

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590782

研究課題名(和文) 肝発癌における鉄代謝異常と脂質代謝異常のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between iron metabolic disorder and lipid metabolic disorder in hepatocarcinogenesis

研究代表者

日野 啓輔 (Hino Keisuke)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228741

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)全遺伝子を発現するトランスジェニックマウス(HCV TgM)に鉄を負荷して肝発癌を引き起こすモデルを用いて、肝発癌過程における鉄代謝異常が脂質代謝異常を引き起こす機序を明らかにした。すなわち鉄代謝異常による肝内鉄蓄積が酸化ストレスを増強してミトコンドリア障害ならびに小胞体ストレスを惹起し、 β 酸化障害や脂質関連転写因子である SREBP1 を活性化して肝内脂肪蓄積を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Metabolic disorders such as iron overload and/or fatty deposition in the liver are one of the well-known pathophysiological features in hepatitis C virus (HCV)-associated hepatocarcinogenesis. Using male transgenic mice expressing the HCV polyprotein which develop hepatic steatosis followed by hepatocellular carcinoma in the presence of hepatic iron overload, we investigated the mechanisms by which hepatic iron overload contributed to the development of hepatic steatosis. Hepatic iron levels were positively correlated with triglyceride concentrations in the liver. Iron-related oxidative stress aggravated mitochondrial injury leading to reduced expression of carnitine palmitoyl transferase I, and induced unfolded protein response which in turn increased the expression of sterol-regulatory element binding protein I, a transcription factor involved in lipid synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成22年度	600,000	180,000	780,000
平成23年度	0	0	0
平成24年度	0	0	0
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：C型肝炎ウイルス・肝発癌・鉄代謝・肝脂肪化・ミトコンドリア・小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

HCV感染からの肝発癌機序として酸化ストレスが重要な役割を果たすことはよく知られた事実である(Cancer Res 2001;61:4365-70)。われわれもこれまでにHCVが惹起する酸化ストレスの観点から肝発癌機構の解析を行っ

てきた。HCVコアタンパクがミトコンドリア電子伝達系複合体Iの酵素活性を阻害し(J Biol Chem 2005;280:37481-8)、ミトコンドリア由来の活性酸素を産生すること(Gastroenterology 2005;128:96-107)、HCV全遺伝子を組み込んだトランスジェニック

マウス (HCV TgM) では HCV タンパクによる活性酸素を介して鉄調節ホルモンである hepcidin の転写を抑制することで肝内鉄濃度の上昇を引き起こし (Gastroenterology 2008; 134:226-38)、加えて僅かな鉄負荷を行い C 型慢性肝炎患者に匹敵する肝内鉄濃度に達すると著明な肝脂肪化、ミトコンドリア障害、酸化的 DNA 障害を経て高率に肝発癌すること (Gastroenterology 2006; 130:2087-98) を報告してきた。すなわち、HCV の惹起する鉄過剰状態が HCV 自体により引き起こされる酸化ストレスの増強因子となることで肝発癌が促進されることを明らかにした。興味深いことにこの鉄負荷肝発癌モデルにおいて肝内の鉄濃度の上昇に伴い肝細胞内の脂肪蓄積が亢進した。HCV コア遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (Core TgM) の肝脂肪化、肝発癌において脂肪酸合成等の転写因子である SREBP 1c (sterol regulatory element-binding protein 1c) の活性亢進が報告されており (PNAS 2007; 104:1661-6)、HCV 関連肝発癌機構における脂質代謝異常の重要性が認識されている。一方、脂質による酸化ストレスが細胞内の iron homeostasis を変化させることも報告されている (J Clin Invest 1995; 95:2104-10)。

2. 研究の目的

先に述べたような背景から、本研究では C 型慢性肝炎において引き起こされる代謝異常のうち、鉄代謝異常と脂質代謝異常に注目し、両者がどのようにかかわりあっているかを明らかにすることによって、HCV 関連肝発癌機構の一端を明らかにし、さらにこの代謝異常を改善、抑制しうる治療介入の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

