

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461019

研究課題名(和文) ポスト肝炎ウイルスにおけるミトコンドリア障害と過剰鉄が誘導する肝発癌機構の解析

研究課題名(英文) The mechanism of mitochondrial injury and iron overload induced hepatocarcinogenesis in the post hepatic virus.

研究代表者

是永 匡紹 (korenaga, Masaaki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：70420536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝モデルではミトコンドリア複合体IVの一部であるCOX72aの発現低下を認め、メチレーションも有意に亢進していた。これらの機能低下が脂肪肝・酸化ストレス上昇介して脂肪肝における鉄過剰状態を形成する可能性が考えられた。

一方で、脂肪肝発癌モデルであるSTMEマウスにおいて3週間経口鉄キレート剤を内服させたところ、肝細胞障害・線維化進展を抑制したものの、12週間継続投与試験では、発がん抑制効果は認めず、鉄キレート剤単独での肝発がん抑制効果は不十分であることが明らかになり、多剤併用が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The inhibition of COX7a2 in mitochondrial complex IV might induce hepatic oxidative stress, fat accumulation, and iron metabolic disorder. Deferasirox improved hepatic ballooning reduced liver fibrosis in STAM mice. However, long term treatment of Deferasirox could not inhibit the development of liver tumors.

研究分野：肝臓病学

キーワード：酸化ストレス ミトコンドリア障害 脂肪肝 鉄過剰

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は本邦の悪性新生物による死因の第4位を占める疾患であり、その大半はC型肝炎ウイルス (HCV) (約70%)やB型肝炎ウイルス (HBV) (約10%)感染に起因する。近年、治療薬開発研究の進歩に伴い副作用が少ない抗ウイルス剤内服により、HCVは高率に排除可能となったが、HCVが排除されても、高齢者では肝発癌が散見されることや非肝炎ウイルス感染者、また肝硬変に進行していない症例からの肝発癌も増加も確認され、経口薬で高齢者の肝炎ウイルスがcontrol可能になった後の肝細胞癌抑制効果は今後も重要な検討課題である。疫学的コホートからは、発癌者の多くが高齢であり、肥満、糖尿病といった代謝異常を合併している)ことが明らかになり、また糖尿病の死因としては癌死が第1位であり、臓器別では肝臓が最も多いとされる。我々のこれまでの検討では、加齢ともに障害を受けやすいミトコンドリア呼吸鎖複合体I障害 (J Biol Chem 2005, Gastroenterology 2005)と鉄過剰から誘導される酸化ストレス亢進は、肝脂肪化や耐糖能を増悪させ肝発癌に到る (Gastroenterology 2006)。一方で、ミトコンドリア由来の酸化ストレスは肝内鉄を制御する hepcidin 発現を低下させ、肝内鉄過剰を形成させる (Gastroenterology 2008)。これらの事より、ミトコンドリア障害を基盤とした酸化ストレス亢進による鉄過剰状態は、生活習慣病である脂肪化・耐糖能異常を誘導させ、更なる酸化ストレスの集積が長期間加わる事で、肝発癌を促進することが推測される。実際、脂肪肝では、脂肪性肝炎の発症に酸化ストレス関与し、病態の進行とともに貯蔵鉄をしめすフェリチンの亢進が確認されているが、肝炎ウイルス排除後や脂肪肝を背景とした肝発癌の原因にミトコンドリア障害や鉄過剰が関与するかはこれまで全く明らかにされていない。ポストウイルス時代の肝発癌機構を明らかにし、その治療戦略の確立させることは急務である。

2. 研究の目的

鉄による酸化ストレス上昇と発癌リスクの上昇に伴うミトコンドリア機能異常や biogenesis の解析することで、肝発癌機構にともなう関連分子を解析する

3. 研究の方法

I: 鉄過剰食に対してミトコンドリア障害と脂肪化が誘導される C57BL/6N と表現型を認めない C57BL/6J マウスからミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア機能と酸化ストレスに関与する転写因子を解析することで、鉄代謝異常の原因分子を解明する。

