

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461000

研究課題名(和文) 低酸素による肝炎増悪と発癌メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analyses of the effects of hypoxia on the progression of liver disease and hepatic carcinogenesis.

研究代表者

加藤 正樹 (Kato, Masaki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60444808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肝疾患では肝内低酸素状態が、肝線維化や肝発癌を誘導している可能性がある。チオアセトアミドによるラット慢性肝障害モデルでは、早期より肝内に低酸素状態が出現し、これに一致して肝星細胞はIndian hedgehog発現の低下を介して活性化し、線維化を誘導していた。また、慢性肝障害患者の末梢血単核球では、HIF1やHO-1などの低酸素誘導遺伝子、VEGFAやAdrenomedullinなどの血管新生制御遺伝子の有意な発現増大が認められ、肝内低酸素状態の存在を反映していた。DNA損傷に反応するp21の発現も増大しており、肝内の低酸素状態が発癌ポテンシャルを増大させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intrahepatic hypoxia may enhance liver fibrosis and stimulate hepatic carcinogenesis in chronic liver disease. In thioacetamide induced rat chronic liver injury model, we observed the presence of hypoxia in liver parenchyma in the early period of injury and the activation of hepatic stellate cell, probably due to the down-regulation of Indian hedgehog. Then we analyzed the mRNA expression levels of hypoxia responsible genes in the peripheral blood mononuclear cells isolated from the patients with chronic liver disease. We observed the enhanced expressions of hypoxia response genes (HIF1, HO-1), and angiogenesis regulating genes (VEGFA, Adrenomedullin), which may suggest the presence of intrahepatic hypoxia. Corresponding expression of p21, a gene sensitive to DNA injury, was also elevated, suggesting the intrahepatic hypoxia may be involved in the DNA injury, leading to the increase of the risk of liver cancer.

研究分野：肝臓病学

キーワード：低酸素 肝線維化 肝発癌 肝星細胞 末梢血単核球 indian hedgehog adrenomedullin p21

## 1. 研究開始当初の背景

C型やB型肝炎などのウイルス慢性肝炎では肝線維化が次第に進行し、最終的には肝硬変に至り、肝癌発症や肝不全により死亡する。様々な抗ウイルス剤が進歩してきたが、高齢者の多いわが国の肝炎患者はすでに肝線維化が進行し肝硬変に至り治療対象とはならず、肝線維化の進行抑制や発癌予防に有用な方法は存在しない。また、近年で肥満を背景とした非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)による肝硬変に起因した肝癌が約20%を占めているが、この場合は疾患を制御できる治療法でさえも確立していない。したがって、一部の症例以外は、多くの慢性肝疾患患者では肝線維化が進行し続け、発癌ポテンシャルの高い状態が持続していく。

原疾患に関わらず肝線維化の進行とともに発癌率が增大していくため、線維化した環境そのものが発癌を誘導すると考えられている。特に、進行した線維化により類洞血流が障害されることで肝小葉が低酸素状態に陥り、酸化ストレスが増大して遺伝子障害が惹起されるという説が有力である。この過程で、低酸素に適応しようとする生体の反応がかえって臓器の線維化や発癌ポテンシャルの増大を招いている可能性が注目されている。

低酸素状態に陥った組織では、転写因子である低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor, HIF)が活性化し、低酸素に応じた代謝調節や新生血管の誘導により環境に適応しようとする。肝硬変組織ではHIFが活性化しており、その下流である解糖系酵素やグルコース輸送蛋白の発現増大を介して酸素利用率の少ないエネルギー代謝へ変化する。一方、HIFの活性化によって肝線維化の進行や肝癌の悪性化が誘導されることが解明された。HIF活性の増強した肝癌は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が誘導されるため高率に遠隔転移や血管内浸潤を伴って患者の生存率は低下する。線維成分を産生・分泌することで肝線維化の中心的役割をもつ肝星細胞でも、HIFの活性化が有害な効果をもたらす。低酸素状態では肝星細胞のHIFが活性化され、コラーゲン合成遺伝子の発現が増強されさらに線維化が進行する。線維化の進行におけるHIFの関与は、HIF1遺伝子発現を欠失させたマウスでは、胆管結紮による肝線維化が抑制されることでも示されている。このように、線維化が進行した肝組織では低酸素によってHIFが活性化され、さらに線維化が進行するという悪循環に陥っていると想定される。この視点から、HIFを標的とした肝硬変の治療法の解明が注目されている。