肝発癌を来たす鉄負荷 HCV TgM、鉄負荷なし HCV TgM、鉄負荷コントロールマウス、鉄負荷なしコントロールマウスの 4 群を設定し、鉄負荷による脂肪蓄積機構を脂肪酸合成と分解の両面から解析した。脂肪酸合成系については転写因子 SREBP 1c 等の発現を解析する。脂肪酸分解については ³H 標識パルミチン酸を用いた *in vivo* 脂肪酸分解能やβ酸化の律速酵素である carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) と CPT II の発現レベルを測定した。

小胞体ストレスは転写後に SREBP 1c の発現を促進することが報告されている。そこで HCV TgM における鉄代謝異常と脂質代謝異常の接点として小胞体ストレスに注目し、unfolded protein response (UPR) のシグナル経路についても解析する。鉄負荷により小胞体ストレスが誘導された場合は、鉄負荷

HCV TgM に N-acetylcysteine (NAC) 等の抗酸化剤を投与することで、脂質代謝異常が改善されるか否かについても検討した。

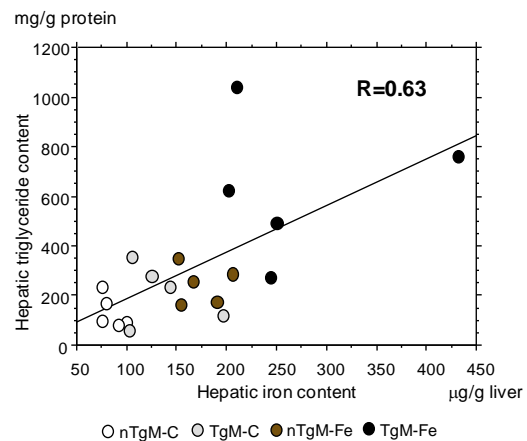
また、抗ウイルス療法不能な高齢者に対する肝発癌抑制を目指した治療介入の可能性を検討するために、本邦において長年肝庇護剤として使用されてきたグリチルリチン製剤 (SNMC) の抗酸化作用、抗ミトコンドリア作用、脂質代謝改善作用についても併せて検討した。

4. 研究成果

① 鉄負荷 HCV TgM における小胞体ストレスを介した肝脂肪蓄積

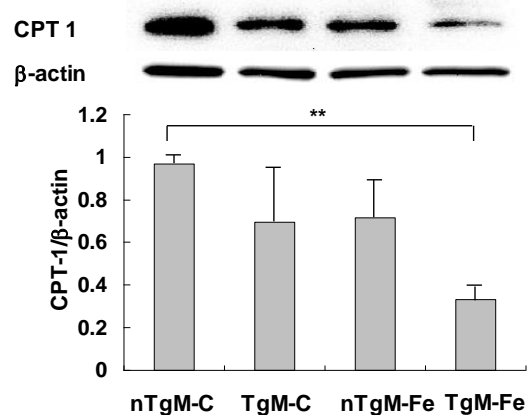
8 週齢の HCV TgM に carbonyl iron 225 mg/kg diet を含む鉄過剰餌を 6 ヶ月間投与すると、図 1 に示すように肝内鉄濃度と中性脂肪濃度は有意な正の相関を示し、鉄負荷により肝脂肪化が促進されることが明らかとなった。

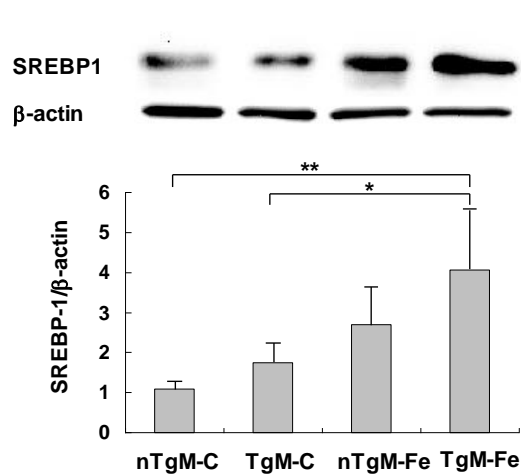
図 1



鉄過剰により肝脂肪化が引き起こされる機構として、図 2 に示すようにβ酸化の律速酵素である CPT I の発現低下と、逆に脂質合成を正に制御する転写因子である SREBP 1c の発現が亢進していた。

