

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461808

研究課題名(和文) NAFLD/NASHを背景とする肝細胞癌多段階発癌と分子標的薬介入による効果

研究課題名(英文) The effect of sorafenib on the incidence of chemically induced hepatocellular carcinoma with non-alcoholic fatty liver or steatohepatitis.

研究代表者

竹原 康雄 (Takehara, Yasuo)

浜松医科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70188217

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)：非アルコール性脂肪肝(NAFLD)/非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を母地とする肝障害において、DENによる肝細胞癌の化学発癌の発生頻度をSorafenibにて阻止できるかをNAFLDの動物モデルであるOLETFラットと対照群LETOラットとで比較して画像的、病理学的に検証した。その結果、Sorafenibを投与した群には、NAFLDの有無に関わらず、肝内の線維化が軽減され、肝細胞癌の発生も阻止されたが、NAFLD群では生存率を改善することはできなかった。NAFLDでは肝障害や糖尿病による易感染性によりsorafenibの副作用に耐えられず、死亡率を上昇させたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to test if sorafenib can decrease the incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) induced by diethyl nitrosoamine (DEN) with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) or non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) was used as a model of NAFLD/NASH. As a result, the incidence of HCC was decreased in sorafenib-treated groups irrespective of the presence of fatty liver. However, less number of animals survived after treatment of sorafenib as compared to sorafenib non-treated group. Although sorafenib can prevent occurrence of HCC, some of the NAFLD/NASH animals could not survive sorafenib related side effects probably due to their susceptibility to infection.

研究分野：放射線医学

キーワード：NASH NAFLD HCC MRI sorafenib 化学発癌

1. 研究開始当初の背景

欧米では、肥満に起因する肝障害が増加し、BMI 高値の男性では肝細胞癌のリスクが約 4.5 倍に上昇することが米国の疫学調査で示されている (Gastroenterology, 2007 Jun;132(7):2557-76.)。本邦においても BMI と肝障害に正相関があることが疫学的研究から証明されている (NASH 診療ハンドブック、中外医学社、2007)。我が国でも、C 型慢性肝炎患者や非代償性肝硬変疾患の肥満が HCV, HBV 感染と並んで肝発癌のリスクを有意に高めることが明らかとなっている (Hepatology Res. 2006 Jul;35(3):204-14.)。RFA 後の再発について内臓脂肪肥満の有無で比較した報告があるが、内臓脂肪肥満群では有意に HCC の再発が多かったとされている (Gut. 2009 Jun;58(6):839-44.)。ところで、肥満患者では高頻度に脂肪肝を伴っていることが知られている。脂肪肝の中でも非アルコール性脂肪肝障害を NAFLD ; nonalcoholic fatty liver disease とよばれる肝障害が含まれている。NAFLD の一部には肝硬変に進展するものがあり、それが NASH ; nonalcoholic steatohepatitis とよばれている。この脂肪肝はウイルス性肝炎においても肝障害を増悪させ肝癌発生のリスクとなりうること (Cancer 2003 Jun 15;97(12):3036-43.)、NAFLD における脂肪肝の程度は肥満の有無にかかわらず内臓脂肪の蓄積とインスリン抵抗性によって規定されることが報告されている (J Gastroenterol. 2006 May;41(5):462-9.)。NAFLD のどの程度が NASH へ進行するのか、また NASH のどの程度に HCC が発生するのかは明らかとなっていない。また、高インスリン血症自体が直接 HCC 発癌に関与している可能性も示されているが、肝癌の増大速度が高インスリン血症患者において有意に高いことは報告されている (Gut. 2002 Jul;51(1):100-4.)。NAFLD/NASH は現在でも肝生検による組織診断が必須とされている (治療 89 巻 4 号 Page1586-1591(2007.04))。NAFLD 全員に肝生検を行うことは不可能である。非侵襲的な診断法が求められており、それには画像診断が最も期待される場所である。先進国では今後、ウイルス性肝炎の感染予防と感染後のウイルスの駆除が進み、ウイルス性肝炎を母地とする肝細胞癌は減少するのに対し、NAFLD/NASH に起因する肝細胞癌が増加することが懸念されている。この傾向は、我々が実地臨床でも最近経験している通りで、TACE の患者の高齢化と実数の減少を見る一方で、ウイルス陰性で非アルコール性の肝細胞癌患者が増加しており、それらの患者では往々にして脂肪肝を伴っている。このトレンドが今回の我々の研究の動機となっている。