これまでの解析は完成した肝硬変を対象としている。厚い線維性間質に囲まれた偽小葉が低酸素状態にあることは容易に理解できるが、線維化が進行していない時点でも肝小葉の血流障害が生じて低酸素に陥っているか、HIFが活性化して線維化増悪因子とし

て作用しているかは不明である。肝炎早期から肝線維化にHIFが関与しているかを知るとは、HIFを標的とした治療法を構築する上で極めて重要である。また、肝癌発症と低酸素との詳細な解析も必要である。先に述べた低酸素による発癌仮説を立証するためには、肝組織における血流障害部位を明らかにし、この領域が低酸素状態陥ると同時に酸化ストレスが増大していること、この領域では発癌ポテンシャルが増大していることを証明する必要がある。さらに、肝組織が低酸素状態に陥っていることを示す臨床レベルでのマーカーの確立である。侵襲なく容易に測定可能な低酸素マーカーが得られれば、発癌高リスク症例を同定することが可能となり、より注意深く肝癌の発症を警戒することで患者の予後を改善できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) 慢性肝炎の進行における肝低酸素の存在の証明とその影響の解析

肝硬変を来す動物実験モデルを用いて、線維化が発達していない慢性肝炎の時点から肝硬変に至るまでの類洞血流を視覚化する。免疫二重染色を用いて、血流障害部位に低酸素状態が発生し、酸化ストレスレベルが増大しているか解析する。さらに、低酸素領域に一致して、肝星細胞の活性化やマクロファージの集簇が見られるか評価する。

(2) 低酸素と発癌ポテンシャルとの相関の解析

(1)で同定された肝低酸素領域に一致して、発癌ポテンシャルを高めると考えられる因子群、すなわち癌抑制遺伝子やアポトーシス誘導遺伝子の発現低下、抗アポトーシス活性遺伝子や血管新生遺伝子の発現増大、上皮間葉転換が誘導されているか、免疫二重染色で解析する。

(3) 慢性肝障害患者における低酸素マーカーの確立

容易に評価できる肝低酸素マーカーが確立できれば、患者の発癌ポテンシャルを知ることによって肝癌発症を早期に発見できる可能性が高い。末梢血単核球の遺伝子発現の解析は、侵襲を伴わずに安全に体内病態のレベルを推定することに有用である。患者末梢血単核球における低酸素誘導遺伝子の発現を評価し、肝線維化の進行度と相関するか解析する。

## 3. 研究の方法

(1) ラット慢性肝障害モデルの進行過程における類洞血流の変化と、低酸素による肝線維化増悪作用の解析

SDラットに0.03%チオアセトアミドを経口投与すると、12週後には偽小葉を有する肝硬変が完成する。線維化の乏しい6週、進行過程の9週および12週の時点で、蛍光標識したTRITC-デキストランを静注し、肝切片

を蛍光顕微鏡で観察して類洞血流の状況を評価する。私たちはこの方法で、ラット急性肝炎モデルにおける類洞の血流状態と低酸素状態の相関を解明した。正常肝では蛍光デキストランは類洞内に均一に分布したが、急性肝炎では小葉の zone2 で類洞が破綻し血流遮断が生じ、その結果として中心静脈周囲 (zone3) の血流が低下した状態であることが描出された。この時、低酸素マーカーであるピモニダゾールの免疫染色により、zone3 が低酸素状態であることが証明された。この手法を慢性肝障害モデルに用いて、線維化が乏しい早期の段階から類洞血流が障害され、低酸素状態が出現しているか評価する。酸化ストレスの存在を示すヒドロキシノネナル (HNE) やニトロチロシン (3NT) の二重染色を行い、低酸素領域では酸化ストレスが亢進しているか評価する。

