

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590849

研究課題名（和文） 通常食で自然肝発癌する非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスにおける発癌の分子機構

研究課題名（英文） Mechanisms involved in spontaneous development of hepatocellular carcinoma in mouse model of non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

西原 利治 (SAIBARA TOSHIJI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：60145125

研究成果の概要（和文）：本モデルマウスでは8週齢より脂肪合成と $\beta$ 酸化が増強され、脂肪肝が生じた。スカベンジャーレセプターやカタラーゼの発現増強、IL-1やIL-8の発現も亢進し、肝内で炎症性細胞浸潤が生じた。エストロゲンの投与はこの変化を減弱させ、肝発癌をも抑制した。PPAR- $\alpha$ の持続的な高度の活性化に伴う酸化ストレスは肝発癌に重要な役割を果たすことから、この機序を介した抗発癌薬の開発の必要性が示された。

研究成果の概要（英文）：This model mouse developed enhanced fatty acid synthesis and its beta-oxidation at the age of 8 weeks. These changes resulted in inflammatory cell infiltration induced by enhanced mRNA expression of scavenger receptor, catalase, IL-1, and IL-8. Supplementation of estradiol attenuated these changes significantly. Accelerated PPAR-alpha is a well-known risk factor for the development of hepatocellular carcinoma and its effective attenuation in such situation could be a novel strategy for the management of NASH patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：肝臓学・NASH

## 1. 研究開始当初の背景

NASHではどのような遺伝的素因を基に肝細胞傷害が生じ、線維化が生じるのか解明を進め、6つの遺伝子座がNASHの発症・進展と密に関連することを明らかにした(J Hepatol 40:781-786,2004, Alcohol Clin Exp Res 28:106S-110S,2004, J Hepatol 46:915-920,2007)。これらの遺伝子多型は日本人に高頻度

に検出され、日本人が本症に罹患するリスクが高い要因と考えられる。また、薬物性NASHの一部症例(例えば tamoxifen-induced NASH)では肝臓における脂肪酸 $\beta$ 酸化能の低下が顕著であることも明らかにした(J Clin Invest 105:1819-1825,2000, Hepatol Res 22:278-287,2002)。また、機能の明確でなかった蛋白が肝臓における脂肪酸 $\beta$ 酸化能を制

御する律速蛋白であることを分子イメージング法 (Hepatol Res 33:105-109, 2005) により明らかとし、肝臓における脂肪酸酸化能低値の原因であることを明らかとし、治療効果の判定にも利用できることを示した (国際特許出願中)。また、関連病態や治療法についても報告してきた (Hepatology 45:1375-81, 2007, Chest 131:1387-1392, 2007, Circ J 71:1293-8, 2007, J Endocrinol 2008 Jul 24. [Epub ahead of print])。'08年度より厚生労働省科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業の班員として肝硬変への進展の阻止方策を探っている。そこで今回、NASHのもう一つの側面である肝細胞癌の発生母地としての役割に関する研究を始めたいと考えた。

## 2. 研究の目的

MCD diet は脂肪肝炎を惹起する有力な手法で、肝発癌も惹起できる。しかし、栄養障害による高度の“痩せ”を背景とする系が、肥満を背景とする脂肪肝炎における肝発癌のモデルとして有用かという点については疑問が残る。肝発癌性のないことが確立されている脂肪肝惹起性遺伝子改変マウス ArKO と TNF- $\alpha$  関連遺伝子改変マウスを用いて、自然肝発癌をきたすモデルの開発を行った。このモデル動物は通常食で飼育しても脂肪肝を自然発症し、肝細胞癌を自然発症する。しかも、エストロゲン投与で発癌抑制が可能であるとの予備的知験を得ることができた。ヒト・動物を問わず肝発癌は雄に高率である。エストロゲンにより発癌が抑制できるモデルの開発は肝発癌の性差を考える上で重要であるのみならず、肝発癌を低減させる手法として臨床応用できる可能性が高い。近時、化学発癌モデルで IL-6 の反応性の差が肝発癌における性差をもたらすのではないかとする論文が発表されたが、このモデルはエストロゲンによる IL-6 制御を解析する上では有用なモデルである。

