

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19590769

研究課題名（和文） C型慢性肝炎の肝発癌における肝ミトコンドリア障害の意義

研究課題名（英文） The role of hepatic mitochondrial function in carcinogenesis of chronic hepatitis C

研究代表者

是永 匡紹 (KORENAGA MASAOKI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70420536

研究成果の概要：

C型肝炎ウイルス(HCV)が誘導するミトコンドリアからの酸化ストレスは、ウイルス排除のみならず、ウイルス増殖を抑制するだけで抑えられ肝発癌を抑制する可能性がある。また、HCVが誘導する鉄過剰状態は、ミトコンドリア障害のみならず、小胞体ストレスを誘導し、肝脂肪化を増悪させ発癌を促進すると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

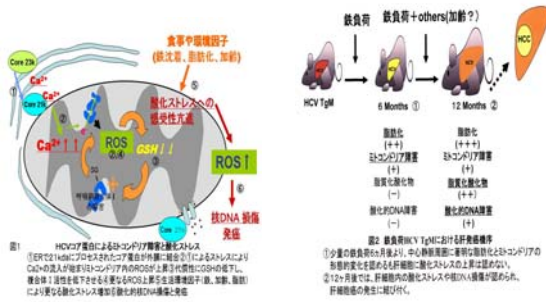
キーワード：ミトコンドリア， 鉄過剰状態， 肝発癌， 酸化ストレス， 小胞体ストレス， HCVTgM

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における肝細胞癌患者の80%以上がC型肝炎ウイルス(HCV)感染に起因しており、その死亡者数も3万人を越え、2015年までは減少しない。しかしながらHCV感染と肝発癌との関係は未だ明らかにされておらず、肝発癌機序を明らかにすることが必要不可欠である。われわれは、これまでにHCVコア蛋白が発現可能な肝癌由来の培養細胞を用いて、コア蛋白が肝ミトコンドリア由来の活性酸素種(ROS)を誘導し、アルコールの酸化ストレス刺激により、ROSが相乗的に増強することを明らかにした(*Gastroenterology* 2005;128:96-107)。更にHCVコア蛋白を組み込んだトランスジェニ

ックマウスにおいて、肝ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの機能障害とミトコンドリア内の抗酸化能(還元型グルタチオン:GSH)が低下していることを報告した(*J Biol Chem.* 2005;280:37481-8)。これによりHCVウイルス蛋白が肝ミトコンドリアに障害を与え酸化ストレスを蓄積して行くことが証明されたが、このモデルでは肝発癌は確認されなかった。そこで、HCV全長遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス(HCVTgM)に少量の鉄負荷を行い、C型肝炎患者に類似した肝内鉄濃度のHCV TgMを作成したところ、このマウスでは、6ヶ月目にミトコンドリアの形態異常と肝脂肪化を認めた後、12ヶ月目には肝内の酸化ストレスが誘導さ

れ、高率に(45%)に肝腫瘍が発生するモデル作成に成功した (Gastroenterology. 2006;130:2087-98)。 (図 1,2)



2. 研究の目的

これまでの検討により、HCV 蛋白単独でのROSの誘導は、ミトコンドリア内の抗酸化能により代償されるも、ミトコンドリアは酸化ストレスに非常に感受性が高い状態になり、鉄沈着や加齢によって、相乗的に酸化ストレスを増強させ、肝発癌を促進させると推測された。C型肝炎における鉄過剰状態は臨床的に明らかにされており、C型肝炎での肝細胞の鉄過剰状態が、長い感染期間に、どの様にミトコンドリアに障害を与え、酸化ストレスを増加させるかは、全く明らかにされていない。そこで、本研究期間内に HCV 蛋白と鉄が更なる、肝ミトコンドリア障害を引き起こすか否かを明らかにし、複合体 I の障害分子とその機序を解明し最終的に肝発癌にどのように関与するのかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 鉄負荷 HCV TgM (肝発癌モデル) におけるミトコンドリア障害機序の解析

HCV TgMのミトコンドリア障害が関与していること及びその障害部位を分子的に明らかにするために、鉄負荷 HCV TgM と control を6カ月に scarify し、マウス肝からミトコンドリアを単離し、以下の検討を行う。

①ミトコンドリア複合体 I 機能解析と外膜蛋白発現の確認

ミトコンドリア酵素活性機能を測定する。また、ミトコンドリア外膜に存在する CPT(カルニチントランスフェラーゼ)-1 の発現によりミトコンドリア障害の有無を確認する

②ミトコンドリア酸化ストレスの測定

凍結標本よりジハイドロエチジウム(DHE)を用いることで、スーパーオキシド(O₂·-)を測定する。この酸化ストレスはミトコンドリアから由来の酸化ストレスを意味する

