

機関番号：33920

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790687

研究課題名（和文）アンギオテンシンⅡ受容体拮抗剤の脂肪性肝炎関連肝臓癌に対する予防効果

研究課題名（英文）Angiotensin II type 1 receptor antagonist prevents hepatic carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis in rats

研究代表者

中出 幸臣（NAKADE YUKIOMI）

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：70431400

研究成果の概要（和文）：アンギオテンシン受容体拮抗剤（ARB）が NASH 関連肝臓癌を予防するかを検討するため、コリン欠乏アミノ酸（CDAA）食をラットに用いて検討を行った。CDAA 投与 24 週後にラットは肝硬変に至り、更に 24 週間 CDAA を摂食させると肝硬変は増悪し 54.5% のラットに肝臓癌を認めた。一方 ARB であるテルミサルタンを CDAA 投与 24 週後から投与すると肝線維化が改善し、肝臓癌は確認されなかった。以上より肝硬変にいたってからもテルミサルタンを投与することで肝線維化は軽快し、肝臓癌予防しうる可能性が示唆され NASH 関連肝臓癌の予防に応用しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate whether angiotensin II receptor blocker could prevent the development of NASH related hepatocellular carcinoma (HCC), we examined the effect of ARB on choline-deficient L-amino acid-defined (CDAA) diet NASH model. Twenty-four week-CDAA diet produced liver cirrhosis, and then CDAA diet for another 24 week aggravated liver cirrhosis, and produced HCC. On the other hand, telmisartan, a novel ARB, improved hepatic fibrosis and protected hepatic carcinogenesis even after 24-week CDAA diet feeding. These findings indicate that telmisartan has a therapeutic potential for NASH induced production of HCC even after hepatic fibrosis had been developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：アンギオテンシン受容体拮抗剤 NASH 肝臓癌予防

1. 研究開始当初の背景

我が国では食事を含む生活様式の欧米化に伴い、生活習慣病が増加傾向にあり、社会問題となっている。なかでもメタボリックシンドロームと呼ばれる疾患群は肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症を基盤として、急激に本邦

において増加しており、それに伴う心疾患、脳血管障害が致命的な病状であるために最近注目を集めている。消化器、特に肝臓においてはメタボリックシンドロームの肝臓での表現型として脂肪肝が以前より認識されていたが、死に至る疾患ではないと考えられ、

軽視される傾向にあった。しかしながらアメリカの Ludwig により 1980 年に非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) という疾患概念が提唱され、脂肪肝の中にも炎症や線維化を伴い、いずれ肝硬変にまで至る病態があることが明らかにされた。日本において NASH はほとんど注目されることはなかったが、メタボリックシンドロームが注目されるとともにここ数年関心が高まっている。申請者の研究グループは、以前より NASH に注目し、ビタミン E およびアンジオテンシン II 受容体阻害剤が有効であることを世界に先駆けて報告してきたが (Aliment Pharmacol Ther 15: 1667-72, 2001, Hepatology 39:568-9, 2004, Hepatology 40:1222-5, 2004)、NASH の病態そのものの解明が不十分であり、いまだ確立した治療法がない現状にある。一方、現在のところ NASH の発病機序には「two hit theory」が広く受け入れられている (Gastroenterology 114:842-5, 1998)。つまりメタボリックシンドロームに伴うインスリン抵抗性によって肝臓内に脂肪が蓄積して脂肪肝が発症し、次に第 2 の要因 (second hit) であるなんらかのストレスや細胞障害が加わり脂肪性肝炎が発症するという仮説である。一方 second hit である肝炎発症はその focus がアルコール性と類似しているという観点から、酸化ストレスやエンドトキシンが関与していると推測されているが、その本態はいまだ解明されていない。ウイルス性肝炎に代表される慢性肝疾患は肝の線維化が徐々に進展し、やがて肝硬変に至り、その一部から肝癌が発症することが知られている。ウイルス性肝炎の中でも C 型慢性肝炎は本邦における肝癌発症の最大の要因であるが、肝硬変に脂肪肝を合併すると肝癌発症が促進されることが基礎、臨床両面の研究から最近明らかにされて、発癌過程における肝脂肪化の関与が注目されている。さらに我が国における最近の検討では、原因不明の肝硬変を背景とする肝癌発症症例は増加傾向にあり、肥満を背景とするメタボリック症候群の増加と相関していると報告されている。一方、アンジオテンシン II は、強力な末梢血管収縮作用をもつ昇圧物質として知られてきたが、メタボリックシンドロームの進展に深く関与し、なかでも NASH の発症因子とされるインスリン抵抗性、組織への鉄沈着、TNF- α 産生、酸化ストレスを増強することが報告されている (J Clin Invest 100:2158-69, 1997, Circulation 106:1840-6, 2002, J Hypertens 18:1605-10, 2000, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285:R674-81, 2003)。さらにアンジオテンシン II は、肝星細胞をはじめとする線維産生細胞に直接作用して、細胞外マトリックス産生を促し、組織の線維化進

