

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 2 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590996

研究課題名(和文)オリゴアレイCGH法によるNASH発癌関連遺伝子の網羅的検索

研究課題名(英文)Cyclopedic investigation of genes for NASH-mediated carcinogenesis

研究代表者

米田 政志 (Yoneda, Masashi)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：30261407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：コリン欠乏アミノ酸食(CDAA)モデルでNASH肝発癌を誘導しオリゴCGHアレイ法にて肝発癌関連遺伝子の網羅的探索を行った。CDAA食を48週間ラットに摂食させると、52個の関連遺伝子発現に違いが生じ、転写調節に関わる遺伝子(HNF1/TCF1)が経時的に減少し、情報伝達に関わる遺伝子(NF1)も経時的に減少した。Real time PCRでvalidationを行ったところHNF1/TCF1は減少傾向を認めたが有意差はなく、またNF1は著変なかった。オリゴCGHアレイとreal time PCRの結果に不一致が生じ、今後さらなる検討が必要であるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the genes expressions for NASH-related hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient L-amino acid-defined (CDAA) diet, using origo-CGH microarray analysis. Forty-eight week CDAA diet induced 52 genes expression differences in the liver between CDAA diets and control. These included tumor proliferation-related genes, and HNF1/TCF1, transcriptional regulation genes expressions were chronologically attenuated. NF1 which is known to be related signal transaction, are chronologically decreased. Real time PCR showed that HNF1/TCF1 has a tendency to be decreased by CDAA diet, however, NF1 mRNA expressions in the liver were not changed by CDAA diet. These results produced the gene expression differences between origo-CGH microarray analysis and real time PCR. Further investigations were needed to examine in the future.

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：NASH 肝発癌 オリゴCGHアレイ コリン欠乏食

## 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、脳血管障害が致死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進展する病態の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着目されるとともにここ数年関心が高まっている。NASH の病因、病態生理はいまだ明らかにはされておらず、その治療に関しても種々試みられてはいるが確立した治療法は今のところ存在しない。申請者は 1995 年頃よりいち早く NASH に注目し、血清 transaminase 値が常時 100IU/MI 以上の高値を示し、超音波および CT の画像診断にて臨床的に脂肪肝と診断された症例 22 例に対して肝生検を行った。その結果、12 例(60%)が NASH であったために NASH と脂肪肝の臨床的特徴を比較検討したが、一般的な採血検査や画像診断では NASH と脂肪肝の間に相違は見出すことが出来なかった。肝線維化に重要な役割を持

つ TGF- $\beta$ 1 の血液中濃度が NASH 患者で有意差を持って脂肪肝および健常正常人に比較して高値であった (Aliment Pharmacol Ther 15: 1667-72, 2001)。また TGF- $\beta$ 1 合成を抑制することで知られている  $\alpha$ -tocopherol (300 mg/日) を NASH に対して 12 ヶ月間投与したところ、肝機能は有意に改善し、肝生検を施行しえた 9 例中 5 例において肝線維化と炎症の改善が確認されたことを確認している。さらに申請者は肝線維化における肝星細胞 (伊東細胞) の中心的な役割に着目し、その肝星細胞の活性化を抑制するアンジオテンシン 受容体阻害剤の NASH に対する効果を検討した。高血圧を合併する NASH 症例 8 人に対してアンジオテンシン 受容体阻害剤である losartan (50 mg/日) を 48 週間投与したところ、losartan 投与 3 ヶ月目より肝機能は改善し、それと共に種々の血清中肝線維化マーカーも低下した。losartan 投与後の肝生検を施行しえた 7 例中 5 例において肝線維化と炎症の改善が確認された (Hepatology 40:1222-5, 2004)。以来現在ではアンジオテンシン 受容体阻害剤の肝線維化に対する効果に関する研究は NASH のみならず他の慢性肝疾患に対しても種々の研究機関で試みられている。

最近の様々な疫学調査により、保存されていた病理組織の検討から NASH がベースになって肝癌が発症していることが明らかとなってきた。また肝炎ウイルス感染患者からの肝癌発症においても肝組織内の脂肪化が強い症例の方が脂肪化を伴わない症例に比べて高率に発癌することが最近報告されており、肝脂肪化の肝発癌における関

与が注目を集めている。

## 2. 研究の目的

脂肪肝、NASH および脂肪化を伴ったウイルス性肝炎からの肝発癌に關与する遺伝子をオリゴアレイ CGH 法を用いて網羅的に解析することを本申請研究の目的としては以下の研究を遂行した。