図 2

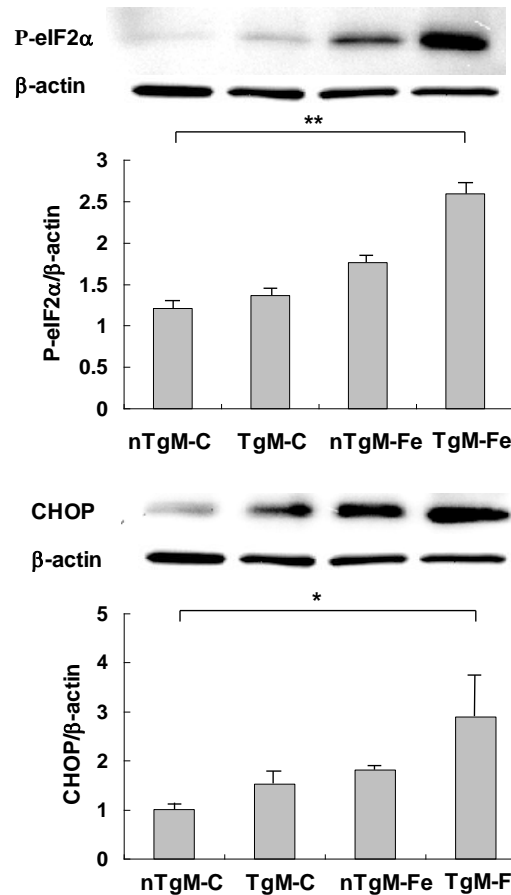
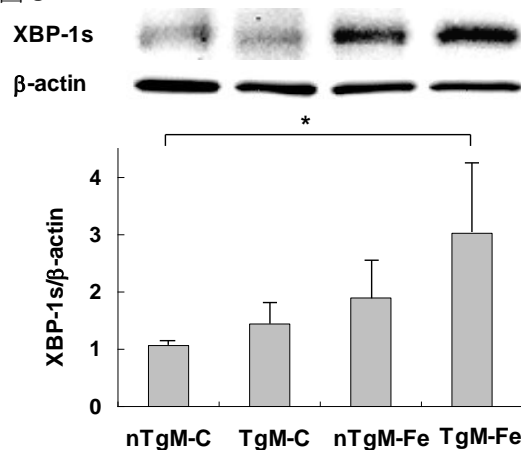




この鉄負荷 HCV TgM では *in vivo* 脂肪酸分解能が低下していることを以前に報告したが (Gastroenterology 2006; 130: 2087-98)、CPT I の発現低下はこの成績を裏付けるものと考えられる。また HCV コアタンパクがミトコンドリア外膜に存在することを報告したが (J Biol Chem 2005;280:37481-8)、ミトコンドリア外膜に存在する CPT I の発現低下はこの成績とも矛盾しない。しかし、脂質合成を正に制御する SREBP 1c の発現に伴い、その下流の fatty acid synthetase (FAS) の発現も亢進していた点を考慮すると、脂肪酸合成中間体である malonyl-CoA による CPT I の negative feedback の可能性も考慮する必要がある。

次に、SREBP 1c の発現亢進が小胞体ストレスを介するの否かを明らかにする目的で UPR シグナルを解析したところ、図 3 に示すように鉄負荷 HCV TgM では X-box DNA-binding protein 1 (XBP-1) の splicing, eukaryotic inhibition factor-2α (eIF2α) のリン酸化、CCAAT/enhancer-binding protein homology protein (CHOP) の発現が亢進しており、小胞体ストレスが引き起こされていることが明らかとなった。

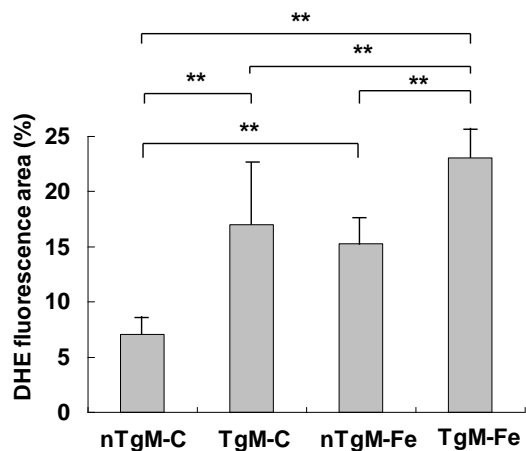
図 3



このように小胞体ストレスの亢進が確認されたが、なぜ小胞体ストレスが亢進しているのかを明らかにするために肝内の酸化ストレス状態について検討した。

Dehydroethidium 染色を行い肝内の活性酸素 (superoxide) を定量化したところ、鉄負荷 HCV TgM の肝臓において有意に活性酸素の産生が亢進していた (図 4)。