展に中心的役割を果たしている。これまでの基礎、臨床における検討で、アンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB) やアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) がメタボリックシンドロームに対する治療効果をもつこと、実験肝障害モデルや C 型慢性肝炎において肝星細胞の活性化を阻害し肝線維化の進展を抑制することが報告されている。申請者の研究グループは、NASH 患者に対する新たな治療法として、アンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB) の NASH に対する有用性を検討してきた (Hepatology 39:568-9, 2004)。高血圧を合併した NASH 患者 8 例に ARB の一つであるロサルタン (50 mg/日) を 48 週間経口投与し外来にて経過観察を行ったところ ARB 投与により収縮期および拡張期血圧は投与前に比べ有意に低下し、さらに肝機能は血中トランスアミナーゼ、 γ -GTP 値が有意に改善した。また血中フェリチン、肝線維化マーカー、肝星細胞の強力な活性化因子である TGF- β 1 値も有意に低下した。病理組織学的所見でも 5 例の necroinflammatory grade と 4 例の fibrosis stage が改善、また 2 例では投与前に認められた鉄沈着が改善された。本所見は ARB が肝星細胞の活性化を直接阻害すると共に、慢性炎症を抑制することによって肝線維化の進展を阻害することを証明するものである。したがって、脂肪肝 \rightarrow NASH \rightarrow 肝硬変への肝病変の進展を ARB が阻止すると共に肝脂肪化および線維化と密接に関係する肝癌の発癌抑制に ARB が効果を発揮するものと推測される。本申請研究においては、NASH および NASH からの肝癌発症動物モデルを用いて、ARB が肝癌発症予防に効果を発揮することを明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

上述の申請者らの NASH に対する ARB 療法をきっかけとして、NASH に対する ARB 投与効果に関する基礎的研究が検討され、これまでにいくつかの報告がなされている。最近の検討では ARB であるオルメサルタンが NASH 動物モデルにおいて、肝脂肪化を抑制し、線維化進展を抑制することが報告されてきている。しかしながら NASH を背景とした肝発癌に関してはこれまで基礎的検討はほとんどなされておらず、本研究では肝脂肪化を伴い慢性炎症性変化を生じて線維化が進展しやがては肝発癌に至る動物モデルである Choline-deficient, L-amino acid-defined (CDA) 食誘発脂肪肝ラットを用いて、肝硬変に至った時点から ARB を用いることで、肝の炎症性変化および線維化進展は改善するか、また発癌抑制するか否かを検討していくことを目的とする。また ARB によって肝線維化および発癌抑制するなら

ば、各々に関わる様々な因子やシグナル伝達のメカニズムを検討し、ARB がどの因子に作用して肝繊維化および発癌抑制に関わるかを明らかにしていき、将来的に NASH 関連発癌の予防に応用することを最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) 動物実験デザイン: 5 週齢雄性 Wistar ラットにコリン欠乏アミノ酸食 (choline-deficient L-amino acid-defined (CDA) 食) を投与し、脂肪肝から脂肪性肝炎および肝硬変を経て肝発癌を誘発するモデルを作成する。CDA 食は自由摂食とし、餌の消費量は連日測定してラットの体重を毎週計測する事によって CDA 食の摂食状況を逐次確認する。CDA 食投与開始 25 週目よりアンジオテンシン II 受容体拮抗剤であるテルミサルタン (2 mg/kg/日) を服用させた群と対照群にわけて、その後 48 週目まで CDA 食を継続する。テルミサルタン投与群は毎朝 9 時にテルミサルタン原末を蒸留水に溶解し (0.5 mg/ml)、金属製のラット胃ゾンデを用いて経口的に強制摂取させる。またコントロール食としては、choline-supplemented L-amino acid-defined (CSA) 食を用い、CDA 食と同様に自由摂食として摂食状況を確認する。ラットを 48 週終了後に安楽死させ、肝および血液を採取する。肝は肝重量を測定した上で分割して一部をホルマリンで固定し、残りを -80°C で保存する。血液は 4°C、3,000 rpm で 15 分間遠心分離し、得られた血清を -80°C で保存する。