2. 研究の目的

本プロジェクトの目的は NAFLD/NASH による HCC の画像診断学的、組織学的特徴を精

査すると同時に、分子標的薬 (sorafenib を使用する予定) による介入が肝の線維化と癌化を抑制することが可能かどうかを確認することである。NAFLD ; non-alcoholic fatty liver disease から NASH ; non-alcoholic steatohepatitis、次いで肝細胞癌 (HCC) に至る発癌プロセスの画像診断学的解明を行う。具体的には、NAFLD (OLETF ラット) とそのコントロール (LETO ラット) が化学発癌のプロモーションの有無で、どの程度の頻度でまたどのようなプロセスで NASH に移行し、更に、HCC を生ずるのかを追究する。

3. 研究の方法

NAFLD/NASH モデル

OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットは肥満を伴う糖尿病と糖尿病性合併症を発症するモデル動物で、そのコントロールである動物が LETO (Otsuka Long-Evans Tokushima) ラットである。OLETF ラットは過食により、体重が顕著に増加し、肥満を呈し、雄では生後 20 週齢頃より、OGTT (Oral Glucose Tolerance Test ; 経口ブドウ糖負荷試験) により糖尿病と判定される個体が増加する。LETO ラットに比較して非絶食時の血糖値は生後 18 週齢、血漿トリグリセライド (TG) 値は生後 6 週齢、血漿コレステロール値は生後 21 週齢から有意に上昇する。特に TG 値は顕著に増加し、生後 40 週齢でコントロールの LETO ラットに比べて 5 倍になる (Diabetes. 1992 Nov;41(11):1422-8.)。今回使用する NAFLD/NASH モデルはこの OLETF ラットであり、コントロールは LETO ラットである。

NAFLD~NASH モデルラット (OLETF) とコントロールラット (LETO) に DEN による肝細胞癌の化学発癌を誘導し、これに対し、sorafenib の早期投与と、遅延投与の効果を Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 画像と病理標本から確認する。動物の撮影はイソフルランの吸入による全身麻酔下で行う。画像検査には Signa HDx 3T に wrist-coil を併用し、尾静脈を確保し、Gd-EOB-DTPA (バイエル薬品) の 0.1mmol/kg の bolus 注入後にダイナミックスタディを脂肪抑制 3DFSPGR にて全肝のスキャンを繰り返すことにより施行。

ENDPOINT において採血後 sacrifice して肝臓を摘出し、ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、連続切片を作製し H&E 染色と Azan 染色を、必要に応じて免疫組織化学染色を施す。

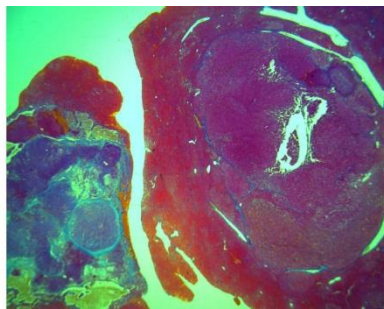
4. 研究成果

Sorafenib の介入の無い群における化学発癌

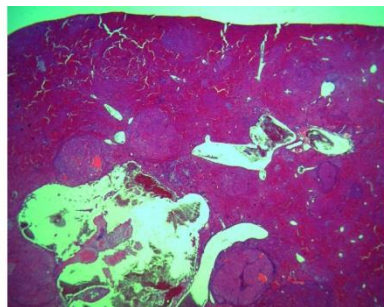
5 週齢の OLETF (10 匹) と LETO (10 匹) に 40 日間 diethylnitrosamine (DEN) を含有する給水で飼育し、化学的に肝線維化と HCC 発癌を惹起させた。対照群として DEN を投与しない OLETF (10 匹) に通常飼育を行った。飼育開始後 40 日目に Gd-EOB-DTPA による造影 MRI (造影前、造影動脈相、造影門脈相、肝細胞造影相) を施行し、この時点では肝細胞癌がどの