#### (2) 慢性肝障害患者の末梢血単核球における低酸素マーカーの確立

末梢血単核球はさまざまな生体内ストレスを感知して、これに対応する遺伝子発現を誘導するため、内臓疾患の活動性のマーカーとなることが知られている。肝は心拍出量の約 1/3 が灌流するため、肝の低酸素状態に暴露された単核球は低酸素レベルに応じて各種応答遺伝子群を発現すると推測される。当科を受診している慢性肝炎や肝硬変患者の通常診療に必要な採血の際に、末梢血 7ml の採取を追加する。ただちにフィコール遠心分離法を用いて単核球を分離し、mRNA を抽出して保存する。さまざまな線維化の状態にある患者標本 100 例、また健常対象者標本 20 例を目標とする。患者血液を用いるため、この研究に関しては九州大学臨床研究倫理審査委員会に提出し、討議の上その承認を得た。また、個々の患者、健常ボランティアには十分なインフォームドコンセントを得た上で血液採取の協力を依頼する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット慢性肝障害モデルの進行過程における類洞血流の変化と、低酸素による肝線維化増悪作用の解析

低酸素による肝炎の進行・増悪と肝細胞癌発癌メカニズムの解析のために、慢性肝障害動物モデルにおける検討を行った。Wistar 系雄性ラット 8 週齢にチオアセトアミド 0.03% 含有水を投与し、肝硬変に至る慢性肝障害動物モデルを作成した。投与開始後 6 週間 (T6 群) および 12 週間 (T12 群) の時点で以下の実験をおこなった。肝微小循環および低酸素状態を組織学的に評価するために、肝臓摘出前に TRITC デキストランとピモニダゾールを投与した。T12 群の線維化は新犬山分類 F4 (肝硬変) であり、ピモニダゾール染色では偽小葉内の肝実質が慢性に低酸素となっていることが示された。微小循環を示す TRITC デキストランは、偽小葉内の類洞のみ

ならず線維性隔壁にも分布していた。T6 群では肝実質がまだらに低酸素となっており新犬山分類 F1~F2 の線維化を認めた。低酸素領域の TRITC デキストラン分布は低下しており、線維化が乏しい早期の段階から類洞血流が障害されていることが判明した。

肝線維化の中心的役割を担う肝星細胞は、その大半が活性化された状態として線維性架橋に存在していた。近年、hedgehog シグナル系が肝星細胞の活性化制御に大きく関与していることが報告された。星細胞の静止状態の維持に必要な Indian hedgehog は、非活性化星細胞に恒常的に発現しているのに対し、活性化星細胞では発現が認められないか高度に低下していた。一方、Sonic hedgehog は対照群ではほとんど発現を認めないのに対し、チオアセトアミド投与群では一部の門脈域に陽性細胞を認め、CK19 および OV6 と共発現していることから、肝前駆細胞に発現していると考えられた。

##### (2) 慢性肝障害患者の末梢血単核球における低酸素マーカーの確立

慢性肝障害患者の末梢単核球を用いた低酸素マーカーの確立のために、次のように患者標本の収集を行った。慢性肝疾患症例 48 例 (男性 28 例、女性 20 例、平均年齢  $63.9 \pm 11.7$  歳) で、背景疾患は HCV25 例 HBV11 例 NAFLD5 例その他 7 例であった。また、慢性肝炎は 24 例、肝硬変は 24 例であった。慢性肝疾患患者群の血液生化学所見は T.Bil:  $0.83 \pm 0.05$ mg/dl、ALT:  $40.48 \pm 41.4$ IU/l、LDH:  $210.31 \pm 44.04$ IU/l、Alb:  $3.83 \pm 0.61$ g/dl、血小板数:  $14.89 \pm 7.47 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、FIB4 index:  $4.78 \pm 4.36$  であった。健常群は 12 例 (男性 7 例、女性 5 例) で平均年齢  $40.3 \pm 11.1$  歳であった。慢性肝疾患患者群の Alb、血小板数、FIB4 index は健常群と比較すると有意差を認めた (いずれも  $P < 0.01$ )。また、慢性肝炎患者群の血液生化学検査は T.Bil:  $0.79 \pm 0.37$ mg/dl、ALT:  $34.76 \pm 38.19$ IU/l、LDH:  $200.67 \pm 45.39$ IU/l、Alb:  $4.19 \pm 0.55$ g/dl、血小板数:  $17.13 \pm 5.1 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、FIB4 index:  $2.53 \pm 1.56$  であり、肝硬変群患者群の血液生化学検査は T.Bil:  $0.91 \pm 0.64$ mg/dl、ALT:  $44.48 \pm 45.31$ IU/l、LDH:  $224.35 \pm 42.15$ IU/l、Alb:  $3.59 \pm 0.53$ g/dl、血小板数:  $10.22 \pm 3.83 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、FIB4 index:  $6.85 \pm 5.06$  であった。慢性肝炎患者群と肝硬変患者群では LDH ( $P < 0.05$ )、Alb ( $P < 0.01$ )、血小板数 ( $P < 0.05$ )、FIB4 index ( $P < 0.01$ ) で有意差を認めた。

