

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659647

研究課題名（和文） 水素水による肝線維化治療戦略

研究課題名（英文） Treatment strategy for liver fibrosis by hydrogen water

研究代表者

田浦康二郎（TAURA KOJIRO）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80378629

研究成果の概要（和文）：

近年抗酸化活性剤として知られる水素水の肝線維化抑制効果を調べるために、C57BL/6マウスに水素水を飲用させながら、四塩化炭素、チオアセトアミド、胆管結紮により肝臓の線維化を誘導し、コントロール飲水群との比較を行った。その結果、四塩化炭素モデルとチオアセトアミドモデルでは水素水の飲用により肝線維化抑制効果が示されたが、胆管結紮モデルにおいてはその効果は見られなかった。

次にそのメカニズムを調べるために、肝細胞および星細胞をマウスから分離し水素含有培地で培養することにより、活性酸素による肝細胞傷害、星細胞の活性化への影響について検討を行った。1 μ g/mLのアンチマイシンAを分離した肝細胞に投与することにより、肝細胞にヒドロキシルラジカルの発生を確認した。それらのヒドロキシルラジカルは水素含有培地において有意に発生が抑制され、肝細胞死の軽減も観察された。星細胞については水素含有培地においても明らかな活性抑制効果は観察されなかった。

水素水は肝細胞でのヒドロキシルラジカルを抑制することで肝細胞死を軽減し、肝線維化抑制効果を呈することが示された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the effects of hydrogen water on liver fibrogenesis, C57BL/6 mice were fed with hydrogen water or control water, and subjected to carbon tetrachloride, thioacetamide and bile duct ligation treatments to induce liver fibrosis. Oral intake of hydrogen water significantly suppressed liver fibrogenesis in the carbon tetrachloride and thioacetamide models, but these effects were not seen in the bile duct ligation model.

To investigate the mechanisms underlying these effects, hepatocytes and hepatic stellate cells were isolated from mice and cultured with or without hydrogen to test the effects of hydrogen on reactive oxygen species-induced hepatocyte injuries or hepatic stellate cell activation. Treatment of isolated hepatocyte with 1 μ g/mL antimycin A generated hydroxyl radicals. Culturing in the hydrogen-rich medium selectively suppressed the generation of hydroxyl radicals in hepatocytes and significantly suppressed hepatocyte death induced by antimycin A; however, it did not suppress hepatic stellate cell activation.

We conclude that hydrogen water protects hepatocytes from injury by scavenging hydroxyl radicals and thereby suppresses liver fibrogenesis in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野： 肝臓外科学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード： 肝線維化、活性酸素、星細胞、肝細胞、肝卵形細胞

1. 研究開始当初の背景

肝線維化は、さまざまな肝傷害機転の共通の帰結であり、本邦のみならず世界において主たる死因の一つである。近年肝線維化の原因として活性酸素の関与が注目されている。我々は他分野において選択的抗酸化活性剤として報告されている水素水を用いて肝線維化抑制効果を検討した。

2. 研究の目的

水素水飲用による肝線維化抑制効果を検討する。さらに、そのメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 水素水、水素添加培地

マウスの飲用に用いた水素水はアイロム製薬株式会社より提供を受けた。培地への水素の添加は水素を培地に直接バブリングすることにより行った。

(2) 肝線維化の誘導

肝線維化の誘導モデルとして、C57BL/6 マウスに対し、①四塩化炭素の腹腔内投与（週 2 回、6 週）、②チオアセトアミドの腹腔内投与③胆管結紮、の 3 種のモデルを用いた。

(3) 肝細胞、肝臓星細胞の分離

正常肝より、コラゲナーゼ処理を行い遠心により、肝細胞の分離を行った。正常肝より 2 段階のコラゲナーゼ、プロテアーゼ処理を行い、そのうち密度勾配遠心法を用いて、肝臓の星細胞を分離培養した。

4. 研究成果

(1) 水素水の飲用は四塩化炭素、チオアセトアミドによる肝線維化形成を抑制する。

我々は水素水飲用の肝線維化形成への効果を調べるために、C57BL/6 マウスに水素を飲用させた群（水素水群）とコントロール水を飲用させた群（コントロール水群）において四塩化炭素（CCl₄）を投与した。肝線維化の代表的指標であるヒドロキシプロリン定量法において、水素水群はコントロール水群に比して有意に肝線維化の抑制効果が見られた（図 1 a）。線維特異的な染色であるシリウスレッド染色においても肝線維化抑制効果が確認された（図 1 b）。同様にチオアセトアミド(TAA)モデルにおいても、水素水の飲用による肝線維化形成の抑制効果が示された（図 2 a、b）。

