

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 11 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450451

研究課題名(和文)酸化ストレスによる肝炎・肝癌発症機序と治療薬の開発に関する研究

研究課題名(英文) Study on a target of the treatment of hepatitis and hepatoma induced by oxidative stress

研究代表者

林 正信 (HAYASHI, Masanobu)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：10130337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓に蓄積した銅による酸化ストレスによって起こるLECラットでの急性肝障害の重篤化の原因として溶血性貧血が考えられるが、ビタミンE誘導体は黄疸を防止することが示された。また、LECラットの肝癌の発症過程においてヒト肝癌と同様な遺伝子発現の変化が起こっており、ヒト肝癌の治療薬を開発する際にLECラットが有用であることが示された。銅は腫瘍細胞で種々の役割を果たしており、銅キレート剤による抗銅療法が検討されている。銅キレート剤は抗がん剤との併用で相加的または相乗的に腫瘍細胞に致死を引き起こした。

研究成果の概要(英文)：Acute hepatic injury in LEC rats is induced by oxidative stress due to an abnormal hepatic accumulation of copper. Cause of severe hepatitis is considered to be associated with hemolytic anemia. Vitamin E derivatives protect LEC rats from severe jaundice. During the process of the liver disease to hepatocellular carcinogenesis via acute hepatitis and chronic hepatitis in LEC rats, changes in expression of many genes were observed. More importantly, similar changes in expression of genes in the liver of LEC rats were shown to those in the progression of human liver tumors. Therefore, LEC rat is a useful animal model for investigation of target genes for tumor treatments of human hepatocellular carcinoma. Copper plays an important role in tumorigenesis, such as angiogenesis and metabolic regulation. A combination of treatment by copper-chelating agent and chemotherapy interacted synergistically and/or additively in induction of cell death in tumor cells in vitro.

研究分野：放射線生物学・実験動物学

キーワード：酸化ストレス 肝癌・肝炎 銅蓄積 銅キレート剤 LECラット 放射線感受性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) LEC ラットは銅輸送タンパク質である *atp7b* 遺伝子の変異によって肝臓に銅の蓄積を起こすヒトウイルソン病のモデル動物である。LEC ラットでは銅の蓄積によって発生する酸化ストレスによって 3~4 カ月齢で重症の黄疸を伴う急性肝炎を発症するが、その発症機序については明らかとなっていなかった。

(2) 肝細胞癌は世界的には 5~6 番目に多い癌であり、非常に致死率が高く、治療薬の開発が求められている。LEC ラットでは急性肝炎発症後、慢性肝炎を経て長期生存個体ではほぼ 100%に肝細胞癌を発症し、ヒト肝癌と同様な発症過程を有するが、ヒト肝癌はウイルスが原因の場合が多く、LEC ラットにおける肝癌の発症過程においてヒトと同様な遺伝子の発現変化を示すかについては明らかではなかった。

(3) 低い線量での放射線による生物影響、特に発癌リスクは社会的に重要な関心が持たれている。放射線の作用は主として活性酸素(酸素ラジカル)の産生によって生じる酸化ストレスが原因であるが、低い線量率で長期間継続して放射線を照射することは技術的に困難で、その際の生体反応については明確になっていなかった。

## 2. 研究の目的

低い線量での放射線による生物影響、特に発癌リスクは社会的に重要な関心が持たれている。放射線の作用は主として活性酸素(酸素ラジカル)の産生によって生じるが、低い線量率で長期間継続して放射線を照射することは技術的に困難で、その際の生体反応については明確になっていない。活性酸素は放射線以外に生体内で酸素呼吸などに伴って産生されているが、銅や鉄などの遷移金属との反応でも産生される。本研究は生体内に銅を蓄積することで長期間に渡って活性酸素(酸化ストレス)に曝されている動物モ

デル(LEC ラット)を使用して酸化ストレスによる肝炎・肝癌発症機序を明らかにし、その治療方法を開発することを目的として実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 急性肝炎発症機序と阻害剤の効果の検討