慢性肝疾患患者および健常者の末梢血より比重遠心法によって単核球を分離し、mRNA を抽出し、低酸素ストレス応答遺伝子の発現を RT-PCR で評価した。低酸素誘導遺伝子として HIF1、HIF2 を、炎症マーカーとして IL-6、TNF、TGF、MCP1 を、酸化ストレスマーカーとして SOD、catalase、GPx (glutathione peroxidase) を、血管新生/血

管拡張マーカーとして VEGFA、VEGFR2、Adrenomedullin、RAGE (receptor for AGEs)、Tie2、HO-1 を測定した。

健常群における発現レベルを 1 と規定し、慢性肝疾患群と比較した。低酸素誘導遺伝子は HIF1 :1.1±4.7 (P<0.05)、HIF2 :1.02±0.56 (P>0.05)であった。炎症マーカーは IL-6:1.95±3.51 (P<0.05)、TNF :1.27±1.05 (P>0.05)、MCP-1:1.76±2.78 (P>0.05)、TGF :1.25±0.41 (P<0.05)であった。酸化ストレスマーカーは SOD:1.72±1.18 (P<0.05)、catalase:1.25±2.3 (P>0.05)、GPx:2.26±8.12 (P<0.01)であった。血管新生/血管拡張マーカーは VEGFA:2.89±2.04 (P<0.01)、VEGFR2:5.59±13.5 (P>0.05)、Adrenomedullin:2.96±2.23 (P<0.01)、RAGE:3.98±4.08 (P<0.01)、Tie2:3.06±4.69 (P<0.01)、HO-1:1.72±1.15 (P<0.05) と上昇していた。

さらに Adrenomedullin の発現を慢性肝炎患者群と肝硬変患者群で比較すると、それぞれ 2.06±1.12、3.3±1.3 であり、有意に肝硬変患者群で上昇していた (P<0.01)。Adrenomedullin について解析すると、血清 LDH と r=0.46、P<0.01 と正の相関、血清 Alb と r=0.48、P<0.01 と負の相関を認めた。また、末梢血単核球における IL6 と r=0.36、P<0.01、SOD と r=0.6、P<0.01 正の相関を認めた。

### (3) 低酸素と発癌ポテンシャルとの相関の解析

チオアセトアミドによる慢性肝障害動物モデルの肝組織を用いて、肝低酸素領域に一致して、発癌ポテンシャルを高めると考えられる因子として p21、Bcl-2 の発現を免疫組織染色法を用いて解析した。p21 は DNA 損傷があると、サイクリン依存性キナーゼを阻害し、細胞増殖を G1 で停止させる細胞周期阻害因子であり、癌抑制遺伝子 p53 の転写標的である。Bcl-2 はアポトーシス抑制遺伝子で、p53/p21 が誘導する細胞死を強力に抑制する遺伝子である。しかし抗 p21 抗体、抗 Bcl-2 抗体を用いた免疫組織染色は background が高く、正確な評価は困難であった。このため、(2) で用いた慢性肝障害患者の末梢血単核球における mRNA 発現を解析することとした。健常群における p21 の発現レベルを 1 と規定すると、慢性肝疾患患者群 2.28±1.06 (P<0.01) であり、さらに慢性肝炎患者群 :1.89±0.49、肝硬変群 :2.59±1.23 (P<0.05) であり肝線維化とともに有意に上昇していた。また、Adrenomedullin の発現と p21 の発現は r=0.45 (P<0.01) と正の相関を認めた。Bcl-2 の発現に関しては、慢性肝疾患患者群 :0.8±0.30 (慢性肝炎患者群 :0.8±0.32、肝硬変患者群 :0.81±0.3) であり健常者と有意差を認めなかった。