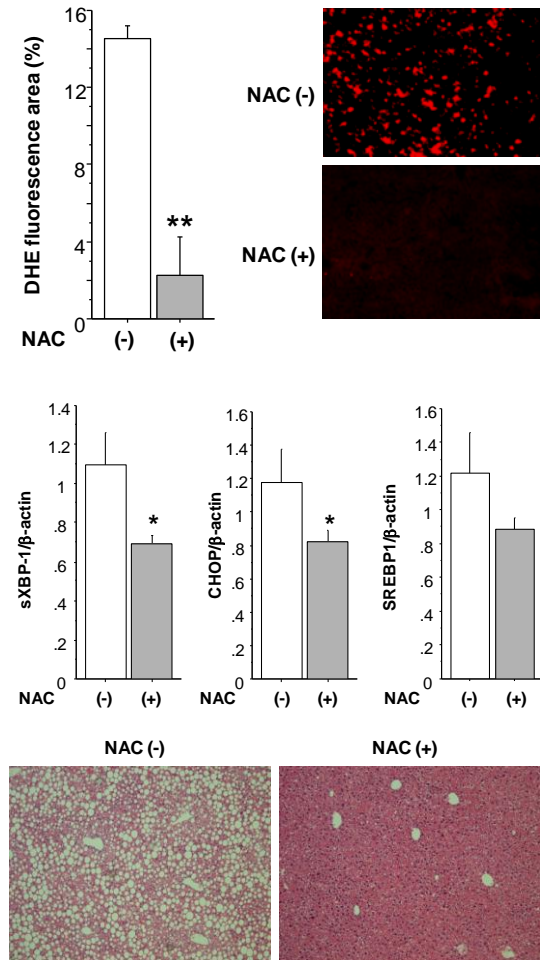
図 4



更に本モデルにおいて酸化ストレスが真に小胞体ストレスを亢進させているの否かを明らかにするために、HCV TgM に鉄過剰餌

とともに抗酸化剤である N-acetyl cystein (NAC) を 6 ヶ月間投与したところ、肝内活性酸素の減少とともに UPR シグナルは抑制され、SREBP 1c の発現低下とともに、肝内の脂肪化は著明に抑制された (図 5)。

図 5

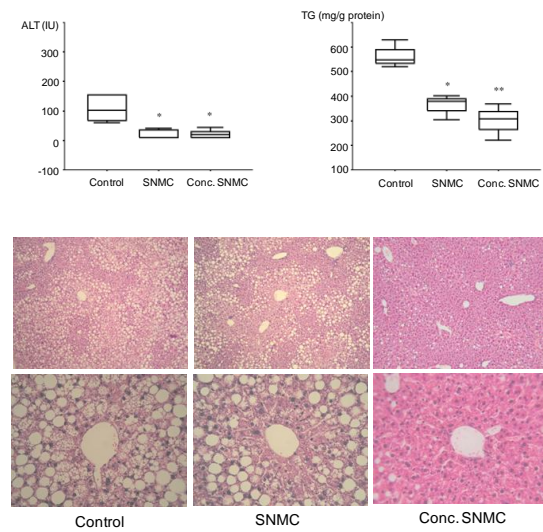


② グリチルリチン製剤 (SNMC) の抗酸化作用、抗ミトコンドリア作用、脂質代謝改善作用

このような HCV タンパクに起因する酸化ストレスと脂質代謝異常を改善するには HCV の排除が望ましいことは明らかであるが、本邦の C 型慢性肝炎患者は非常に高齢化しており、副作用などのためにインターフェロンなどの抗ウイルス療法が行えないことも多い。一方、SNMC は副作用が殆どない肝庇護剤として高齢者の慢性肝炎患者にも長く使用され、retrospective ながら肝発癌抑制効果も報告されている。そこで本モデルを用いて SNMC の抗酸化作用、脂質代謝改善作用について検討した。