II: 発癌抑制効果とミトコンドリア機能改善効果を有する BCAA や鉄キレート剤を投与することによりミトコンドリア内で変動する分子を同定する。

⇒ 上記より肝病態進行マーカーを発見し臨床研究への橋渡しとするのみに留まらず、異常ミトコンドリアを排除可能な安価な創薬シーズを探索に繋げる。

4. 研究成果

I. C57BL/6N (N) と C57BL/6J (J) を用いて以下の検討を行った。N (n=7) と J (n=8) に生後2か月から AIN93 (Ferric citrate 210mg 含有) と CE-2 を6か月投与後、肝脾を摘出し組織学的検討、肝脾内鉄濃度、中性脂肪、血清より肝機能、血糖値、hepcidin 値や酸化ストレスに対する抗酸化能として BAP/dROM を測定し解析した。また各群でマイクロアレイ解析を行い、異常発現に関しては real time PCR, 一部は western blot にて確認した

I-① AIM 食において、N は J に比べて肝体重比、鉄濃度の上昇と hepcidin 低下を認め、肝脂肪化の増強と ALT 上昇、脾内鉄濃度、BAP/dROM 比の低下を認め、肥満傾向を示す N には鉄代謝異常が存在した

I-② マイクロアレイ解析で、N は J に比べてミトコンドリアによる脂肪酸分解抑制、及び呼吸鎖複合体 IV 機能異常が抽出され、western blot では CPT1 や複合体 IV subunit である Cox7a2 の発現低下を認め、複合体 IV 酵素活性低下も確認され、ミトコンドリア呼吸鎖複合体機能低下⇒酸化ストレス上昇⇒hepcidin 発現低下による鉄過剰亢進より肝脂肪化が亢進することが推察された。(図1, 2)

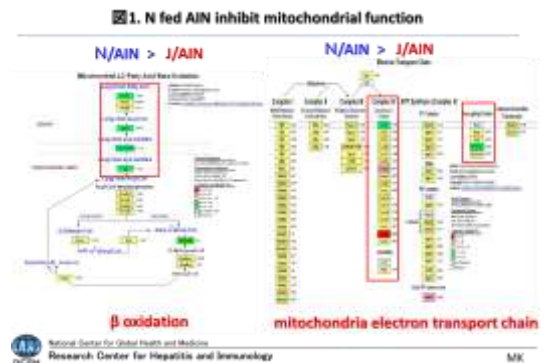
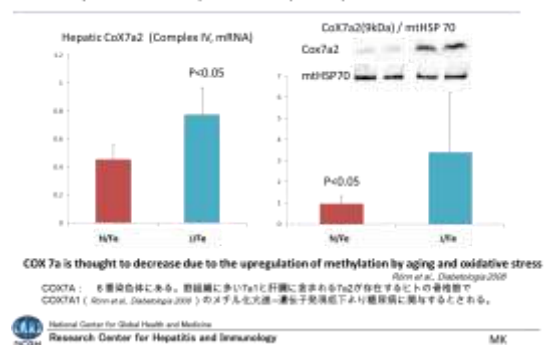


図2 The expression of the complex IV subunit (COX 7a2) was altered in N mice fed AIN-93M



COX 7a is thought to decrease due to the upregulation of methylation by aging and oxidative stress

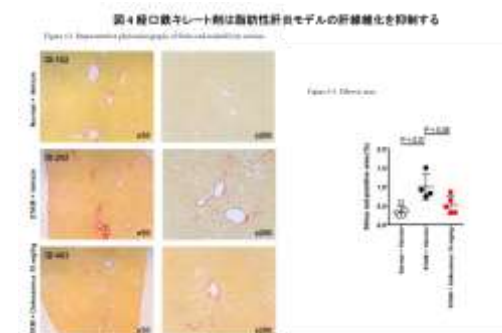
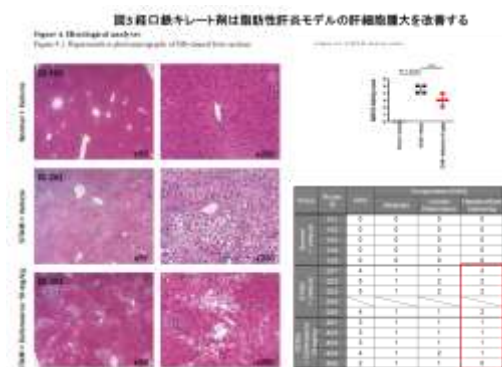
I-③ 筋肉に存在する Cox7a1 はメチレーションの亢進によりその機能低下から糖の取り込み低下及び糖尿病発症に影響するとされるため、Cox7a2 のメチレーションは質量解析法で行ったところ、N は J に比べてメチレー