(2) 水素水の飲用は肝臓線維化形成に伴うヒドロキシルラジカルの生成を抑制する。

これまで脳の虚血再灌流モデル等において、水素のヒドロキシルラジカル選択的な抗酸

図1 水素水飲用は四塩化炭素による肝線維化形成を抑制する

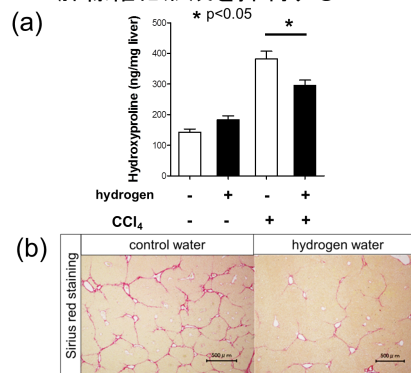


図2 水素水飲用はチオアセトアミドによる肝線維化形成を抑制する

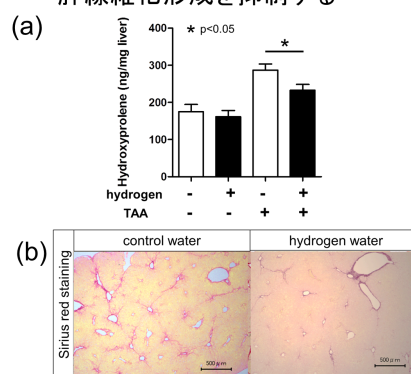
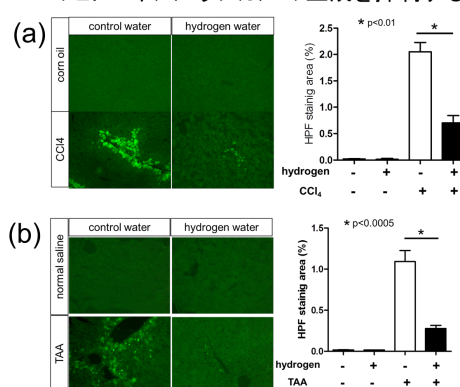


図3 水素水飲用は肝臓線維化形成に伴う肝臓内のヒドロキシルラジカルの生成を抑制する。



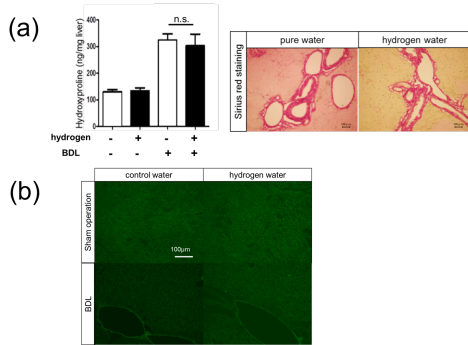
化活性が報告されている。我々は水素水の飲用において、種々の肝臓内の酸化ストレスマーカーを調べた。CCl₄、TAA モデルの肝臓において、ヒドロキシルラジカルの検出試薬として知られる Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF) 染色を行った。CCl₄ モデルにおいて肝線維化誘導に伴い、ヒドロキシルラジカルの産生が確認され、水素水の飲用によりその産生抑制効果が確認された（図 3 a）。TAA モデ

ルにおいても同様の結果であった (図 3 b)。

(3) 胆管結紮モデルにおいては、肝臓内にヒドロキシルラジカルの産生は確認されず、水素水の飲用による肝線維化形成抑制効果も認めない。

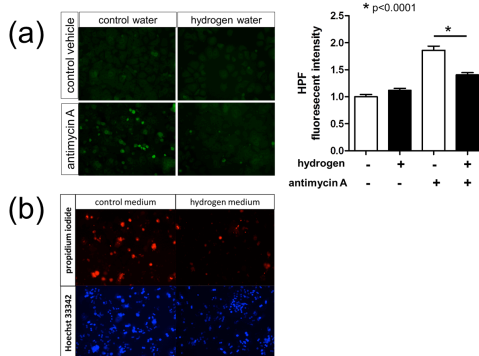
胆管結紮モデルにおいて水素水の飲用は肝線維化抑制効果を示さなかった (図 4 a)。また胆管結紮モデルにおいては、コントロール水群においても肝臓内のヒドロキシルラジカルの産生は認められなかった。