### (4) 研究成果のまとめ

肝硬変に至る慢性肝障害動物における検討では、薬物投与開始後早期から肝微小循環障害が出現し、同時に肝実質が低酸素に陥っていることが確認された。このとき、肝線維化の中心的役割を担う肝星細胞の活性化が認められ、活性化抑制の働きをもつ Indian hedgehog の発現低下が星細胞の活性化を誘導していることが示唆された。

また、慢性肝疾患患者の末梢血単核球を用いた解析によって、慢性肝疾患患者では健常者と比較して、低酸素誘導遺伝子である HIF1 及び HO-1、酸化ストレス応答遺伝子である SOD 及び GPx、血管新生制御遺伝子である VEGFA、Adrenomedullin、RAGE、Tie2 の有意な増大がみられ、これらが肝内低酸素状態の指標となりえることが示唆された。

さらに、DNA 損傷に反応する p21 の発現は、Adrenomedullin と相関しつつ肝線維化とともに増大しており、慢性肝疾患では肝内低酸素状態の進行とともに発癌ポテンシャルが増大することが示された。

これらの結果から、慢性肝疾患では肝線維化とともに肝内が低酸素状態に陥ること、同時に発癌ポテンシャルが増大することが示され、また患者末梢血単核球の評価により発癌危険群が同定できる可能性が示唆された。

### 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1件)

Intrahepatic microcirculatory disorder, parenchymal hypoxia and NOX4 upregulation result in zonal differences in hepatocyte apoptosis following lipopolysaccharide- and D-galactosamine-induced acute liver failure in rats.

Tanaka M, Tanaka K, Masaki Y, Miyazaki M, Kato M, Kotoh K, Enjoji M, Nakamuta M, Takayanagi R.

Int J Mol Med. 2014 Feb;33(2):254-62. doi: 10.3892/ijmm.2013.1573. Epub 2013 Dec 3.

[学会発表](計4件)

桑野哲史、田中紘介、山崎晃裕、大橋朋子、加藤正樹、古藤和浩

末梢血単核球を用いた慢性疾患患者における低酸素ストレスと炎症マーカー、血管新生関連因子の評価

第52回日本肝臓学会総会

2016年5月19日、千葉

チオアセトアミド投与ラット肝硬変モデルにおける肝星細胞活性化とヘッジホッグシグナルの関連性についての組織学的検討

田中正剛、加藤正樹、田中紘介、宮崎将之、古藤和浩

第50回日本肝臓学会総会

2014年5月29日、東京

末梢血単核球を用いた、慢性肝疾患症例の低酸素ストレスレベルの評価の可能性  
田中紘介、田中正剛、真崎由子、山崎晃裕、原田林、梅野成大、加藤 正樹、遠城寺宗近、中牟田誠、古藤 和浩、高柳 涼一  
第 50 回日本肝臓学会総会、  
2014 年 5 月 29 日、東京

GLP-1投与によるNAFLD肝の改善メカニズムの解明 ~ミトコンドリア制御因子やエネルギー消費に関する追加検討  
田中紘介、宮崎将之、田中紘介、加藤正樹、古藤和浩  
第 49 回日本肝臓学会総会、  
2013 年 6 月 6 日、東京

〔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

加藤 正樹 (Kato, Masaki)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：60444808

### (2) 研究分担者

古藤 和浩 (Kazuhiro, Kotoh)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：80289579