(2) 病理組織学的および免疫組織学的検討: 肝組織をパラフィン包埋固定の後ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン・トリクローム染色および oil red-O 染色を行い、肝における炎症細胞浸潤、肝細胞壊死、肝線維化、肝脂肪化の程度および肝発癌の有無を評価して CDA 食群、CSA 食群各々についてテルミサルタン群と対照群との間で比較する。炎症細胞浸潤に関してはヘマトキシリン・エオジン染色にて Brunt の分類 (Am J Gastroenterol 1999; 116: 2467-74) にしたがって、1: mild、2: moderate、3: severe の 3 段階で評価する。さらに脂肪化に関しては oil red-O 染色にて顕微鏡的 1 視野における肝脂肪の割合を Brunt の分類にしたがって mild: 33% 以下、moderate: 33-66%、severe: 66% 以上の 3 段階にわけて評価する。また肝線維化に関してはマッソン・トリクローム染色にて門脈域および中心静脈を含む任意の 5 視野を選択し、青紫色に染まる領域をコンピュータイメージ分析装置にて面積を算出する。発癌の評価は Squire と Levitt の基準 (Cancer Res 1975; 35: 3214-23) を元に診断し、肝一葉につき 30 cm² の領域 (おおよそ 40-45 スライス) を精査し、発癌の程度を検

討する。さらに肝のパラフィン包埋固定標本にて、Vectastain ABC キットを用いて抗 TGF-β1 抗体 (Santa Cruz, CA, USA)、抗 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) 抗体 (Japanese Aging Control Institute, Japan)、抗 GST-P (glutathione S-transferase placental form) 抗体 (MBL Japan) を染色し、酸化ストレス、前癌病変の領域を顕微鏡およびコンピュータイメージ分析装置にて解析しテルミサルタン群および対照群で比較する。

(3) 血清肝酵素および繊維化マーカーの検討: 血清分離した各検体より血清 AST (トランスアミナーゼ C II テストキット)、ALT (トランスアミナーゼ C II テストキット)、ALP (アルカリホスファターゼ活性測定キット)、総ビリルビン値 (ビリルビン B II - テストワコー) を測定。また繊維化マーカーであるヒアルロン酸 (Hyaluronan ELISA)、タイプ IV コラーゲン (タイプ IV コラーゲン測定キット) および TGF-β1 (TGF-β1 Instant ELISA Kit) を測定し、テルミサルタン群と対照群の間において比較を行う。

(4) 酸化ストレス、肝線維化に関わる遺伝子の mRNA および蛋白発現に関する検討: 肝凍結組織 100 mg を液体窒素で冷却しながら粉砕。粉砕物をポリトロンホモジェナイザーにて、RNAwiz を加えてホモジェナイズする。得られたホメジェネートから RNeasy® Mini Kit を用いて Total RNA を抽出し、分光光度計 (NanoDrop® ND-1000) で定量後、cDNA に逆転写し、酸化ストレス、肝線維化に関わる TNF-α、TGF-β1 遺伝子をリアルタイム PCR で解析する。primer および TaqMan probe には Applied Biosystems 社のものを使用し、コントロールとして 18s ribosomal RNA を用いてテルミサルタン群と対照群との間で比較する。また蛋白抽出には肝凍結組織 1 g をホモジェナイズの後、lysis buffer にて溶解し、比色法にて蛋白定量後、SDS-PAGE を行い TNF-α 抗体および TGF-β1 抗体にて肝における蛋白発現を Western Blot 法でテルミサルタン群と対照群との間で比較する。

(5) 肝星細胞および活性型肝星細胞の同定: 得られた肝組織について、NASH における線維化の中心的役割を演じている肝星細胞 (伊藤細胞) の ARB 投与による動態の変化を確認するために、monoclonal anti-α-SMA 抗体 (Dako, Kidlington, UK) および monoclonal anti-p75 抗体 (Novocastra, Newcastle, UK) を Vectastain ABC キットを用いて免疫二重染色を施行する。star-like shape を呈する非活性型星細胞と myofibroblast 様に形態変化した活性型星細胞を肉眼的顕微鏡にて同定し、1 プレパラートにつき任意の 5 視野における活性型星細胞