群にも発生していないことを確認。いずれの群においても観察期間中において体重 (g) は単調増加であり、40 日目の時点では、DEN を投与した OLETF で 282.1 ± 12.9 、LETO で 191.6 ± 21.0 、DEN を投与しない対照群の OLETF で 360.5 ± 31.9 と有意の差があった。その後飼育 110 日目に再び MRI 撮影を施行した。この時点では OLETF は 10 匹中 6 匹が生存していたのに対し LETO では 10 匹中 3 匹しか生存していなかった。興味深いことに NAFLD 群である OLETF において DEN に対する介入に LETO よりも有意に抵抗力を示したと言える。この時点で in-phase、out-of-phase image によって肝内の脂肪沈着の程度を評価し、Gd-EOB-DTPA による造影 MRI (DEN 開始 40 日目と同様) を施行した。肝実質の In phase / out of phase の比では、脂肪肝の程度に群間で差は生じているものの統計学的に有意差はなかった。撮影後 DEN 投与 OLETF と LETO 群から採血の後、肝臓を摘出し、連続切片を作成、HE 染色とアザン染色を施した標本を作成した。全血を 300rpm で遠心分離したところ、血漿に脂肪による白濁が認められた。全ての個体で肝内に 大小の HCC が確認されたが、両者にはその数や大きさにおいて有意な差を認めなかった。その結果 sorafenib による介入が無い場合、NASH/NAFLD モデルにおいても、control においても肝細胞癌が同様の頻度と大きさで誘導されることがわかった。

下図は LETO の肝臓 (Azan 染色弱拡大像)。粗大な肝細胞癌が誘導されている。



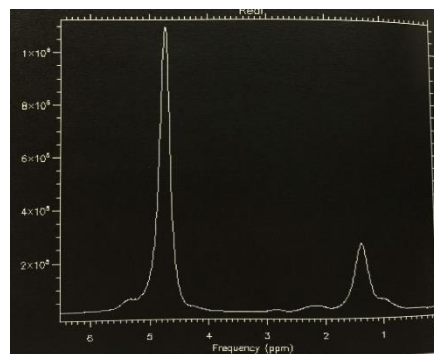
下図は肝細胞癌が多発した OLETF の肝臓 (Azan 染色弱拡大像)



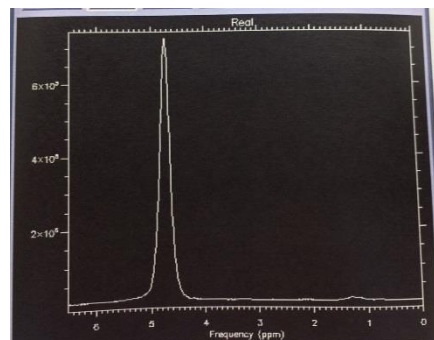
下図は OLETF ラットの肝臓の Gd-EOB-DTPA 肝細胞造影相。肝内に多数誘導された肝細胞癌が背景肝よりも信号増強の弱い円形多結節として描出されている。



なお 標本上 OLETF においては肝臓は概ね NAFLD の状態で、ある個体では、ごく軽度の NASH の状態と考えられた。この preliminary study の結果、生存率の点からは、OLETF ラット (NAFLD) が予期に反して DEN に対する抵抗性を示し、その原因として、当初計画の通常飼育下 5 ヶ月 (20 週) では NASH の形成が不十分なためではないかと考えられた。予期せぬ結果を踏まえ、本試験前にこの仮説を確認するべく、2014 年度は、2 回目の preliminary study を、追加した。2014 年 5 月 7 日に週齢 32 週の OLETF8 匹を対象群として週齢 21 週の LETO2 匹を使用し、PRESS 法による proton MRS を施行し、OLETF にて肝内に脂肪のピーク (1.4 ppm のピーク) を確認計測した。(下図 proton MR spectroscopy 参照)



