

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890126

研究課題名(和文) 質量分析機器を用いた肝炎から肝硬変への進展予測因子の開発

研究課題名(英文) Analyses of predictive factors from hepatitis to cirrhosis using metabolomics

研究代表者

斉藤 雅也 (Masaya, Saito)

神戸大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：00631558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：コリン欠乏食投与前のマウスのコントロール肝組織と比較して、コリン欠乏食投与後4週間目において、肝炎が誘起されていることを確認した。血清中での比較も行ったところ、タウリンの低下が認められた。また、コリン欠乏食投与後8週間目のマウスの肝組織において、肝硬変へ進展していることを確認した。血清中での比較も行ったところ、著明なタウリンの低下が認められた。以上より、マウスの正常肝から肝炎、肝硬変への進展は、タウリン低下と関連していることが示唆された。さらに、タウリンはヒトでも正常肝から肝炎、肝硬変へ進展する過程において血中濃度が低下していく傾向性を認めた。タウリン濃度が肝線維化進展のマーカーになりうる。

研究成果の概要(英文)：Using liver biopsy, hepatitis was induced in mice with coline-deficient diet for 4 weeks, but not in mice without coline-deficient diet. Serum level of taurine decreased in mice with coline-deficient diet for 4 weeks. In mice with coline-deficient diet for 8 weeks, liver tissue showed cirrhosis from hepatitis.

In cirrhotic mice, moreover, serum level of taurine decreased compared with that of hepatitis mice. Therefore, serum taurine would negatively be associated with liver fibrosis in mice. In human as well as mice, serum level of taurine was negatively associated with liver fibrosis. We thought that serum level of taurine would be a predictive marker of liver fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：肝硬変 肝線維化

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は日本人の死亡原因の第1位であり、中でも肝細胞がんは男性で第4位、女性では第7位を占める〔平成21年度〕。この原因としては、肝発がんのリスクファクターである慢性肝炎の有病者が多いこと(慢性B型肝炎で120万人、慢性C型肝炎で200万人)、未だ根治的な治療法が存在しないことが挙げられる(国民衛生の動向2011)。幼若期に感染したB型肝炎ウイルス、および、C型肝炎ウイルスは、いずれも肝細胞に慢性持続性感染を誘導し、慢性肝炎から徐々に肝硬変へと進展、さらに高率に肝細胞がんを誘発することが知られている。申請者は、このような肝機能低下を背景とした肝細胞がんに対し、担がん患者の生存期間の延長、ならびに、QOLの向上を目標に診療を行ってきた。

外科的手術が困難な進行肝細胞がんに対しては経皮的肝動脈塞栓術(TACE)が広く行われている。当初は残存肝機能の保護が考慮に入れられなかったため、TACEは、諸外国にて生命予後延長効果が否定された(Pelletier G, et al. J Hepatol 1998; 29: 129-134)。申請者も、肝細胞がんに対し、他のがん種と同様な積極的治療を行うことで、結果的に背景肝機能の低下を誘発してしまい、患者の生命予後が短縮することとなった症例を経験している。近年、背景肝機能を保護する目的で選択的塞栓術が広く行われるようになり、それぞれの患者の肝機能に適した治療が可能となりつつある。このように、肝細胞がんに対する治療は、がんそのものに対する治療と背景肝機能保護のバランスが重要である。申請者は、肝細胞がんに対する治療後早期の肝代謝の変化が、治療後長期の肝機能悪化に関わっていること(Saito M, et al. J Gastroenterol 2012 Feb 18. Epub ahead of print)、肝細胞がんに対する治療前の肝内低酸素状態が治療後長期の肝機能悪化に関わっていること

Gastroenterol 2012 Mar 24. Epub ahead of print、また、治療後長期の肝機能悪化そのものが、腫瘍ステージに関係なく生命予後に関与していること(Saito M, et al. Aliment Pharmacol Ther 2012 Apr; 35(7):861-2)を明らかにしてきた。しかしながら、選択的塞栓術により詳細な治療が可能となっている現在、残存肝機能の評価には、現在用いられている血清アルブミン値、総ビリルビン値、プロトロンビン時間などの指標ではいまだTACE治療による残存肝機能予測には不十分であり、より詳細で高解像度な肝機能マーカーの同定が望まれている。