図4 胆管結紮モデルでは、肝臓内にヒドロキシルラジカルの産生はなく、水素水飲用による線維化抑制効果は認められない。



(4) 水素は肝細胞におけるヒドロキシルラジカル産生を抑制し、肝細胞死を軽減する。水素経口投与における、肝臓線維化抑制効果のメカニズムを調べるために、肝細胞を C57BL/6 マウスより分離培養し、アンチマイシン A (AMA) 添加により酸化ストレス誘導を行った。AMA 投与により、ヒドロキシルラジカルの増加を認め、それらは水素添加培地にて培養することにより、産生が抑制された (図 5 a)。AMA を添加した肝細胞では Propidium Iodide 染色陽性の死細胞が増加したが、培地への水素添加により死細胞の割合が軽減した (図 5 b)。

図5 水素は肝細胞におけるヒドロキシルラジカルを抑制し、肝細胞死を軽減する

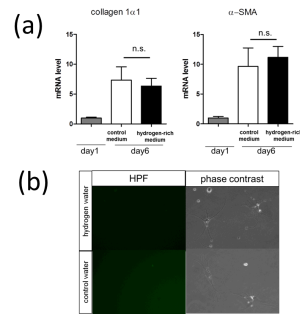


(5) 水素はディッシュ培養における星細胞活性化に影響を与えない。

培地への水素添加による星細胞の活性化への影響を調べるために、C57BL/6 マウスから

星細胞を分離し、5日間プラスチックディッシュ上で培養を行った。培地中に水素を添加した群においてもコントロール培地と同様にディッシュ上での星細胞の活性化を認め、両群間に活性化の指標に変化を認めなかった (図 6 a)。また、ディッシュ上で培養を行った星細胞にはヒドロキシルラジカルの産生を認めなかった (図 6 b)。

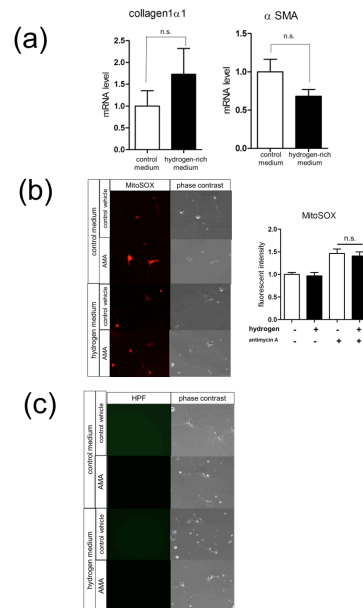
図6 水素はディッシュ培養での星細胞活性化に影響を与えない。



(6) 酸化ストレス誘導下においても、水素は星細胞活性化に影響を与えない。

さらに、水素の星細胞の活性化への影響を調べるために、星細胞に対し AMA による酸化ストレス誘導を行い、通常培地および水素添加培地での星細胞の動態を観察した。水素水添加培地においても星細胞の活性化の状況に変化は見られなかった (図 7 a)。AMA による酸化ストレス誘導下において、スーパーオキシドアニオンのマーカーである MitoSOX 陽性の細胞は増加を示したものの、ヒドロキシルラジカル陽性細胞は認めなかった (図 7 b、c)。

図7 酸化ストレス誘導下においても、水素は星細胞活性化に影響を与えない



(7) まとめ

これまで種々の抗酸化活性物質と肝臓線維化抑制効果についての報告は散見されるが、活性酸素の中でも、ヒドロキシルラジカルの役割に言及した論文は見られない。我々の *in vitro* 実験の結果、水素の添加により肝細胞においてヒドロキシルラジカルの産生抑制と肝細胞壊死の軽減を観察した。これらは、肝細胞におけるヒドロキシルラジカルのコントロールが肝細胞死と密接に関連する可能性を示唆する。

我々は肝細胞傷害モデルである CC14 と TAA モデルでの水素の肝臓線維化抑制効果を示したとともに、胆管細胞傷害モデルである BDL モデルではそれらの効果が見られないことを示した。BDL モデルでは、ヒドロキシルラジカルが肝臓内に産生されないことから、水素の肝臓線維化抑制効果はヒドロキシルラジカルと関連していることの証左が伺える。

これまで、活性酸素が肝臓内の主たる線維芽細胞の活性化に直接影響するという報告も見られるが、水素においては星細胞への直接の効果は見られなかった。

本研究は水素による肝線維化抑制効果を証明したのみならず、肝線維化誘導過程において活性酸素の中でもヒドロキシルラジカルの果たす役割を示せた点において意義深い結果が得られたものと考えている

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 30 件)