(1) コリン欠乏アミノ酸食を用いてNASH 類似の病態を経て肝硬変、肝癌と進展する動物モデルを用い、脂肪肝発症前、脂肪肝発症後、脂肪性肝炎発症後、肝硬変進展後および肝癌発症時における背景肝と癌部の組織からmRNAを抽出してオリゴアレイCGH法で発癌に關連する遺伝子を網羅的に探索する。さらに抽出された癌關連遺伝子をReal Time PCR 法によって定量し再確認する。

(2) NASHから肝硬変に至ったラットにアンジオテンシン 受容体拮抗剤 (ARB) と投与すると肝での発癌が抑制されることを明らかにしているが、その際オリゴアレイ CGH法で抽出された肝臓の癌關連遺伝子が ARB投与によってどの様な影響を受けているかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) 動物実験プロトコール 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 : CDAA食を投与し、NASHより肝硬変を経て発癌にいたるまでのモデルを作製する。コントロール食としてコリン添加アミノ酸食 (CSAA食)を用い、CDAA食およびCSAA食は自由摂食とする。

CDAA 食および CSAA 食の投与開始 6、12、24 および 48 週目に各々 8 匹ずつラットを安楽死させて肝を採取し、肝重量を測定して液体窒素にて瞬間凍結させた後に -80 で保存およびホルマリン固定をする。

### 2) オリゴアレイ CGH 法

上記実験 1) によって得られたラットの凍結肝組織より RNeasy Mini Kit (Qiagen 社、東京) を用いて RNA 分画を抽出する。得られた総 RNA は RNase free water で処理し、

Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technology、アメリカ)にて定量する。最終的に得られた RNA より高用量 cDNA Reverse Transcription キット (Applied Biosystems、アメリカ) によって cDNA に逆転写させる。

得られた検体 DNA を 41,000 個のプロープを有する Agilent 社の Whole Rat Genome CGH マイクロアレイを用いて赤色蛍光色素 (Cy3) で、コントロールとなる正常肝組織 DNA を緑色蛍光色素 (Cy5) で標識し、両者を混合した後スライドガラス上のプロープとハイブリダイズさせる。スライドガラスを洗浄後、蛍光シグナル強度を測定する。Cy3 および Cy5 の蛍光シグナルの測定および得られた測定値の分析は Feature Extraction ソフトウェアを用いて、各週令ラットの背景肝、肝癌組織についてコピー数の異常が見られるゲノム領域を網羅的に解析する。

### ラット NASH 発癌モデルで抽出された遺伝子に対するアンジオテンシン 受容体拮抗剤の効果

上記 1) の実験と同様の方法にて 5 週令雄性 Wistar ラットに CDAA 食を投与し、肝硬変に進展する 25 週目よりアンジオテンシン 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 CDAA 食を継続する。

上記実験によって得られたラットの凍結肝組織より RNA 分画を抽出する。

Whole Rat Genome CGH マイクロアレイを用いて赤色蛍光色素 (Cy3) で、コントロールとなる正常肝組織 DNA を緑色蛍光色素 (Cy5) で標識し、蛍光シグナル強度を測定し、Cy3 および Cy5 の蛍光シグナルの測定および得られた測定値の分析は Feature Extraction ソフトウェアを用いて解析する。アンジオテンシン 受容体拮抗剤投与ラットと非投与ラット

の抽出された肝癌関連遺伝子のシグナル強度の差異を確認した上で、有意な差の確認された遺伝子に関して Real Time 定量 PCR 解析を施行してバリデーションを行う。

#### 4 . 研究成果

CSAA 食投与群では血清 ALT 値および血清中性脂肪量には変化を認めなかったが、CDAA 食投与により血清 ALT 値および肝中性脂肪量は 24 および 48 週と経るに従い増加した。肝組織学的検討では、CSAA 食投与では変化を認めなかったが、CDAA 食投与開始 24 週目に肝硬変になり、さらに CDAA 食投与開始 48 週目には肝硬変はさらに増悪した。肝星細胞活性化のマーカーである  $\alpha$ -SMA 陽性細胞は CDAA 食投与開始後経時的増加していった。前癌病変のマーカーである GST-P 陽性細胞数を定量したところ CSAA 食投与群では GST-P 陽性細胞を認めなかったが、CDAA 食投与群では投与期間を経るに従い増加し、CDAA 食投与開始 48 週目には約半数のラットに肝発癌を認めた。NASH からの肝発がんメカニズムを検討するため、CDAA 食および CSAA 食を投与開始してから、6、12、24 および 48 週後に得られた肝組織より RNA を抽出し cDNA に逆転写しマイクロアレイを行い CSAA 食投与群と抽出された遺伝子発現について比較を行った。CDAA 食および CSAA 食を投与してから 6、12、24 および 48 週後にトータル 52 個関連遺伝子発現に違いが生じた。これらの遺伝子の中には腫瘍増殖に関わる遺伝子群が含まれており、転写調節に関わる遺伝子(HNF1/TCF1)が経時的に減少し、情報伝達に関わる遺伝子(NF1)も経時的に減少した。また NF1 同様情報伝達に関わる遺伝子である EDNRB は増加していたことが確認された。次に CDAA 食投与開始 25 週目からアンギオテンシン II 受容体拮