ションを亢進しており、その影響は鉄置換食で顕著となった。

II. 肝発がんモデルマウスにBCAAや鉄キレート剤を投与し、発癌抑制効果とミトコンドリア機能改善効果について解析した

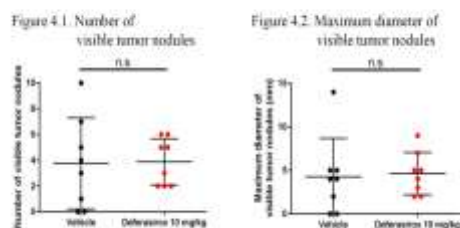
II-① BCAAはミトコンドリア呼吸鎖複合体I機能低下を改善、抗酸化能を上昇させることにより、鉄代謝異常を改善させることがマウスから明らかになり、臨床検体でも同様な変化を確認し、BCAAの肝発がん抑制効果の一機序を報告した(Liver Int. 2015)。

II-② 鉄キレート剤(Deferasirox:DSX)を6週齢のSTAMiceに3週間経口投与したところ肝細胞風船化像減少と肝線維化や酸化ストレス抑制が確認された(図)。



一方、血糖値・肝脂肪化には全く影響を与えなかった。12週間経口投与を延長した検討では、肝発がん抑制効果を認められず、DSXにより脂肪性肝炎発症を遅延させても、発がん抑制効果を得るためには、機序の異なる薬剤の併用が必要であると考えられた。(図5)

図5 鉄キレート剤を脂肪性肝炎発症時期に投与しても発癌効果は得られなかった



## 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10件)

1. Ueyama M, Nishida N, Korenaga M\*, Korenaga K, Kumagai E, Yanai H, Adachi H, Katsuyama H, Moriyama S, Hamasaki H, Sako A, Sugiyama M, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Kawaguchi T, Torimura T, Hyogo H, Aikata H, Ito K, Sumida Y, Kanazawa A, Watada H, Okamoto K, Honda K, Kon K, Kanto T, Mizokami M, Watanabe S. (\* corresponding author) The impact of PNPLA3 and JAZF1 on hepatocellular carcinoma in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes mellitus. J Gastroenterol. 51(4):370-9. 2016
2. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kaneoka Y, Maeda A, Korenaga M, Mizokami M, Narimatsu H. Serum WFA+ -M2BP levels as a prognostic factor in patients with early hepatocellular carcinoma undergoing curative resection. Liver Int. 36(2):293-301. 2016
3. Sasaki R, Yamasaki K, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Bekki S, Kugiyama Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H. PLoS One. 10(6):e0129053. 2016.
4. Mizokami M, Yokosuka O, Takehara T, Sakamoto N, Korenaga M, Mochizuki H, Nakane K, Enomoto H, Ikeda F, Yanase M, Toyoda H, Genda T, Umemura T, Yatsuhashi H, Ide T, Toda N, Nirei K, Ueno Y, Nishigaki Y, Betular J, Gao B, Ishizaki A, Omote M, Mo H, Garrison K, Pang PS, Knox SJ, Symonds WT, McHutchison JG, Izumi N, Omata M. Ledipasvir and sofosbuvir fixed-dose combination with and without ribavirin for 12 weeks in treatment-naive and previously treated Japanese patients with genotype 1 hepatitis C: an open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Infect Dis. 15(6):645-53. 2015.
5. Fujiyoshi M, Kuno A, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, Korenaga M, Mizokami M, Narimatsu H, Taketomi A; Hepatitis Glyco-biomarker Study Group. Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 50(11):1134-44. 2015.
6. Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Association between Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic

fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 50(7):776-84. 2015.

7. Korenaga M, Nishina S, Korenaga K, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Sasaki Y, Shimonaka Y, Hino K. ched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice. *Liver Int.* 35(4):1303-14. 2015.

8. Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M\*, Murata K, Kanto T, Masaki N, Mizokami M. (\* corresponding author) High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70. *J Virol Methods.* 207:169-77. 2014.

9. Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsushashi H. ated serum levels of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology.* ;60(5):1563-70. 2014

10. Korenaga K, Korenaga M\*, Teramoto F, Suzuki T, Nishina S, Sasaki K, Nakashima Y, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Moriya T, Hino K. (\* corresponding author) Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* ;43(12):1284-94. 2013

[学会発表] (計 10 件)

1. 是永匡紹, 考藤達哉、溝上雅史 Ledipasvir/Sofosbuvir 投与は HCV 発癌リスク因子を抑制する. 第 51 回 日本肝臓学会総会 東京 2015.0521-22.