胞と非活性型星細胞の絶対数と比率を算出し、テルミサルタン群および対照群にて比較する。

(6) 肝発癌に関わる血管新生因子 (hypoxia-inducible factor 1 α および vascular endothelial growth factor) に関する検討: 肝発癌に深く関わる血管新生因子である vascular endothelial growth factor(VEGF)と VEGF の発現に強い影響を及ぼす hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)の NASH における肝発癌の関与を検討する。肝凍結組織 100 mg を液体窒素で冷却しながら粉碎。粉碎物をポリトロンホモジェナイザーにて RNAwiz を加えてホモジェナイズする。得られたホメジェネートから RNeasy® Mini Kit を用いて Total RNA を抽出し、分光光度計 (NanoDrop® ND-1000) で定量後、cDNA に逆転写し、HIF-1 α および VEGF を Real Time PCR にて定量する。また蛋白抽出には肝凍結組織 1 g をホモジェナイズの後、lysis buffer にて溶解し、比色法にて蛋白定量後、SDS-PAGE を行い HIF-1 α および VEGF の肝における蛋白発現を Western Blot 法でテルミサルタン群と対照群との間で比較する。さらに癌部と非癌部それぞれにおける HIF-1 α および VEGF の mRNA および蛋白発現をそれぞれ Real Time PCR 法および Western Blot 法を用いて定量し、テルミサルタン群と対照群の間で発現量を比較する。

4. 研究成果

(1) テルミサルタン投与の CDAA 食による肝線維化および前がん病変に及ぼす影響に関する検討: CDAA 食 24 週投与により、血清 ALT 値の上昇を伴い明らかな肝線維化を認め、80%のラットに肝硬変を認めた。酸化ストレスのマーカーである肝 8-OHdG 量もコントロールに比べ有意に増加した。活性化肝星細胞のマーカーである α -SMA 陽性細胞数および前がん病変のマーカーである GST-P 陽性領域はコントロールと比べ有意に増加した。CDAA 食 48 週投与により血清 ALT 値は 24 週投与群と比べ更に上昇し、90.9%のラットは肝硬変にいたった。さらに肝 8-OHdG 量は CDAA 食 48 週群は 24 週群に比べ有意に増加し α -SMA 陽性細胞数、GST-P 陽性領域も 48 週群で有意に増加した。一方テルミサルタン(2 mg/kg)服用を 24 週間行くと、肝線維化が著明に改善し、肝 8-OHdG、 α -SMA 抗体陽性細胞数および GST-P 抗体陽性細胞領域もテルミサルタン群で著明に減少した。

(2) テルミサルタン投与の CDAA 食による肝発癌がんに及ぼす影響に関する検討: コントロール食の投与は特に肝発癌には影響なかったが、CDAA 食投与 48 週にて 54.5%のラットに肝発癌を認めた。一方、テルミサルタ

ン投与群においては肝癌は確認されなかった。

(3) テルミサルタン投与の CDAA 食による VEGF および HIF-1 α の発現に及ぼす影響に関する検討: コントロール食の投与は HIF-1 α 陽性細胞および VEGF 遺伝子発現に影響なかった。CDAA 投与 24 週にて HIF-1 α 陽性細胞は出現し、CDAA の 48 週投与にて HIF-1 α 陽性細胞は更に増加した。また VEGF の遺伝子発現も CDAA 24 週投与にてコントロールに比べ増加し 48 週投与にてさらに増加した。一方、テルミサルタン投与群においては CDAA 食投与による HIF-1 α 陽性細胞の増加および VEGF 遺伝子発現の上昇は抑制された。

以上のことからテルミサルタンは CDAA 食による肝線維化進展および肝発癌を HIF-1 α を介して抑制しうる可能性が示唆された。近年ウイルス性肝炎関連の肝発癌のみならず、NASH 関連の発癌が増加しているとの報告がある中、肝硬変になってからでも ARB は肝線維化に対して抑制的に働き、将来的に NASH 関連肝発癌の予防へ応用しうる可能性に意義があるものと考えられた。

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. Yokohama S, Aoshima M, Nakade Y, Shindo J, Maruyama J, Yoneda M. Investigation and prediction of enteral nutrition problems after percutaneous endoscopic gastrostomy. World J Gastroenterol 2009;15:1367-72. (査読有)
2. Masere C, Nakade Y, Zheng J, Babygirija R, Ludwig K, Takahashi T. Chronic restraint stress has no more stimulatory effects on colonic motility in rats. Neurosci Lett 2009;453:147-50. (査読有)
3. Takahashi T, Nakade Y, Fukuda H, Tsukamoto K, Mantyh C, Pappas TN. Daily intake of high dietary fiber slows accelerated colonic transit induced by restrain stress in rats. Dig Dis Sci 2008;53:1271-7. (査読有)
4. Nakade Y, Pappas TN, Takahashi T.