- (1) Koyama Y, Taura K, Hatano E, Uemoto S (15人中2番目, 責任著者) Effects of Oral Intake of Hydrogen Water on Liver Fibrogenesis in Mice. *Hepatology Research*, 査読有, epub, 2013.
DOI: 10.1111/hepr.12165.
- (2) Ishii T, Hatano E, Taura K, Uemoto S (8人中3番目) Sorafenib in a hepatocellular carcinoma patient with end-stage renal failure: A pharmacokinetic study *Hepatology Research*, 査読有, epub, 2013.
DOI: 10.1111/hepr.12156.
- (3) Brenner DA, Kisseleva T, Scholten D, Taura K (11人中11番目) Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis. Tissue Repair*, 査読有, Epub, 2012.
DOI: 10.1186/1755-1536-5-S1-S17

- (4) Yamanaka K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (14人中13番目) Effect of olprinone on liver microstructure in rat partial liver transplantation. *J Surg Res*, 査読有, Epub, 2012.
DOI: pii: S0022-4804(12)01907-5.
- (5) Nakamura K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (9人中8番目) Sorafenib attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in rats through suppression of JNK and MMP-9. *J Hepatol*, 査読有, 57巻, 2012, 1037-1043.
DOI: 10.1016/j.jhep.2012.07.004.
- (6) Yamamoto K, Yamanaka K, Taura K, Fukushima M (11人中6番目) An eClinical trial system for cancer that integrates with clinical pathways and electronic medical records. *Clin Trials*, 査読有, 9巻, 2012, 408-417.
DOI: 10.1177/1740774512445912.
- (7) Iwaisako K, Haimerl M, Taura K, Schnabl B (12人中4番目) Protection from liver fibrosis by a peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist. *PNAS*, 査読有, 109巻, 2012, 1369-1976.
DOI: 10.1073/pnas.1202464109.
- (8) Yamanaka K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (11人中7番目) Early evaluation of transcatheter arterial chemoembolization-refractory hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, 査読有, 47巻, 2012, 343-346.
DOI: 10.1007/s00535-011-0511-x.
- (9) Kitamura K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (10人中8番目) Preoperative FDG-PET predicts recurrence patterns in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 査読有, 2011, 156-162.
DOI: 10.1245/s10434-011-1990-y.
- (10) Yanagida A, Iwaisako K, Taura K, Kinoshita M (10人中4番目) Downregulation of the Wnt antagonist Dkk2 links the loss of Sept4 and myofibroblastic transformation of hepatic stellate cells. *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 2011, 1403-1411.
DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.06.015.
- (11) Brenner DA, Seki E, Taura K, Kodama Y (12人中3番目) Non-alcoholic

- steatohepatitis-induced fibrosis: Toll-like receptors, reactive oxygen species and Jun N-terminal kinase. *Hepatolo Res*, 査読有, 2011, 683-686.
DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00814.x.
- (12) Kitamura K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (12人中9番目) Proliferative activity in hepatocellular carcinoma is closely correlated with glucose metabolism but not angiogenesis. *J Hepatol*, 査読有, 55巻, 2011, 846-857.
DOI: 10.1016/j.jhep.2011.01.038.
- (13) Yamanaka K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (12人中4番目) Comparative study of cisplatin and epirubicin in transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 査読有, 41巻, 2011, 303-309.
DOI: 10.1111/j.1872-034X.2010.00770.x.
- (14) Yamanaka K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (10人中8番目) Olprinone attenuates excessive shear stress through up-regulation of endothelial nitric oxide synthase in a rat excessive hepatectomy model. *Liver Transpl*, 査読有, 17巻, 2011, 60-69.
DOI: 10.1002/lt.22189.
- (15) Kanai M, Yoshimura K, Taura K, Hatano E (23人中11番目) A multi-institution phase II study of gemcitabine/S-1 combination chemotherapy for patients with advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemothera Pharmacol*, 査読有, 67巻, 2011, 1429-1434.
DOI: 10.1007/s00280-010-1443-5.
- (16) Kitamura K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (13人中7番目) Prognostic value of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with extrahepatic bile duct cancer. *J hepatobiliary Pancreat Sci*, 査読有, 18巻, 2011, 39-46.
DOI: 10.1007/s00534-010-0293-1.
- (17) 田浦康二朗, 波多野悦朗, 池野嘉信, 上本伸二 (6人中1番目) 【消化器外科医が知っておくべき血管外科手技】肝腫瘍に対する下大静脈合併切除・再建術(解説/特集) 手術, 査読無, 67巻, 2013, 297-302.
<http://www.kanehara-shuppan.co.jp/journal/guide.html>
- (18) 石井隆道 波多野悦朗 田浦康二朗 上本伸二 (6人中3番目) 【進行胆道癌(Stage III、IV)切除後長期生存例からみた治療方針】 進行胆道癌の長期生存に関わる予後因子の解析ならびに再発症例に対する治療方針の検討(原著論文/特集) 癌の臨床, 査読無, 59巻, 2013, 33-37.
<http://www.shinoharashinsha.co.jp/>
- (19) 田浦康二朗 波多野悦朗 石井隆道 上本伸二 (4人中1番目) 【肝胆膵外科手術におけるシミュレーションとナビゲーション】 3D CT angiographyとcholangiographyのfusion画像による胆道癌手術プランニング(解説/特集), 胆と膵, 査読無, 34巻, 2013, 81-85.
<http://www.igakutosho.co.jp/>
- (20) 波多野悦朗 瀬尾智 田浦康二朗 上本伸二 (6人中4番目) 【肝細胞癌に対する治療の現状と標準化】 肝動脈注入化学療法により切除可能となった高度脈管侵襲を伴う切除不能進行肝細胞癌(解説/特集), 消化器内科, 査読無, 55巻, 2012, 656-661.
<http://www.kahyo.com/>
- (21) 波多野悦朗 瀬尾智 田浦康二朗 上本伸二 (5人中4番目) 【肝細胞癌のすべて2012】 治療法の進歩 高度進行癌の外科治療(解説/特集) 肝・胆・膵, 査読無, 65巻, 1211-1217.
<http://www.arcmedium.co.jp/>
- (22) 波多野悦朗 瀬尾智 田浦康二朗 上本伸二 (10人中7番目) 【肝内胆管癌診療のトピックス】 肝内胆管癌におけるPET/CTの意義(解説/特集) 日本消化器病学会, 査読無, 109巻, 2012, 1878-1884.
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ck8syokb/2012/010911/003&name=1878-1884j&UseRID=130.54.130.240&base=jamas_pdf
- (23) 小山幸法 波多野悦朗 田浦康二朗 上本伸二 (9人中3番目) 進行肝細胞癌に伴う下大静脈腫瘍栓、門脈腫瘍栓に対する放射線治療の有効性, 肝臓, 査読有, 53巻, 2012, 486-493.
DOI: 10.2957/kanzo.53.486