そこで、今回の研究では、この新たに開発したモデルマウスを十分な数量準備した上で、既知の癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子、脂肪酸代謝関連遺伝子等の発現を経時的に追跡し、このモデルマウスの肝発癌過程で酸化ストレス・スカベンジャーがどのようにかかわっているのか、エストロゲンは IL-6 の過剰発現を低減することが可能かなど肝発癌に関与すると想定される遺伝子群の関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

血中エストロゲン量が極めて低値で脂肪肝を自然発症する ArKO マウスはすでに開発済み (J Clin Invest 105:1819-1825, 2000) である。今回はこのマウスと TNF- $\alpha$  関連遺伝子改変マウスを交配し、通常食で飼育しても脂肪

肝を経て自然肝発癌をきたすモデル動物を開発できた。さらに、外因性にエストロゲンを投与することで発癌抑制が可能であるとの予備的成果を得ている。そこでこのモデルマウスの肝発癌過程で、既知の癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子、脂肪酸代謝関連遺伝子等の発現を経時的に追跡し、脂肪酸代謝・酸化ストレス・スカベンジャーがどのようにかかわっているのか、発癌に関与すると想定される遺伝子群の関与についてマイクロアレイを用いて網羅的に検索する。確認は Northern blot で行い、発癌に至る過程を経時的に追跡する。また、シグナル伝達の重要な経路については Western blot を用いて蛋白の発現量やリン酸化の強さも検討する。また、エストロゲンによるインスリン抵抗性解除やエストロゲンによる IL-6 の過剰発現抑制の分子機構についても検討し、エストロゲンアゴニストで代替可能か検討する。

## 4. 研究成果

本モデルマウスでは8週齢より脂肪酸合成酵素の発現が増強されて徐々に脂肪肝が形成された。それと共に PPAR- $\alpha$  の発現が誘導され、脂肪酸代謝関連遺伝子等の発現も経時的に増強された。このモデルマウスでは、脂肪の合成と $\beta$ 酸化が同時に増強され、スカベンジャーレセプターやカタラーゼ、SOD の発現が増強されると共に、肝内で炎症性細胞浸潤も惹起され、IL-1やIL-8の発現も亢進し、肝発癌へと進展した。エストロゲンの投与は脂肪酸合成酵素の発現を抑制し、脂肪肝の発現を抑制した。また、脂肪酸の $\beta$ 酸化を低下させることもできた。その結果、IL-1やIL-6の過剰発現、炎症性細胞浸潤は著明に軽減され、肝発癌も抑制した。すでによく知られているように PPAR- $\alpha$  の高度で持続的な活性化はミトコンドリアに過酸化脂質の蓄積をきたし、ミトコンドリアから大量のフリーラジカルを放出させることが可能であり、肝発癌を惹起する。今回のモデルでも、PPAR- $\alpha$  の持続的な活性化が肝発癌に重要な役割を果たすことが示された。

## 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 20 件)

- ① Taniuchi K, Saibara T: BART inhibits pancreatic cancer cell invasion by Rac1 inactivation through direct binding to active Rac1. Neoplasia (in press) 査読有, 2012.
- ② Koike K, Shima T, Kanbara Y, Saibara T (12名中7番目); The Japan NASH Study Group: Clinical and pathological progression of non-alcoholic