鉄負荷 HCV TgM に SNMC、あるいは 7 倍濃縮の SNMC (conc. SNMC) を週 3 回 6 ヶ月間腹腔内投与したところ、図 6 に示すように血清 ALT 値と肝内中性脂肪含有量は有意に低下した。

図 6



SNMC は肝内鉄濃度には影響を与えなかったが、ミトコンドリアの超微形態を用量依存的に改善した (図 7)

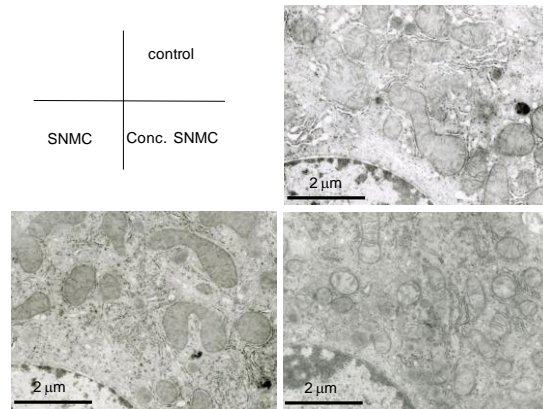
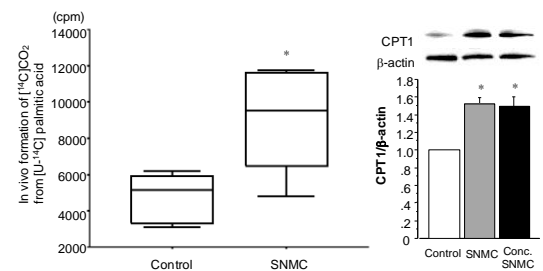
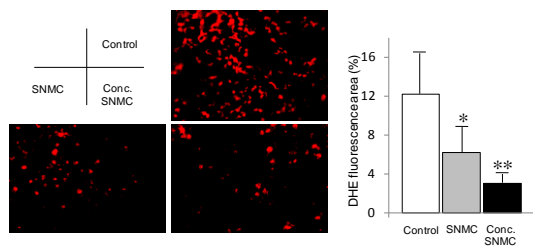


図 7

ミトコンドリアの形態改善と一致して、SNMC は鉄負荷 HCV TgM の脂肪酸分解能 (β 酸化能) を改善し、CPT I の発現を回復させ、肝内の活性酸素の産生を抑制した (図 8)。このように SNMC は主としてミトコンドリア保護作用を介して肝内酸化ストレスを抑制し、肝脂肪化を抑制したが、小胞体ストレスの改善効果は殆ど認めなかった。

図 8





③ まとめ

本研究において HCV タンパク存在下で僅かな酸化ストレス増強因子として鉄負荷を行うと、ミトコンドリア障害によりβ酸化の律速酵素である CPT 1 の発現低下を来すとともに、小胞体ストレスが亢進して脂質合成転写因子である SREBP 1c の発現が上昇し、肝内脂肪化が引き起こされることが明らかとなった。これらの結果はC型慢性肝疾患からの肝発癌過程で観察される肝内鉄蓄積、脂肪蓄積の病態を部分的に説明するものと考えられた。また、本邦において長く慢性肝炎の治療薬として使用されている SNMC は主としてミトコンドリア保護作用を介して、HCV タンパクに起因する脂質代謝を改善し、ひいては肝発癌を抑制する可能性が示唆された。

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 16 件)