Peripheral plasma corticotropin-releasing factor concentration does not correlate with augmented colonic motility in response to restraint stress in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:934-7. (査読有)

5. Ariga H, **Nakade Y**, Tsukamoto K, Imai K, Chen C, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T. Ghrelin accelerates gastric emptying via early manifestation of antro-pyloric coordination in conscious rats. *Regul Pept* 2008;146:112-6. (査読有)

6. **Nakade Y**, Tsukamoto K, Iwa M, Pappas TN, Takahashi T. Glucagon like peptide-1 accelerates colonic transit via central CRF and peripheral vagal pathways in conscious rats. *Auton Neurosci* 2007;131:50-6. (査読有)

7. **Nakade Y**, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T. Fecal pellet output does not always correlate with colonic transit in response to restraint stress and corticotropin-releasing factor in rats. *J Gastroenterol* 2007;42:279-82. (査読有)

8. Tsukamoto K, **Nakade Y**, Mantyh C, Ludwig K, Pappas TN, Takahashi T. Peripherally administered CRF stimulates colonic motility via central CRF receptors and vagal pathways in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R1537-41. (査読有)

9. **Nakade Y**, Tsukamoto K, Pappas TN, Takahashi T. Central glucagon like peptide-1 delays solid gastric emptying via central CRF and peripheral sympathetic pathway in rats. *Brain Res* 2006;1111:117-21. (査読有)

10. **Nakade Y**, Tsuchida D, Fukuda H, Iwa

M, Pappas TN, Takahashi T. Restraint stress augments postprandial gastric contractions but impairs antropyloric coordination in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R616-24. (査読有)

11. **Nakade Y**, Fukuda H, Iwa M, Tsukamoto K, Yanagi H, Yamamura T, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T. Restraint stress stimulates colonic motility via central corticotropin-releasing factor and peripheral 5-HT₃ receptors in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006. (査読有)

12. Iwa M, **Nakade Y**, Pappas TN, Takahashi T. Electroacupuncture improves restraint stress-induced delay of gastric emptying via central glutaminergic pathways in conscious rats. *Neurosci Lett* 2006;399:6-10. (査読有)

13. Iwa M, **Nakade Y**, Pappas TN, Takahashi T. Electroacupuncture elicits dual effects: stimulation of delayed gastric emptying and inhibition of accelerated colonic transit induced by restraint stress in rats. *Dig Dis Sci* 2006;51:1493-500. (査読有)

14. Iwa M, Matsushima M, **Nakade Y**, Pappas TN, Fujimiya M, Takahashi T. Electroacupuncture at ST-36 accelerates colonic motility and transit in freely moving conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G285-92. (査読有)

15. Yoneda M, Nakamura K, **Nakade Y**, Tamano M, Kono T, Watanobe H,

Shimada T, Hiraishi H, Terano A.
Effect of central corticotropin
releasing factor on hepatic
circulation in rats: the role of the
CRF2 receptor in the brain. Gut
2005;54:282-8. (査読有)

16. **Nakade Y**, Tsuchida D, Fukuda
H, Iwa M, Pappas TN, Takahashi T.
Restraint stress delays solid gastric
emptying via a central CRF and
peripheral sympathetic neuron in
rats. Am J Physiol Regul Integr
Comp Physiol 2005;288:R427-32.
(査読有)

17. Iwa M, Strickland C, **Nakade Y**,
Pappas TN, Takahashi T.

Electroacupuncture reduces rectal
distension-induced blood pressure
changes in conscious dogs. Dig Dis
Sci 2005;50:1264-70. (査読有)

18. **Nakade Y**, Yoneda M, Yokohama
S, Tamori K, Nakamura K,
Watanobe H, Kono T, Makino I,
Terano A. Central injection of
astressin inhibits carbon
tetrachloride-induced acute liver
injury in rats. Eur J Pharmacol
2003;460:135-8. (査読有)

19. **Nakade Y**, Yoneda M, Nakamura
K, Makino I, Terano A. Involvement
of endogenous CRF in carbon
tetrachloride-induced acute liver
injury in rats. Am J Physiol Regul
Integr Comp Physiol
2002;282:R1782-8. (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① 発表者：中出幸臣
NASH関連肝発癌に対するアンギオテンシ

ン受容体拮抗剤による予防
日本肝臓学会西部会 2009年12月2日
米子コンベンションセンター

- ② 発表者：中出幸臣
アンギオテンシン II 受容体拮抗剤によ
る NASH 関連肝発癌の予防：HIF-1 α と酸
化ストレスとの関わり
日本肝臓学会総会 2010年5月27日
山形国際ホテル

[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：
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
中出 幸臣 (NAKADE YUKIOMI)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号：70431400

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：