これまで、薬理遺伝学の研究分野においては、タンパク質解析によるゲノムの解析機能、診断や治療にSNPsなどの遺伝子多型や遺伝子の発現量をマーカーとして利用する研究が進められている。これらのことから、生命機能に関連したプロテオーム研究により、タンパク質の量的、質的変動に関する情報が得られ、相互に作用するタンパク質のリンケージ解析が行われ、その生理機能がより詳細に解明されるものと期待されている。肝細胞がんの背景肝である硬変肝では、肝機能悪化のキーとなるタンパク質の発現、ならびに、その活性変化により、代謝・分解された新たな代謝産物が生成される。このような具体的なタンパク質の機能解析に加えて、タンパク質以外の細胞内低分子の量的、質的な変動に対する代謝分子の総体の解析(メタボローム解析)が必要になると考えている。近年、申請者が所属する機関において、近年、ガスクロマトグラフ四重極型質量分析計(GC/MS)を用いたメタボローム解析を行うことで、いくつかの疾患において特異的な血液代謝物のパターンが存在することを明らかになった。そこで、申請者は、このメタボローム解析を自分の研究分野に応用しようと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、マウス疾患モデルならびにヒト臨床検体を用いて、メタボローム解析を行う。慢性肝炎から肝硬変への進展に関わる代謝産物パターンの解析を行い、慢性肝炎から肝硬変への進展を予測するバイオマーカーを同定し、肝硬変への進展予測モデルを確立して臨床応用の礎とする。

研究期間内に以下の項目について明らかにする。

課題：網羅的代謝物解析による肝機能悪化予測のための血清メタボロームの同定

1-1: GC/MS を用いたコリン欠乏食投与肝炎・肝硬変マウスでのアミノ酸、有機酸分析

1-2: GC/MS を用いた肝炎・肝硬変患者でのアミノ酸、有機酸分析

課題：肝炎から肝硬変への進展予測式の検討

- 1: 肝炎から肝硬変への進展予測式の作成
- 2: 肝炎から肝硬変への進展予測式の確認

3. 研究の方法

課題：網羅的代謝物解析による肝硬変への進展予測のための血清メタボロームの同定

1-1: GC/MS を用いたコリン欠乏食投与肝炎・肝硬変マウスでのアミノ酸、有機酸分析

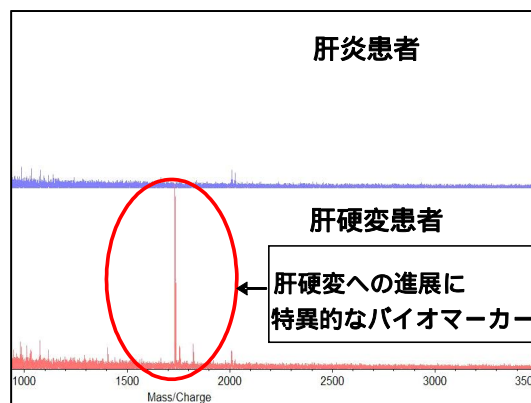
マウスにコリン欠乏食を4週間、あるいは、8週間連日摂取させることで、それぞれの肝組織が病理組織学的に肝炎、および、肝硬変になることが報告されている。課題1-1では、まずこの肝炎・肝硬変マウスを用いて、それぞれ血清中代謝産物を脂溶性化合物、水溶性化合物に分けて網羅的に解析する。

具体的には、コリン欠乏食投与後4週間目、あるいは、8週間目のマウスの肝組織の病理組織学的検索にて、肝炎、または、肝硬変であることを確認した後、それぞれのマウス血清からそれぞれ代謝産物を抽出し、得られた抽出液をGC/MSに供する。得られたクロマトグラムを主成分分析によりアミノ酸、有機酸の比較解析を行う。この結果により、肝炎か