急性肝炎発症時期と発症前期の遺伝子の発現の変化についてマイクロアレイを用いて解析し、特徴的な発現変化を示す遺伝子についてその阻害剤を用いることで肝炎の発症との関連性を検討する。また、ウイルソン病では銅の遊離に伴い赤血球の溶血が起こり、重症の黄疸が引き起こされ、腎臓や眼、中枢神経など他の臓器の病態に影響することが示されている。抗酸化剤の黄疸や肝炎発症への影響を解析することで急性肝炎の治療方法について検討する。

### (2) 慢性肝炎期において特徴的に変動する遺伝子群の同定

慢性肝炎期における遺伝子の発現の変化についてマイクロアレイを用いて解析し、特徴的に発現が変化する遺伝子群を同定し、銅キレート剤などの投与によって慢性肝炎の発症を予防した際と比較して解析し、慢性肝炎の発症におけるこれらの遺伝子の役割を解析するとともに治療標的となる遺伝子を明らかにする。

### (3) 慢性肝炎から肝癌への進行に関わる遺伝子群の検討

肝癌期において遺伝子の発現の変化を解析し、ヒト肝癌での遺伝子発現変化と比較することで LEC ラットにおいてヒトと同様な機序で肝癌を発症するかについて解析する。また、慢性肝炎期から月齢を追ってこれらの遺伝子の発現変化を解析し、前癌状態から肝癌に到る機序を明らかにするとともに治療標的となる候補遺伝子を同定する。

### (4) 低用量酸化ストレスに対する修復能など細胞応答における特殊性の検討

低線量放射線によってDNA損傷が生じた際におけるDNA修復の機序や細胞応答は高線量放射線によって多数のDNA損傷が生じた際と差異があることが示唆されているが、これらの報告については矛盾する結果も示されている。DNA修復能に一部欠損を有するLECラット細胞における低線量の放射線の照射効果を他の細胞と比較し、DNA修復能が肝癌発症に影響しているか否かを検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 急性肝炎発症機序と阻害剤や抗酸化剤の効果の検討

マイクロアレイによる発現遺伝子解析によってストレス活性化タンパク質キナーゼ(以下SAPK)が急性肝障害期に発現が特徴的に変化していることが示された。ウエスタンブロット解析によってSAPKのうち、p38mapkの活性が増加していた。P38mapkの特異的な阻害剤SB203580の投与によって、右表のように肝障害、特に黄疸が軽減されることが示された。急性肝炎期においてTGF-活性化キナーゼ(TAK1)mRNAの発現量が増加していることから、銅の蓄積によって生じた酸化ストレスによりTAK1の発現が増加し、p38mapkの発現が誘発され、その結果として急性肝障害を発症することが示された。また、ウイルソン病における劇症肝炎の治療にこの経路の阻害剤が有用であることが示唆された。さらに、抗酸化剤であるビタミンE誘導体である、

トコフェロールコハク酸の皮下投与によって黄疸の発症は防止されたが、肝障害の発症は影響を受けないことが示された(右表)。この結果はLECラットにおける黄疸の発症は肝障害とは別の機序でおこることを示した。

トコフェロールコハク酸は抗腫瘍活性を有することが示されており、黄疸と肝癌の複合的な発症予防の可能性が考えられた。

##### (2) 慢性肝炎期において特徴的に変動する遺伝子群の同定

LECラット肝臓では週齢に伴って多くの遺

表 肝炎発症に対する種々の薬剤での処理効果

週齢と処理条件	AST (U/L)	ALT (U/L)	総ビリルビン (mg/dL)
4	53 ± 12	121 ± 15	0.27 ± 0.07
10	149 ± 20	155 ± 32	-
13	573 ± 129	548 ± 154	6.4 ± 3.7
13 + SB*	286 ± 144	295 ± 155	0.29 ± 0.17
13 + TS**	620 ± 99	534 ± 199	0.25 ± 0.15
14	687 ± 94	822 ± 211	5.42 ± 1.95
14 + TS**	524 ± 97	416 ± 62	0.43 ± 0.20