2. 上山三鈴, 是永匡紹, 溝上雅史 病態関連 SNPs と内因性インスリン分泌能を指標とした 2 型糖尿病合併非 B 非 C 肝臓の囲い込み 第 51 回 日本肝臓学会総会 東京 2015.0521-22.

3. Misuzu Ueyama, Masaaki Korenaga, Nao Nishida, Keiko Korenaga, Erina Kumagai, Masaya Sugiyama, Yoshihiko Aoki, Masatoshi Imamura, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Takumi Kawaguchi, Takuji Torimura, Hideyuki Hyogo, Hiroshi Aikata, Kiyooki Ito, Yoshio Sumida, Tatsuya Kanto, Sumio Watanabe, Masashi Mizokami PNPLA3 and JAZF1 variants influence hepatocellular carcinoma development in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes patients. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2015. San Francisco. 2015. 11. 13-17

4. Takeshi Watabe, Masaaki Korenaga, Masaya Sugiyama, Erina Kumagai, Misuzu Ueyama, Yoshihiko Aoki, Yoko Yamagiwa, Keiko Korenaga, Masatoshi Imamura, Kazumoto Murata, Naohiko

Masaki, Tatsuya Kanto, Masashi Mizokami Distribution of pre-existing NS5A/NS5B resistance associated variants in genotype 1b patients with hepatitis C virus and response to direct acting antivirals. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2015. San Francisco. 2015. 11.13-17

5. 是永匡紹, 西田奈央, 是永圭子, 竹田努, 青木孝彦, 由雄祥代, 山極洋子, 杉山真也, 今村雅俊, 柳内秀勝, 山田慎吾, 川口巧, 佐田通夫, 村田一素, 考藤達哉, 正木尚彦, 溝上雅史 糖尿病関連 SNPs と PNPLA3 を用いた糖尿病合併肝臓病態促進症例の囲い込み. 第 50 回 日本肝臓学会総会 東京 2014 年 5 月 29 日-30 日

6. 是永匡紹, 是永圭子, 杉山真也, 久野敦, 成松久, 溝上雅史. 新規肝線維化マーカーとしての WFA+-M2BP の有効性と肝硬度測定との比較 第 50 回 日本肝臓学会総会 東京 2014 年 5 月 29 日-30 日.

7. 是永匡紹, 杉山真也, 辻美保子, 近藤美幸, 由雄祥代, 是永圭子, 村田一素, 考藤達哉, 西田奈央, 正木尚彦, 溝上雅史. 肝内脂肪蓄積に關与する脾臓内鉄濃度と肝ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 障害 第 50 回 日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 29 日-30 日.

8. Korenaga M, Sugiyama M, Aoki Y, Korenaga K, Yamagiwa Y, Imamura M, Nishida N, Murata K, Kanto T, Masaki N, Mizokami M. Reducing Polymorphisms Consisting of (TA)<sub>n</sub> Dinucleotide Repeat Near IL28B Gene Interact with the Deviation of IL28B SNPs and Affect the Effectiveness of PegIFN/RBV, but not PegIFN/RBV/TVR.

American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2014. Boston. 2014. 11.07-11

9. Korenaga M, Tsuji M, Kondo M, Kumagai E, Ueyama M, Korenaga K, Murata K, Kanto T, Masaki N, Mizokami M. COX 7 alpha 2 Inhibition in Mitochondrial Complex IV Induces Hepatic Oxidative Stress and Iron Metabolic Disorder in C57BL/6N Mouse. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2014. Boston. 2014. 11.07-11

10. Korenaga M, Ueyama M, Nishida N, Korenaga K, Kawaguchi T, Hyogo H, Aikata H, Kumagai E, Aoki Y, Sugiyama M, Imamura M, Murata K, Kanto T, Masaki N, Mizokami M. Association between Type 2 Diabetes Genetic Susceptibility Loci and Hepatocellular Carcinoma in Patients with Type 2 Diabetes as Determined by Fibroscan.

American Association for the study of  
Liver Diseases The Liver Meeting 2014.  
Boston. 2014.11.07-11

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

是永 匡紹 (MASAAKI KORENAGA)  
所属研究機関名： 国立研究開発法人  
国立国際医療研究センター  
所属部局名： その他部局等  
職名： その他  
研究者番号： 70420536

### (2) 研究分担者

村田 一素 (KAZUMOTO MURATA)  
所属研究機関名： 国立研究開発法人  
国立国際医療研究センター  
所属部局名： その他部局等  
職名： その他  
研究者番号： 40345971