ら肝硬変への進展に関わるメタボロームを同定する。

1-2: GC/MS を用いた肝炎・肝硬変患者でのアミノ酸、有機酸分析

肝炎、あるいは、肝硬変患者のうち、研究の同意が得られた患者についてのみ肝生検を行い、病理組織学的に肝線維化の程度を評



GC-MS 解析による肝硬変への進展に特異的なバイオマーカー同定の実際

価する。また、これら患者から血清を提供していただき、1-1 で確立した方法を用いて、GC/MS を用いたアミノ酸、有機酸の比較解析を実施する。肝炎、ならびに、肝硬変の両群合わせて200例以上の症例数を目標として設定する。得られた解析結果と、病理組織学的な肝線維化の程度とを照らし合わせることで、肝硬変への進展に関わる代謝産物のパターンを明らかにする。

課題：肝炎から肝硬変への進展予測式の検討

-1: 肝炎から肝硬変への進展予測式の作成
肝炎から肝硬変への進展予測式を作成するために、GC/MS 分析において、以下の項目をファーストスクリーニングとして検討する。

4. 研究成果

コリン欠乏食投与前のマウスのコントロール肝組織と比較して、コリン欠乏食投与後4週間目において、肝炎が誘起されていることを確認した。血清中での比較も行ったところ、タウリンの低下が認められた。また、コリン

欠乏食投与後 8 週間目のマウスの肝組織において、肝硬変へ進展していることを確認した。血清中での比較も行ったところ、著明なタウリンの低下が認められた。以上より、マウスの正常肝から肝炎、肝硬変への進展は、タウリン低下と関連していることが示唆された。さらにヒトの肝炎から肝硬変への進展予測式を作成するために、GC-MS 分析において肝炎患者と肝硬変患者との間で有意なさがある血清中代謝産物を選択した。この結果、やはりタウリンはヒトでも正常肝から肝炎、肝硬変へ進展する過程において血中濃度が低下していく傾向性を認めた。さらに、この分析を通じて、安定性、日内・日間変動がないかの確認を行った。この結果、早朝空腹時でのタウリン濃度がより安定性を保っていることが明らかになった。肝炎、肝硬変への進展の予測式は、タウリン濃度に逆相関するパターンを示した。別グループで validation を行うも、やはり同様の傾向性を示すことができた。以上より、ヒトでもタウリン濃度が肝線維化進展のマーカーになりう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 16 件)

1. Fugui Bai, Yoshihiko Yano, Soo-Ryang Kim, Yasushi Seo, Akira Miki, Masaya Saito, Hirotaka Hirano, Kenji Momose, Akihiro Minami, Yuri Hatazawa, Takanobu Hayakumo, Dewiyani Widasari, Hanggoro Tri Rinonce, Masahiko Sugano, Satoshi Tani, Seitetsu Yoon, Susumu Imoto, Takeshi Azuma, Hak Hotta, Yoshitake Hayashi. Mutational diversity of NS5A and NS3 during triple therapy (telaprevir,

pegylated-interferon- 2b and ribavirin) for genotype 1b chronic hepatitis C: The Kobe Hepatitis Therapeutic Group. *Int J Mol Med* 2014 Mar 19. doi: 10.3892/ijmm.2014.1706. [Epub ahead of print]

2. Masaya Saito, Yoshihiko Yano, Akihiro Minami, Hirotaka Hirano, Kenji Momose, Maki Sugimoto, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Branched-chain amino acid granules improve non-protein respiratory quotient after radiofrequency ablation. *Intern Med* 2014, in press
3. Fugui Bai, Yoshihiko Yano, Takumi Fukumoto, Atsushi Takebe, Motofumi Tanaka, Kaori Kuramitsu, Nungki Anggorowati, Hanggoro Tri Rinonce, Dewiyani Widasari, Masaya Saito, Hirotaka Hirano, Takanobu Hayakumo, Yasushi Seo, Takeshi Azuma, Yonson Ku, Yoshitake Hayashi. Quantification of Pregenomic RNA and Covalently Closed Circular DNA in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Int J Hepatol* 2013:849290. doi: 10.1155/2013/849290. Epub 2013 Dec 19.
4. Masaya Saito, Yoshihiko Yano, Akihiro Minami, Kenji Momose, Hirotaka Hirano, Takashi Yamasaki, Tomoo Itoh, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Autoimmune-associated hemophagocytic syndrome originating from autoimmune hepatitis with a successful response to therapy: a