- steatohepatitis to hepato- cellular carcinoma. *Hepatol Res*, 査読有, 2012, (in press)
- ③ Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T; JSG-NAFLD : Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol*. 査読有, 2012 Feb 11. [Epub ahead of print]  
DOI: 10.1007/s00535-012-0533-z
- ④ Taniuchi K, Saibara T: BART inhibits pancreatic cancer cell invasion by PKC alpha inactivation through binding to ANX7. *PLoS One*, 査読有, 2012, 7:e35674  
DOI: 10.1371/journal.pone.0035674
- ⑤ Sumida Y, Yoneda M, Saibara T, (19 名中 13 番目) : Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol*. 査読有, 2012;12:2. DOI:10.1186/1471-230X-12-2
- ⑥ Masuda K, Ono M, Saibara T(10 名中 10 番目) : Usefulness of Technetium-99 m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile liver scintigraphy for evaluating disease activity of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 査読有, 2012, 42:273-279.  
DOI:10.1111/j.1872-034X.2011.00923.x
- ⑦ Toda K, Hayashi Y, Ono M, Saibara T : Impact of ovarian sex steroids on ovulation and ovulatory gene induction in aromatase-null mice. *Endocrinology* , 査読有, 2012, 153:386-394.  
DOI: 10.1210/en.2011-1462
- ⑧ Yoneda M, Fujii H, Saibara T, (18 名中 13 番目); Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD) : Platelet count for predicting fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* , 査読有, 2011;46:1300- 1306.  
DOI: 10.1007/s00535-011-0436-4
- ⑨ Ono M, Ochi T, Munekage K, Ogasawara M, Saibara T(9 名中 9 番目) : Angiotensinogen gene haplotype is associated with the prevalence of Japanese non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*, 査読有, 2011;41:1223-1229.  
DOI:10.1111/j.1872-034X.2011.00883.x
- ⑩ Taniuchi K, Cemy RL, Tanouchi A, Kohno K, Kotani N, Saibara T, Hollingsworth MA : Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 promotes pancreatic cancer cell growth. *Oncogene* , 査読有, 2011;30:4843-4854. DOI:10.1038/onc.2011.194
- ⑪ Taniuchi K, Iwasaki S, Saibara T: BART inhibits pancreatic cancer cell invasion by inhibiting ARL2-mediated RhoA inactivation. *Int J Oncol*, 査読有, 2011;39:1243-1252.  
DOI: 10.3892/ijo.2011.1156.
- ⑫ Koga M, Saito H, Mukai M, Saibara T, Kasayama S : Serum dehydroepiandrosterone sulphate levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Internal Med* , 査読有 2011;50:1657-61.  
DOI:10.2169/internalmedicine.50.4682
- ⑬ Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Saibara T, (17 名中 9 番目); Japan NASH Study Group, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan : Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* , 査読有, 2011;9:428-433.  
DOI:10.1016/j.cgh.2011.01.023
- ⑭ Ogasawara M, Hirose A, Saibara T, (15 名中 14 番目): A novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold thioglucose and a high-fat diet. *Liver Int*. 査読有 , 2011;31:542-551. DOI:10.1111/j.1478-3231.2010.02443.x
- ⑮ Sumida Y, Yoneda M, Saibara T, Okanoue T(18 名中 14 番目); Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD) : A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*, 査読有 2011;46:257-268.  
DOI : 10.1007/s00535-010-0305-6
- ⑯ Asanuma T, Ono M, Kubota K, Hirose A, Hayashi Y, Saibara T, (12 名中 6 番目) : Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 査読有, 2010, 59:258-266. DOI:10.1136/gut.2009.176651
- ⑰ Hidaka M, Iwasaki S, Matsui T, Saibara T, (14 名中 12 番目) : Efficacy of

bezafibrate for chronic GVHD of the liver after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplantation, 査読有, 2010, 45: 912-918. DOI:10.1038/bmt.2009.251