- (24) 金井雅史 波多野悦朗 田浦康二朗 上本伸二 (11人中4番目)【胆嚢癌フロントライン】薬物治療 GEM/S-1併用療法による切除不能胆道癌の治療成績, 肝・胆・膵, 査読無, 64巻, 2012, 599-605.
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ao1ktsud/2012/006404/020&name=0599-0605.j&UserID=130.54.130.240&base=jamas_pdf
- (25) 波多野悦朗 岡村裕輔 田浦康二朗 上本伸二【手術助手にはこうしてほしい】肝胆膵領域 肝尾状葉切除術, 外科, 査読無, 74巻, 2012, 12-15.
<http://www.nankodo.co.jp/>
- (26) 波多野悦朗 三和千里 田浦康二朗 上本伸二 (14人中10番目)【他科との連携手術-知っておくべき最新の知識】呼吸器外科、心臓・血管外科との連携 肝癌の心大血管内腫瘍栓, 外科, 査読無, 73巻, 2011, 1437-1442.
<http://www.nankodo.co.jp/>
- (27) 山中健也 波多野悦朗 田浦康二朗 上本伸二 (8人中4番目)胆道癌に対する術中腹腔洗浄細胞診の検討, 日本消化器外科学会雑誌, 査読有, 2011, 803-808.
DOI: 10.5833/jjgs.44.803
- (28) 波多野悦朗 小山幸法 田浦康二朗 上本伸二 (5人中4番目)【下大静脈にかかわる病態を見直す】治療方針 下大静脈内腫瘍栓を伴う肝癌の治療方針, 臨床外科, 査読無, 66巻, 2011, 1201-1207.
<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=32347>
- (29) 田浦康二朗 波多野悦朗 安近健太郎 上本伸二 (5人中1番目)【Incidental Gallbladder Cancer】偶発胆嚢癌に対する腹腔鏡下胆嚢摘出術後ポート部位再発の検討, 胆と膵, 査読無, 32巻, 2011, 425-429.
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=aa6tnsid/2011/003205/013&name=0425-0429.j&UserID=130.54.130.240&base=jamas_pdf
- (30) 田浦康二朗 小倉靖弘 上本伸二 (3人中1番目)【肝区域と画像診断update】画像からみた新しい肝の解剖学的理解と臨床応用 肝移植のための区

域診断, 肝胆膵画像, 査読無, 13巻, 2011, 456-460.

<http://www.igakutosho.co.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田浦 康二郎 (TAURA KOJIRO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80378629