③小胞体ストレス測定

ミトコンドリア機能障害にCaの流入が関与していること Caの流入に小胞体が関与しており、またHCVは小胞体機能に影響を与えるため、CHOPとXBP1を測定する。

④抗酸化剤投与に機能解析

鉄負荷 TgM に抗酸化剤 (NAC, Vitamin-

E, CoQ10) を6ヶ月投与することで、酸化ストレス抑制効果及び、肝発癌前段階として脂肪化抑制効果を検討し、①~③についても解析を行う

⑤ マイクロアレイによる解析

マウス肝をマイクロアレイで解析し、鉄が引き起こすミトコンドリア障害が、糖・脂肪代謝にどの様に影響を与える検討する。

(2) HCV full length replicon 増殖細胞におけるミトコンドリア障害の解析

HCV replicon 増殖細胞におけるミトコンドリア機能障害の有無と、ウイルス増殖抑制の有無にて、ミトコンドリア機能が回復するかまた、酸化ストレスを抑制するかを検討する。

4. 研究成果

(1) 鉄負荷 HCV TgM (肝発癌モデル) におけるミトコンドリア障害機序の解析

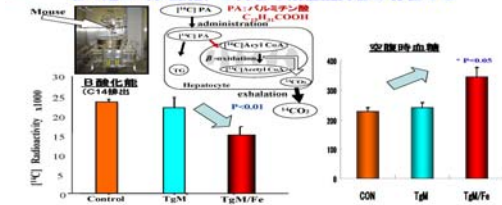
①ミトコンドリア外膜蛋白障害の有無 (図3、4)

外膜に局在するCPT-1の発現低下が確認された。またバロミチン酸分解能も低下し、HCVは鉄過剰状態の存在下で、ミトコンドリアβ酸化能を引き起こし、肝脂肪化を助長し、肝発癌を促進すると考えられた。

鉄負荷 HCV TgM において ミトコンドリア外膜にある CPT1の発現が低下し、CPT1は保たれる=外膜のみ障害



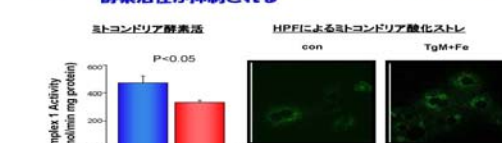
鉄負荷・HCV TgM において長鎖脂肪酸(バロミチン酸)の取り込み(β酸化)が障害と耐糖能障害が存在する

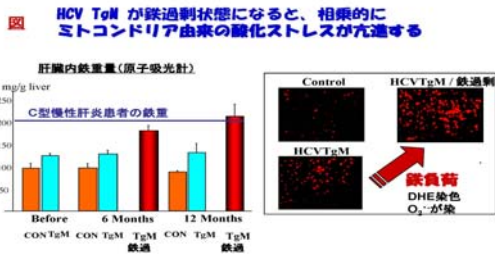


②ミトコンドリア複合体機能解析と酸化ストレス (図5、6)

複合体 I 機能は鉄負荷により、酵素活性が低下したが、蛋白発現に有意差を認めなかった。DHEによる測定では鉄負過剰状態に比例して酸化ストレスが相乗的に増加した。また初代肝細胞を用いて、ミトコンドリアからの酸化ストレスを測定しても、同様な結果が確認された。

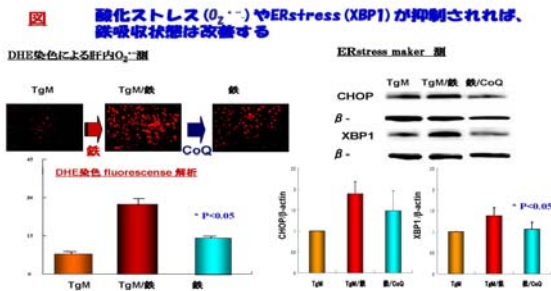
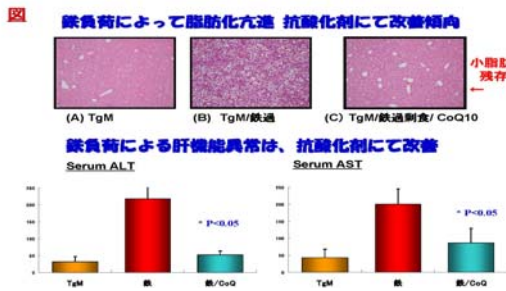
HCV TgM が鉄過剰状態になると、ミトコンドリア酵素活性が抑制される