SB\*:SB203580 処理、TS\*\*: トコフェロールコハク酸処理

伝子の発現が変化することが示された。変化した遺伝子数は対照とした正常ラットと比較して2倍以上であり、酸化ストレスへの暴露や肝炎発症に伴う変化であることが考えられた。慢性肝炎の発症に関連する遺伝子を明らかにするため銅の蓄積を予防する銅キレート剤を長期投与し、投与しない場合と比較した。銅キレート剤としてウイルソン病の治療薬として使用されているD-ペニシラミンまたは塩酸トリエンチンを経口投与した。急性肝炎期には発現の変化が2倍以内であり、慢性肝炎期には発現が4~32倍増加する7つの遺伝子に注目し、D-ペニシラミンの効果を検討した。炎症や腫瘍などで増加する急性期タンパク質である1-酸性糖タンパク質は慢性肝炎期に32倍と大きく発現が増加したが、D-ペニシラミンによる影響はみられなかった。7つの遺伝子の内、ガレクチン2関連タンパク質、線維芽細胞増殖因子-5、インターロイキン1受容体2型、ポロライクキナーゼの4遺伝子の発現はD-ペニシラミンによって減少し、4週齢と同程度の発現量となった。これらの遺伝子が慢性肝炎の発症と関連していると考えられ、慢性肝炎の発症防止の標的となることが期待される。

##### (3) 慢性肝炎から肝癌への進行に関わる遺

## 伝子群の検討

ヒト肝癌ではいくつかの特徴的な遺伝子の発現変化が報告されているが、肝癌の原因は主としてB型やC型などの肝炎ウイルスの感染である。LEC ラットにおける肝癌の発症過程においてヒト肝癌と類似した遺伝子発現の変化が起こっているかについて検討した。ヒト慢性肝炎や肝細胞癌で高い発現の増加がみられている活性化誘発性シチジンデアミナーゼ(以下 AID)は LEC ラット肝臓においても慢性肝炎期(5 カ月齢)に顕著に増加し、肝癌期(1 年齢)でも高い発現レベルが見られた。AID は DNA に変異を引き起こしやすく(C/G から T/A への変異を起こす)癌化に寄与していると考えられている。AID の発現増加は TGF $\beta$  の発現増加を介して調節されているが、LEC ラット肝臓において TAK1 や TGF $\beta$  受容体の発現の増加が見られた。また、ヒト肝癌、特に肝細胞癌では Wnt/カテニン、RAS/Raf/MEK/ERK、PI3K/mTOR、sonic hedgehog 経路の発現増加が報告されている。さらに、50%の肝癌では Wnt/カテニンを活性化する遺伝子変異が見られる。LEC ラット肝癌の発症過程において癌発症の時期より早く(5 月齢くらいから)wnt/カテニン経路や ras/raf/mTOR 経路の発現の変化が起こっていることが示された。一方、ヒト肝癌でみられるカテニンの遺伝子変異については検出されなかった。このように、LEC ラットにおける肝癌の発症過程ではヒト肝癌でみられる遺伝子の発現変化と類似した変化がみられ、これらの遺伝子に対する阻害剤などでの検討が治療薬の開発につながり、その際 LEC ラットが有用なモデルとなることが示された。

### (4) 銅キレート剤の長期投与の影響

肝癌の発症に直接関与している遺伝子の発現について検討するため、銅キレート剤を長期投与した LEC ラットと投与しないラットとを比較検討した。銅キレート剤を 4 週齢か

ら長期投与した LEC ラットでは慢性肝炎や肝癌の発症は顕著に抑制された。銅は腫瘍細胞中で正常細胞よりも高濃度に存在しており、腫瘍における血管新生などで作用していると考えられている。銅の生体への取り込みは腸管においては ATP7A と銅トランスポーター 1(以下 CTR1)が機能しており、肝細胞への取り込みは CTR1 が機能している。これらの銅輸送タンパク質 mRNA の発現は銅キレート剤を長期投与した場合でもほとんど変化せず、銅キレート剤の長期投与に伴って銅の取り込みには影響しないことが示され、銅輸送タンパク質の発現変化による他の遺伝子発現への 2 次的な影響はないと考えられた。

