

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19406005  
 研究課題名（和文） ミャンマー国に於ける環境鉄によるウイルス性肝癌発症若年化に関する調査研究  
 研究課題名（英文） Involvement of environmental iron in juvenile development of virus-related liver cancer in Myanmar  
 研究代表者  
 小路 武彦（KOJI TAKEHIKO）  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：30170179

研究成果の概要（和文）：実習会をヤンゴンとネピドーで開催し、延べ90名に上る参加者を得、科学技術レベルの底上げに貢献した。また、HCV陽性例とは異なり、HBV単独陽性試料では鉄沈着は極めて軽微であった。一方、両試料でDNA酸化障害の亢進が検出され、両ウイルス間の肝癌誘発機構の差異が示唆された。鉄過剰摂取ラットでの部分肝切除後の再生早期化にKGFの関与が見い出されると共に酸化障害の亢進も認められ、NF- $\kappa$ Bによるシグナル伝達系の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Wet-lab courses were successfully held in Yangon and Nay-Pyi-Daw, in which totally 90 medical scientists joined to improve the state of the art. When the newly obtained HCC specimens were analyzed, only little accumulation of iron was found in HBV alone-positive specimens unlike HCV-positive ones. On the other hand, oxidative DNA damage was remarkable in the HBV specimens as well, indicating a possible difference in both viral-related liver carcinogenesis. Moreover, KGF seemed to be involved in the early onset of liver regeneration after partial hepatectomy in iron-overloaded rat model. The increase in both oxidative stress damage and expression of NF- $\kappa$ B found in the model may indicate a possible role of NF- $\kappa$ B in the acceleration of liver cell kinetics in iron-overloaded situations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：分子組織細胞化学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：ウイルス性肝癌、HCV、HBV、早期発癌、鉄過剰摂取、DNA酸化障害、ミャンマー、ラットモデル

## 1. 研究開始当初の背景

ミャンマー（旧ビルマ）国では、肝癌の発症は30代前半から見られ、日本に比べ10-15才低年齢での肝癌死亡例が多数経験されている。実際、B型肝炎ウイルス（HBV）のキャリア率は25%を超え、更に成人に於けるHBV抗体陽性者は95%以上に達する。またC型肝炎ウイルス（HCV）感染者の割合も輸血等を介して急激に上昇してきているが、肝癌発症の若年齢化との直接的因果関係は明らかでない。我々は、この若年齢発症の原因の一つとしてミャンマー国土に高濃度で含まれる鉄の過剰摂取の関与を疑い、平成13年からこれまで肝癌組織をミャンマー国医学研究局との共同研究として多数採取し、鉄沈着程度と肝細胞並びに肝癌細胞動態の比較検討を分子組織細胞化学的に行ってきた。その結果、試料の大多数はHCV陽性であり、日本のHCV陽性肝癌試料と比較して顕著な鉄貯留を見出し、更に鉄沈着と鉄反応エレメント結合蛋白の発現促進並びに増殖活性の増大との有意な相関を見出した。一方、実際ラット肝再生モデルで鉄過剰摂取が肝細胞増殖へのG0/G1期間の短縮を誘導することも見出し、臨床の現場でも慢性肝炎から硬変肝、更には肝癌へといった肝疾患の重篤化が鉄分の摂取制限により抑制されるとの報告がなされている。これらの結果は、鉄の過剰な摂取がHCVキャリアー患者の肝癌の早期誘導に関与することを示唆するが、この現象がHCV感染に特異的なのか或いはHBV等の他の原因による肝癌でも同様なのかは明白ではない。また鉄沈着による肝細胞増殖動態への作用の分子機序として鉄分子によって産生されたフリーラジカルにより形成される reactive oxygen species (ROS)を介する可能性があるが、その詳細は全く不明である。更に最近、腸管での鉄吸収をその輸送系の代謝を促進することにより阻害する肝細胞因子、ヘプサイジンが発見され、肝機能と鉄吸収との関連が示唆されているが、適切な検出抗体も無くその発現動態と肝細胞鉄代謝への関連などは不明であった。

## 2. 研究の目的

- (1)長崎大学とミャンマー国保健省（医学研究局(DMR)及び医学教育局）との包括的な学術協力協定の下、これまでのヤンゴン周辺のみならず首都ネピドーやマンダレー等の広範な地域で各地域の医科大学及び医学研究局との共同研究として肝癌試料を採取する。
- (2)得られた組織切片上で感染ウイルスの特