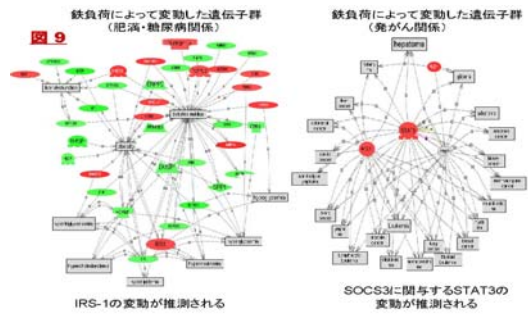
③ミトコンドリア障害と小胞体ストレスの関与 (抗酸化剤投与による比較 図7, 8)

HCV 蛋白と鉄が、ミトコンドリア外膜障害することにより、ミトコンドリア内部へCa²⁺を流入が容易になることが推測された。また細胞内Ca²⁺の流入のセンサーである小胞体機能に着目し、小胞体ストレスマーカーであるCHOPやXBP1の亢進が確認した。そこで、ミトコンドリアからの酸化ストレスを抑制すると、肝脂肪化は改善する。その原因としてXBP1発現は低下が明らかになったがCHOPの発現は低下せず、鉄負荷による小胞体機能への直接的な影響が示唆された。



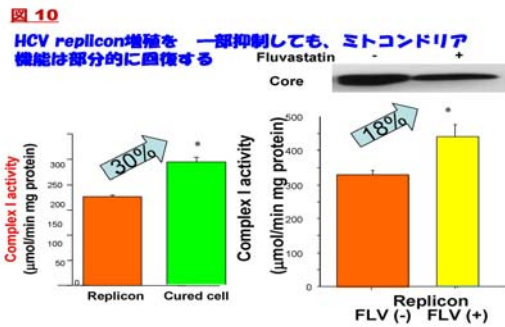
④小胞体ストレスと肝脂肪化 (マイクロアレイによる解析を含む 図9)

小胞体機能異常は、脂肪化を亢進させると報告されるため、脂肪酸合成能(SRBP1c)を測定し、その発現亢進を確認した。また、鉄負荷によりIRS-1の発現亢進とその下流のシグナルが抑制しインスリン抵抗性が出現していること、STAT3などの肝発癌促進遺伝子の発現が亢進していることが確認された。以上より、HCVは、鉄過剰状態を惹起するだけでなく、小胞体ストレスを亢進させることでミトコンドリア障害や脂肪化を相加的に増悪させ、肝発癌に関与すると考えられた。



(2)HCV full length replicon 増殖細胞におけるミトコンドリア障害の解析

① HCV が排除されなくても、減少するだけでミトコンドリア機能が維持されることを確認し、IFNによる長期持続投与とミトコンドリア機能維持による酸化ストレス抑制が、肝発癌抑制に重要であることを報告した。



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5件)

1. Nishina S, Hino K, Korenaga M, 他 9 名 Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* 査読有 34(1):226-38. 2008
2. Ando M, Korenaga M, Hino K 他 8 名 Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication *Liver Int.* 査読有;28(8):1158-66. 2008
3. Korenaga K, Korenaga M, Uchida K 他 5 名 Effects of a late evening snack combined with alpha-glucosidase inhibitor on liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 査読有 38:1087-1097 2008
4. Hidaka I, Hino K, Korenaga M, 他 5 名 Stronger Neo-Minophagen C™, a glycyrrhizin-containing preparation, protects liver against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Liver Int* 査読有、

27、845-53、2007

5. Urata Y, Okita K, Korenaga K, 他 5 名
The effect of supplementation with branched-chain amino acids in patients with liver cirrhosis 37(7):510-6 2007

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. Korenaga M et al: Analysis of gene expression related to the lipid and glucose metabolism in iron-overloaded transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein: 第 59 回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease): 2008.11.01: San Francisco CA USA

2. Korenaga M et al: Analysis of gene expression related to the lipid and glucose metabolism in iron-overloaded transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein: 第 59 回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease): 2008.11.01: San Francisco CA USA

3. Korenaga M et al: Cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q(10) reduces iron-overloaded induced hepatic steatosis in transgenic mice expressing the hepatitis c virus polyprotein. 第 58 回 AASLD(The American Association for the Study of Liver Disease): 2007.11.04: Boston MA USA

4. Korenaga M et al: Inhibition of viral replication prevents HCV-induced mitochondrial respiratory dysfunction in a genome-length replicon system. APDW (Asian Pacific Digestive Week) 2007: 2007.10.18. Kobe Japan.

〔図書〕 (計 1 件)

是永 匡紹; メディカルジャーナル社: 酸化ストレスと肝疾患第 4 巻
C 型肝炎ウイルスが惹起する肝脂肪化と酸化ストレス 2008 36-42

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

是永 匡紹 (KORENAGA MASAOKI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 19590769

(2) 研究分担者

日野 啓輔 (HINO KEISUKE)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80228741

是永 圭子 (KORENAGA KEIKO)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60420535

(3) 連携研究者 なし