LETO では肝内に脂肪のピークは検出されなかった。(下図参照)

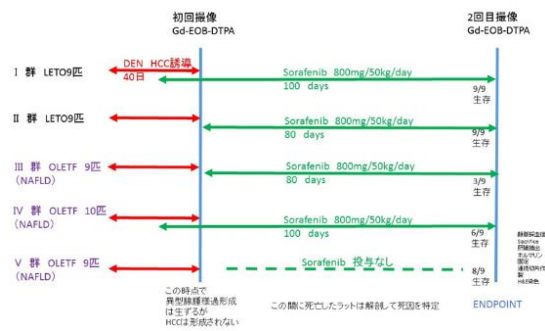


これらの動物のうち、OLETF5 匹に 2014 年 5 月 7 日から 2014 年 10 月 5 日まで DEN を投与して化学発癌を誘導し、OLETF3 匹と LETO2 匹を通常飼育とした。2014 年 10 月 5 日にこれらに対して Gd-EOB-DTPA による造影 MRI を撮像した。その結果 DEN を投与した OLETF 群で、大小の多発 HCC を肝内に同定した。DEN を投与しなかった群の病理標本では肝内に脂肪沈着と線維化を有するいわゆる NASH の状態と判定できた。また、PRESS 法による MRS のほうが脂肪肝の定量性に優れていること、通常飼育下 20 週では OLETF の NAFLD の進行は十分ではなく、病理学的に NASH を生ずるためには最低でも 32 週は通常飼育を要することがわかった。また、なんらかの介入治療を行わない限り、NAFLD/NASH でも control でも肝内に肝細胞癌が多数誘導されることがわかった

Sorafenib による介入治療

これまで 2 年間の知見を元に、2015 年度の本試験を計画した。NAFLD/NASH と control を DEN で化学発癌を誘導するのであるが、80 日間と 100 日間の 2 種類の期間で Sorafenib による薬理的介入治療を行うものである。

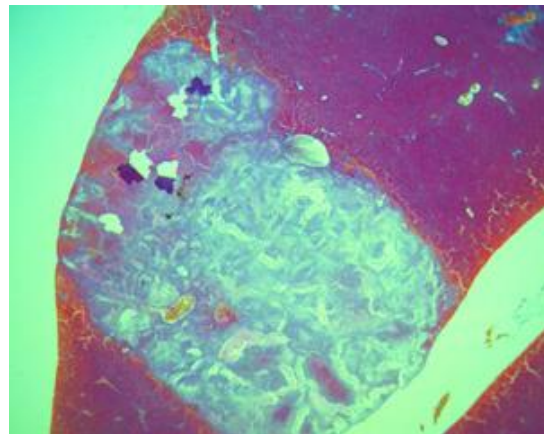
下図のダイアグラム参照



まず、NAFLD モデル作製に十分な飼育期間を充てるべく、2014 年 7 月 1 日に 4 週齢の OLETF31 匹と LETO20 匹を購入し、9 ヶ月間通常飼育した。実験のダイアグラムを figure1 に示す。2015 年 3 月 29 日 (週齢 40 週) に介入前の MR 撮影を施行した (当然ながら肝内病変を MR 上認めておらず、OLETF では肝内に脂肪沈着を認め、NAFLD の状態と考えられた)。飼育中に OLETF2 匹が死亡 (糖尿病による易感染での肺炎疑い)、LETO2 匹 (麻酔死の可能性が高い) が死亡した。体重はその時点で、OLETF で $652 \pm 56g$ 、LETO で $527 \pm 54g$ となっている。2015 年 4 月 9 日から DEN 投与を開始、群間での sorafenib 介入を最も早い群で 4 月 28 日から開始し preliminary study では 5 週齢の OLETF (10 匹) と LETO (10 匹) に 40 日間 100ppm の diethylnitrosamine (DEN) を含有する給水で飼育した。動物は DEN 投与開始後 20 日後と 40 日後に