- ① Tomiyama Y, Yoshioka N, Yanai Y, Kawase T, Nishina S, Hara Y, Yoshida K, Korenaga K, Korenaga M, Hino K. Type I interferon receptor in peripheral blood mononuclear cells may predict response to intraarterial 5-fluorouracil/interferon combination therapy for advanced hepatocellular carcinoma -a pilot study- *Hepat Med* 2011;3:45-52. 査読有
- ② Doi N, Tomiyama Y, Kawase T, Nishina S, Yoshioka N, Hara Y, Yoshida K, Korenaga K, Korenaga M, Moriya T, Urakami A, Nakashima O, Kojiro M, Hino K. Focal nodular hyperplasia-like nodule with reduced expression of organic anion transporter 1B3 in alcoholic liver cirrhosis. *Intern Med* 2011;50:1193-9. 査読有
- ③ Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, sato Y, Imamura M, Murata K, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsushashi H, Orito E, Kani S, Tanaka Y, Mizokami M. The rs80999 polymorphism, determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated interferon-α/ribavirin therapy in Japanese patients than other SNPs associated with IL28B. *J Clin Microbiol* 2011;49:1853-60. 査読有
- ④ Matsuura K, Tanaka Y, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled study. *Hepatol Res* 2011;41:505-11. 査読有
- ⑤ Korenaga M, Hidaka I, Nishina S, Sakai A, Shinozaki A, Gondo T, Furutani T, Kawano H, Sakaida I, Hino K. A glycyrrhizin-containing preparation reduces hepatic steatosis induced by hepatitis C virus protein and iron in mice. *Liver Int* 2011;31:552-60. 査読有
- ⑥ Yanagihara M, Tsuneoka H, Hoshida S, Ishido E, Umeda A, Tsukahara M, Nojima J, Ichihara K, Hino K, Hirai I, Yamamoto Y. Molecular typing of Bartonella henselae DNA extracted from human clinical specimens and cat isolates in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;60:44-8. 査読有
- ⑦ Nishina S, Korenaga M, Hidaka I, Shinozaki A, Sakai A, Gondo T, Tabuchi M, Kishi F, Hino K. Hepatitis C virus protein and iron overload induce hepatic steatosis through the unfolded protein response in mice. *Liver Int* 2010;30:683-92. 査読有
- ⑧ Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). *Hepatol Res* 2010;40:347-68. 査読有
- ⑨ Tanaka Y, Nsihsida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita Y, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009;41:1105-9. 査読有
- ⑩ Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in severe

combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mouse with human hepatocytes.

Gastroenterology 2009;136:652-62. 査読有

- ⑪ Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanak E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, Okanoue T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol* 2009;47:1476-83. 査読有
- ⑫ Korenaga K, Korenaga M, Furukawa M, Yamasaki T, Sakaida I. Usefulness of Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography for hepatocellular carcinoma: comparison with pathological diagnosis and superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images. *J Gastroenterol* 2009;44:733-41. 査読有
- ⑬ Nishina S, Hino K, Korenaga M, Vecchi C, Pietrangelo A, Mizukami Y, Furutani T, Sakai A, Okuda M, Hidak I, Okita K, Sakaida I. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* 2008;134:226-38. 査読有
- ⑭ Ishida H, Wong JB, Hino K, Kurikawa F, Nishina S, Sakaida I, Okita K, Tamesa T, Oka M, Torimura T, Sata M, Takahashi S, Chayama K, Inoue Y. Validating a Markov model of treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Methods Inf Med* 2008;47:529-40. 査読有
- ⑮ Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int* 2008;28:1158-66. 査読有
- ⑯ Korenaga K, Korenaga M, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. Effects of a late evening snack combined with alpha-glucosidase inhibitor on liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2008;38:1087-97. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Korenaga M, Hino K, et al. Iron induced oxidative stress inhibits viral replication in full genomic hepatitis C virus replicon cells. The 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of

Liver Disease November 4, 2010 Boston, USA.

- ② Korenaga M, Hino K, et al. Glycyrrhizin reduces hepatic steatosis induced by hepatitis C virus protein and iron overload in mice. The 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease November 4, 2010 Boston, USA.
- ③ Korenaga M, Nishina S, Hino K, et al. Inhibition of the oxidative stress reduces hepatic iron overload through the upregulation of hepcidin level in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease November 3, 2009 Boston, USA.
- ④ Nishina S, Hino K, Korenaga M, et al. Iron overload causes hepatic steatosis through the endoplasmic reticulum stress in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease November 2, 2008 Boston, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

是永 匡紹 (KORENAGA MASA AKI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70420536

(3) 連携研究者

権藤 俊一 (GONDO TOSHIKAZU)
山口大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30221253