- case report. Intern Med 2014; 53(2):103-107.
5. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Kenji Momose, Hirotaka Hirano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Serum albumin and prothrombin time before entecavir treatment in chronic hepatitis B or cirrhosis are related to amelioration of liver function after treatment. Eur J Gastroenterol Hepatol 2013; 25(12):1369-76.
 6. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Keiichiro Uehara, Shigeo Hara, Kenji Momose, Hirotaka Hirano, Hiroshi Yokozaki, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Portal venous tumor growth- type of hepatocellular carcinoma without liver parenchyma tumor nodules: a case report. Ann Hepatol 2013; 12(6): 969-973.
 7. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Kenji Momose, Hirotaka Hirano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Reduction in non-protein respiratory quotient is related to overall survival after hepatocellular carcinoma treatment. PLoS One 2013; 8: e55441. doi: 10.1371/journal.pone.0055441. Epub 2013 Mar 8.
 8. Hirotaka Hirano, Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Takeshi Azuma. NX-DCP as a novel biomarker would be related to liver function in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol 2013; 25(6): 748-749.
 9. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Kenji Momose, Hirotaka Hirano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Successful treatment by coil embolization of symptomatic intrahepatic portosystemic venous shunt through a patent ductus venosus in a non-cirrhotic adult: a case report. Intern Med 2013; 52(5): 555-559.
 10. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Akira Miki, Kenji Momose, Hirotaka Hirano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Alteration of non-protein respiratory quotient after hepatocellular carcinoma treatment can be related to des- -carboxy prothrombin before treatment. SpringerPlus 2012; 1: 55.
 11. Yoshihiko Yano, Yasushi Seo, Akira Miki, Masaya Saito, Hirotaka Kato, Ken-Ichi Hamano, Manabu Oya, Sachiko Ouchi, Takashi Fujisawa, Hajime Yamada, Yukimasa Yamashita, Satoshi Tani, Shigeya Hirohata, Seitetsu Yoon, Naoto Kitajima, Kazunari Kitagaki, Akira Kawara, Takatoshi Nakashima, Hosai Yu, Tetsuo Maeda, Takeshi Azuma, Ahmed El-Shamy, Hak Hotta, Yoshitake Hayashi, Kobe Hepatitis Therapeutic Group. Mutations in non-structural 5A and rapid viral response to pegylated interferon- -2b plus ribavirin therapy are associated with

- therapeutic efficacy in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *Int J Mol Med* 2012; 30(5):1048-1052.
12. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Akira Miki, Yukiko Morinaga, Tomoo Itoh, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. A Hepatocellular Carcinoma Developed Following 18 Years from Sustained Virological Response to Interferon Therapy in a Patient with Chronic Hepatitis C: Case Report and Literature Review. *Clin J Gastroenterol* 2012; 5(2): 119-126.
13. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Akira Miki, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. A high value of serum des- -carboxy prothrombin before hepatocellular carcinoma treatment can be associated with long-term liver dysfunction after treatment. *J Gastroenterol* 2012; 47(10): 1134-1142.
14. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Akira Miki, Yukiko Morinaga, Tomoo Itoh, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Sonazoid-enhanced ultrasonography and Ga-EOB-DTPA-enhanced MRI of hepatic inflammatory pseudotumor: a case report. *Intern Med* 2012; 51(7):723-6.
15. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Akira Miki, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Short-term reductions in non-protein respiratory quotient

- and prealbumin can be associated with the long-term deterioration of liver function after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2012 47(6):704-14.
16. Masaya Saito, Yasushi Seo, Yoshihiko Yano, Akira Miki, Kenji Momose, Hirotaka Hirano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Liver dysfunction and survival in hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolization. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35(7):861-2.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 雅也 (SAITO, Masaya)

神戸大学医学部附属病院 医員

研究者番号 : 0 0 6 3 1 5 5 8