle wasting predicts worse survival in patients with liver cirrhosis.
Hepatol Res 2016; 46:743-751. doi: 10.1111/hepr.12616.
9. Shirakami Y, Shimizu M, Kubota M, Ohno T, Kochi T, Nakamura N, Sumi T, Tanaka T, Moriwaki H, Seishima M. Pentoxifylline prevents nonalcoholic steatohepatitis-related liver pre-neoplasms by inhibiting hepatic inflammation and lipogenesis.
Eur J Cancer Prev 2016;25:206-215. doi: 10.1097/CEJ.000000000000172.
10. Ohno T, Shimizu M, Shirakami Y, Miyazaki T, Ideta T, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Tanaka T, Moriwaki H. Preventive effects of astaxanthin on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in C57/BL/KsJ-ob/ob obese mice.
Hepatol Res 2016;46:E201-E209. doi: 10.1111/hepr.12550.

〔学会発表〕(計9件)

1. 第77回日本癌学会学術総会 2018年9月29日 大阪
Effects of fatty liver on development of intrahepatic cholangiocarcinoma.
白上洋平, 加藤潤一, 水谷 拓, 河内隆宏, 境 浩康, 富田弘之, 田中卓二, 清水雅仁

2. 第 5 回肝臓と糖尿病代謝研究会 2018 年 7 月 21 日 米子
糖尿病治療薬が肥満に関連する肝疾患に及ぼす影響
白上洋平, 小原功輝, 出田貴康, 河内隆宏, 久保田全哉, 境 浩康, 清水雅仁
3. 14th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Aging Research 2018 年 5 月 31 日 Saga
Anti-diabetic agents for cancer prevention.
Shirakami Y, Kato J, Mizutani T, Kochi T, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M.
4. 第 233 回日本内科学会東海地方会 2017 年 10 月 29 日 岐阜
伝染性単核球症を契機に診断に至った骨盤内異所性副脾の 1 例
福田光希, 勝村直樹, 宮地加奈子, 伊藤貴嗣, 向井美鈴, 本田晴久, 河内隆宏, 戸田勝久, 中村憲昭, 兼村信宏
5. 第 33 回岐阜県病院協会医学会 2017 年 10 月 29 日 岐阜
Volume navigation System を用いた肝細胞癌に対するラジオ波焼灼療法
河内隆宏
6. 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2017 年 9 月 15 日 岐阜
大腸発癌モデルにおけるペントキシフィリンの発癌抑制効果
白上洋平, 河内隆宏, 久保田全哉, 清水雅仁, 清島 満
7. 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2017 年 9 月 15 日 岐阜
糖尿病治療薬 SGLT-2 阻害薬による肥満関連肝発癌の抑制
白上洋平, 小原功輝, 河内隆宏, 境 浩康, 田中卓二, 清水雅仁, 清島 満
8. 第 232 回日本内科学会東海地方会 2017 年 6 月 11 日 名古屋
FISH 法にて bcr/abl 陽性、G-banding 解析にて正常核型であった CML の一例
北方悠太, 兼村信宏, 山内加奈子, 向井美鈴, 伊藤貴嗣, 本田晴久, 河内隆宏, 尾辻健太郎, 勝村直樹
9. JDDW2016 (第 20 回肝臓病学会大会) 2016 年 11 月 4 日 神戸
肝細胞癌患者における腹部大動脈の石灰化は予後に影響する
河内隆宏, 高井光治, 渡邊 諭, 華井竜徳, 今井健二, 末次 淳, 白木 亮, 清水雅仁

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://hosp.gifu-u.ac.jp/1naika/index.html>
6 . 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。