抗剤であるテルミンサルタンを 2mg/kg/day で投与し 48 週目まで継続した。CDAA 食投与開始 48 週群ではその約半数のラットに肝発がんが認められたが、テルミンサルタン群では肝発がんがみとめられなかった。また前癌病変のマーカーである GST-P 陽性細胞および肝線維化に関わる活性化星細胞のマーカーである  $\alpha$ -SMA 陽性細胞は両者ともにテルミンサルタン群は対照群にくらべ有意に減少した。テルミンサルタン群において上記同様にマイクロアレイを用いて検討した。テルミンサルタン群において 37 個の遺伝子発現に違いが生じ、HNF1/TCF1、NF1 の発現が増加していることが確認された。次に Real time PCR を用いて各遺伝子発現を定量し validation を行ったところ、CDAA 食群を投与し 6、12、24 および 48 週後に HNF1/TCF1 は減少傾向を認めたが有意差はなく、また NF1 に関しては 6、12、24 および 48 週後ともに著変がなかった。さらにテルミンサルタン群において HNF1/TCF1 は増加傾向を認めたものの有意差はなく、NF1 の発現には違いを認めなかった。CDAA 食は転写調節に関わる遺伝子 HNF1/TCF1 に影響をおよぼし肝発がんに影響した可能性が考えられたが、マイクロアレイの結果と Real time PCR の結果に不一致が生じ今後検討が必要で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 12 件)(総件数 37 件)

- [1] Iida A, Konagaya T, Kaneko H, Yoneda M, et al. Usefulness of a slow nutrient drinking test for evaluating gastric perception and accommodation. Digestion 2011;84:253-60. (査読有)
- [2] Lin Y, Yagyū K, Egawa N, Nakao H, et al. An overview of genetic

- polymorphisms and pancreatic cancer risk in molecular epidemiologic studies. J Epidemiol 2011;21:2-12. ( 査読有 )
- [3] Nakao H, Yoneda M. Liver stiffness measurement using transient elastography and hepatocellular carcinoma. Hepatol Res 2011;41:921-4. ( 査読有 )
- [4] Damdindorj L, Karnan S, Ota A, et al. Assessment of the long-term transcriptional activity of a 550-bp-long human beta-actin promoter region. Plasmid 2012;68:195-200. ( 査読有 )
- [5] Karnan S, Konishi Y, Ota A, et al. Simple monitoring of gene targeting efficiency in human somatic cell lines using the PIGA gene. PLoS One 2012;7:e47389. ( 査読有 )
- [6] Konishi Y, Karnan S, Takahashi M, et al. A system for the measurement of gene targeting efficiency in human cell lines using an antibiotic resistance-GFP fusion gene. Biotechniques 2012;53:141-52. ( 査読有 )
- [7] Nakade Y, Sato K, Nakao H, et al. [Hepatocarcinogenesis in NASH]. Gan To Kagaku Ryoho 2012;39:693-7.
- [8] Hossain E, Ota A, Takahashi M, Karnan S, et al. Arsenic upregulates the expression of angiotensin II Type I receptor in mouse aortic endothelial cells. Toxicol Lett 2013;220:70-5. ( 査読有 )
- [9] Lin Y, Ueda J, Yagyu K, Nakao H, et al. Association between variations in the fat mass and obesity-associated gene and pancreatic cancer risk: a case-control study in Japan. BMC Cancer 2013;13:337. ( 査読有 )
- [10] Tamaki Y, Nakade Y, Yamauchi T, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist prevents hepatic carcinoma in rats with nonalcoholic steatohepatitis. J Gastroenterol 2013;48:491-503. ( 査読有 )
- [11] Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsuhashi H, Yoneda M, et al. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. Hepatology 2014;59:89-97. ( 査読有 )
- [12] Nakaoka T, Ota A, Ono T, Karnan S, et al. Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. Cell Oncol (Dordr) 2014;37:119-29. ( 査読有 )
- { 学会発表 } ( 計 0 件 )  
 { 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

米田 政志 (YONEDA MASASHI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：30261407

(2) 研究分担者

中尾 春壽 (NAKAO HARUHISA)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60326139

中出 幸臣 (NAKADE YUKIOMI)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：70431400

シバスタランカルナン (Shibasun daran  
karunan)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：30557096

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：