- ⑱ Toda K, Hayashi Y, Saibara T: Deletion of tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor type 1 exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis in aromatase knockout mice. Biochim Biophys Acta, 査読有, 2010, 1801: 655-664.  
DOI: 10.1016/j.bbali.2010.03.002
- ⑲ Yoshioka S, Hamada A, Jobu K, Saibara T, (10名中8番目): Effects of *Eriobotrya Japonica* seed extract on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. J Pharmacy and Pharmacology, 査読有, 2010, 62, 241-246.  
DOI: 10.1211/jpp.62.02.0012
- ⑳ Harada N, Soejima Y, Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Saibara T, Nishizaki T, Maehara Y: Recurrent familial hypobeta lipoproteinemia-induced non-alcoholic fatty liver disease after living donor liver transplantation. Liver Transpl. 査読有, 2009;15:806-809.  
DOI: 10.1002/lt.21766

[学会発表] (計 11 件)

- ① 小野正文: Gold-thioglucoose と高脂肪食を用いた NASH 患者類似の NASH モデルマウスの作成, 第 97 回日本消化器病学会総会、2011/05/13, 京王プラザホテル東京,
- ② Ono M: Angiotensinogen gene haplotype associate with the prevalence of Japanese NASH. 46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. 2011. March 30-April 3, Internationales Congress Centrum (ICC) Berlin, Germany
- ③ Saibara T: Genetic Predisposition to NAFLD/NASH, 9<sup>th</sup> Japan Society of Hepatology single topic conference 2010. 招待講演 Nov 18 2010, Tokyo Japan
- ④ Saibara T: Clinical feature and therapeutic strategy for tamoxifen-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Prague Hepatology Meeting 2010. 2010. 9.16. Prague Czech,
- ⑤ Saibara T: Therapeutic strategy of primary and secondary NASH. The 96<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society

of Gastroenterology. Symposium {NASH-Current Insights in Pathogenesis and Clinical Aspects} 朱鷺メッセ, Niigata Japan 2010. 4. 22

- ⑥ Ono M: Gold-thioglucoose with high fat diet provides comprehensive mice models of NASH. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 2010 Apr 14-18, Vienna Austria
- ⑦ Ono M: Novel comprehensive animal models of NASH treated with gold-thioglucoose. The 60<sup>th</sup> Annual meeting of the American Association for the study of Liver Disease. 2009. 10. 31. MA - Hynes Convention Center, Boston USA
- ⑧ 越智経浩: メタボリックシンドロームにおける NASH 線維化進展への影響 第 13 回日本肝臓学会大会パネルディスカッション 7; 消化器疾患と生活習慣病、京都、2009. 10. 15
- ⑨ Ono M: The evaluation of hepatic mitochondrial fatty acid beta-oxidation in NASH patients using 123I-BMIPP scintigraphy. EASL special conference NAFLD/NASH and related metabolic disease, 2009. 9. 24, Bologna Italy.
- ⑩ 廣瀬 享: NASH 肝線維化におけるアンギオテンシン II タイプ 1 レセプター活性化機序の解明, 第 45 回日本肝臓学会総会 神戸、兵庫 2009. 06. 04.
- ⑪ 小野正文: ゴルジ装置の機能に影響を与える遺伝子の遺伝子多型は風船様肝細胞の危険因子である, 第 95 回日本消化器病学会総会 ワークショップ 12: NAFLD の経時的進展、札幌、2009. 05. 09

[図書] (計 3 件)

- ① 西原利治 他: 中外医学社, 8 非アルコール性脂肪性肝疾患, 林紀夫・日比紀文・上西紀夫・下瀬川徹編, Annual Review 消化器 2012, 139-144
- ② 西原利治 他: 南山堂, 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH), 病気と薬パーフェクト BOOK 2011, 493-495
- ③ 西原利治: 医学書院, NAFLD, NASH, 幕内雅敏・菅野健太郎・工藤正俊編, 今日の消化器疾患治療方針 第 3 版, 2010, 640-642

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西原 利治 (SAIBARA TOSHIJI)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号: 60145125

(2)連携研究者

戸田 勝巳 (TODA KATSUMI)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：40197893

越智経浩 (OCHI TSUNEHIRO)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30617840

宗景 玄祐 (MUNEKAGE KENSUKE)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60617843