sorafenib (800mg/50kg/day (p. o.)) の経口投与を開始した。動物は I から V の 5 群に分割、I 群は LETO 9 匹で 100 日間毎日 sorafenib を投与、II 群は LETO 9 匹で sorafenib80 日間投与、III 群は OLETF10 匹で sorafenib80 日間投与、IV 群は OLETF10 匹で sorafenib100 日間投与、V 群は OLETF9 匹で Sorafenib は投与しなかった。Sorafenib による薬理的介入前の MR 撮影では、腫瘍の発生は見られなかった。飼育終了までに、III 群 7 匹、IV 群 4 匹、V 群 1 匹が肝不全で死亡。I 群 9 匹、II 群 9 匹、III 群 3 匹、IV 群 6 匹、V 群 8 匹に Gd-EOB-DTPA による造影 MRI を施行し、撮影後、採血、屠殺し、肝臓を摘出、ホルマリン固定後、連続切片を作製し、H&E 染色と Azan 染色にて標本作製した。Sorafenib を投与した群には OLETF にも、LETO にも肝細胞癌は発生せず、sorafenib を投与しなかった V 群にのみ最大径 20mm までの肝細胞癌が誘導された。

下図は sorafenib 介入を行わなかった V 群の OLETF (NASH/NAFLD) の肝臓の標本 (Azan 染色) である。中央に粗大な肝細胞癌が誘導されている。

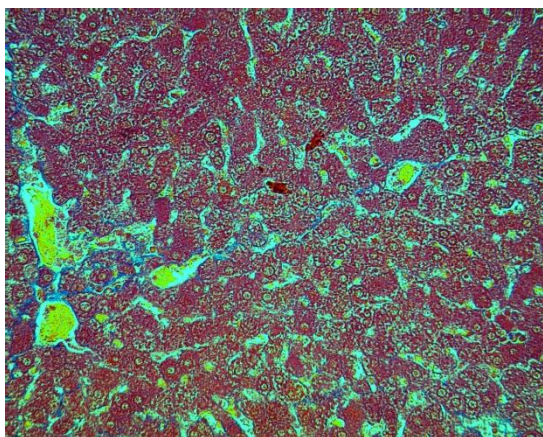


下図は OLETF (NASH/NAFLD) に Sorafenib100 日間の介入を行ったラットの Gd-EOB-DTPA による肝細胞造影相の冠状断像である。肝内には肝細胞癌の発生は見られていない。



Azan 染色による組織標本上、Sorafenib を投与した群では細胞間質の線維化が非投与群よりも少なく、逆に sorafenib を投与しなかった群では、細胞間質に線維増生がめだった。

下図は sorafenib による介入を行わなかった OLETF の肝臓の強拡大像 (Azan 染色)。脂肪滴を有する肝細胞と細胞間質に青色の線維成分が介在する NASH の状態である。



生存・死亡率への影響

死亡率は NAFLD 群 (OLETF) では sorafenib 投与群の生存率は 9/18 (50%)、これに対し、非投与群は 8/9 (89%) であった。LETO 群では sorafenib 投与群に死亡例はなかった。NAFLD では Sorafenib により肝細胞癌の誘導や線維化は防止できるが、死亡率は改善しない結果となった。肝障害や糖尿病による易感染性等の背景因子により sorafenib の副作用に耐えられず、死亡率を上昇させたものと考えられる。NASH/NAFLD を背景とする HCC の治療にあたっては注意を要する結果と考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹原 康雄 (TAKEHARA, Yasuo)
浜松医科大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：70188217

(2) 研究分担者

藤江 三千男 (FUJIE Michio)
浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術補佐員
研究者番号：90397373