### (5) 低用量酸化ストレスによる修復能など細胞応答における特殊性の検討

LEC ラットや scid マウスの細胞は DNA の 2 本鎖切断の修復能に欠損がある。低線量の放射線など低用量の酸化ストレスに暴露した場合の生存率の変化について、正常修復能を有する細胞と比較した。どの細胞でも 50mGy の低い線量で暴露した際にそれ以上の高い線量に暴露した場合よりも細胞の生存率が低下する低用量高感受性(以下 LHRS)を示し、LHRS に DNA 損傷の修復能は関連しないことを示した。また、100mGy を照射後 3 時間後と 6 時間後に 4 および 8Gy の高線量で照射した場合の生存率は LEC ラット細胞、正常ラット細胞共に 4 および 8Gy のみを照射した細胞の生存率よりも高い値を示し、予めの低い酸化ストレスへの暴露はその後の高い酸化ストレスへの暴露に対して、抵抗性を示した。これらの低用量酸化ストレスの発癌への影響は不明であるが、LEC ラット肝癌発症において低用量酸化ストレスに対する反応性が肝癌の発症に大きな影響を与えることはないと考えられた。

## 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3件)

S. Kadowaki, S. Meguro, Y. Imaizumi, H. Sakai, D. Endoh and M. Hayashi, 2013. Role of p38 mapk in development of acute hepatic injury in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, an animal model of human Wilson's disease. J. Vet. Med. Sci. 75 (12) 1551-1556. 10.1292/jvms.13-0137 査読有

H. Sakai, N. Horiguchi, T. Agui and M. Hayashi, 2013. Effects of radiofrequency radiation at 40 kHz on stress-induced immune response in mice. J. Rakuno Gakuen Univ., 37(2): 189-194. 査読無

林 正信、長谷川時央、遠藤大二、泉澤康晴 2014. イヌ MEGF10 遺伝子における single nucleotide polymorphism (SNP) 分析 J. Rakuno Gakuen Univ., 39(1): 41-47. 査読無

〔学会発表〕(計7件)

遠藤大二、GenBank ダウンロードファイルから設計可能なウイルス・細菌網羅的検出用遺伝子縮重プライマー設計プログラムの開発、第158回日本獣医学会、2015年9月9日、北里大学(青森県・十和田市)

林 正信、ウイルソン病モデル動物、LEC ラットに対する - トコフェロールならびに トリエンチンの投与の効果について、第12回北海道実験動物研究会、2015年7月11日、北海道大学(北海道・札幌市)

林 正信、ウイルソン病モデル動物、LEC ラットにおける銅輸送タンパク質 Ctr1 遺伝子発現に対する トリエンチンの投与影響について、第19回ウイルソン病研究会学術集会、2015年5月9日、東邦大学(東京・大田区)

林 正信、ウイルソン病モデル動物、LEC ラット急性肝障害発症における p38 mapk の関与について、第18回ウイルソン病研究会学術集会、2014年5月17日、東邦大学(東京・大田区)

林 正信、ウイルソン病モデル動物、LEC ラットにおける慢性肝炎、肝癌期における遺伝子発現変化、第11回北海道実験動物研究会2014年7月26日、北海道大学(北海道・札幌市)

上田幸太郎、震災地域農作物放射能推定のための低価格 CsI(Tl)シンチレーションカウンタを活用した測定方法、平成26年度放射線安全取扱部会年次大会、2014年10月30日 札幌カデル2・7(北海道・札幌市)

遠藤大二、小規模施設向けタッチパネル型入室管理システムの開発、第12回放射線安全管理学会、2013年11月28日、北海道大学(北海道・札幌市)

〔図書〕(計1件)

林 正信 他、近代出版、放射線生物学、2015、78-93(総ページ数187)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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

学術研究コレクション(CLOVER)

<http://clover.rakuno.ac.jp/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

林 正信 (HAYASHI, Masanobu)  
酪農学園大学・獣医学群・教授  
研究者番号：10130337

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：