定や病理的検索を行った後、鉄貯留状態並びに鉄反応エレメント結合蛋白の発現動態と細胞増殖及び細胞死の動態等の基礎的なパラメーターを分子組織細胞化学的に解析し、HCV陽性肝癌細胞とHBV陽性肝試料との鉄関連パラメーターの差異を明らかにする。また、ウイルス遺伝子の変異についても検討する。

- (3)鉄依存的酸化ストレスの関与を明らかにするために、酸化ストレスマーカーであるハイドロキシノネナル修飾蛋白(HNE)染色並びにDNAの酸化障害で生じる8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の検出を行い、鉄影響下にある細胞の酸化ストレス障害についての知見を得る。また、転写への影響因子としてNF- $\kappa$ Bの発現も検討する。

- (4)血中鉄濃度の低下をもたらす鉄代謝の制御機構として新たに注目を集めているヘプサイジン発現に関して、上記試料或いは鉄過剰摂取ラットモデルに於ける差異を合成オリゴDNAプローブを用いたin situ hybridization法によるmRNAレベルで検討し、更に必要に応じてヘプサイジンペプチドへの抗体作成を試み蛋白発現動態を検討する。

- (5)鉄過剰摂取ラットモデルに於いて、部分肝切除に伴う肝再生の早期化とKeratinocyte growth factor (KGF)/FGF-7との関連を検討し、肝細胞動態の制御機構への洞察を得る。

- (6)ミャンマー人医学研究者に対し、分子組織細胞化学の技術講習会を開催し、現地の試料解析能力の向上を図り、もってこれらの研究成果の現地での展開と臨床現場へのフィードバックを可能とする。

## 3. 研究の方法

- (1)前首都ヤンゴンに位置するミャンマー国保健省医学研究局(Lower Myanmar)病理学研究部を活動拠点としてヤンゴン市内の大学病院と連携し、HBV及びHCV陽性肝癌試料を採取した。これまでの収集ではHCV陽性例が多数を占めたので、今回はHBV抗体を現地に供与して、HBV陽性例を一定数確保することを目指した。また検体は、全て新たに我々が供与した資材とプロトコルを用いて調整した。特にDNAとRNAの保持は細胞死の検討や種々の遺伝子発現検討上必須となるので、ミャンマー側で予めメチルグリーン/ピロニンY染色を行いDNAとRNAの保存度に基づいて試料の取捨選択をした。今回、新たな採取試料を利用することにより、各々の検体に対するより正確な臨床病理学的データの入手が可能となった。

(2) ヤンゴン以外の地区を担当する DMR (Central Myanmar) 及びマンダレー医科大学の医学研究者と技術講習会を通じて密接な関係を樹立し、検体収集に向けての活動を開始した。

(3) 得られたパラフィンブロックは、薄切後、種々の組織化学的検討に用いた。感染ウイルスの同定は特異抗体を用いた免疫組織化学により行う。鉄の組織細胞沈着は Perussian Blue 染色により、増殖活性の指標としてはオートクレーブで抗原性の賦活化を行った切片で Ki-67 染色を行い、また細胞死の検討としては、TUNEL 法を行った。ウイルス遺伝子の変異に関しては、生検組織から抽出した DNA 或いは RNA 試料を用い、PCR 法にて解析した。

(4) 各検体組織での鉄による酸化ストレスの程度を検討するため HNE の免疫染色を行い、鉄の沈着程度及び HNE 染色との程度を連続切片あるいは二重染色の組み合わせにより細胞レベルで比較検討した。更に DNA への障害程度を把握するため 8-OHdG に対する免疫染色を行い同様に検討した。NF- $\kappa$ B の発現は、免疫組織化学及びサウスウエスタン組織化学にて検討した。染色結果は、可能な限り画像処理装置による定量的なデータ解析を試みた。

(5) 採集した試料切片を用いて、ヘプサイジン mRNA 発現を非放射性的 in situ hybridization により検討した。ヘプサイジン蛋白の発現に関しても新たに開発された抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

(6) 結果の普遍性を検証する目的で、既に条件の確立した実験系である、成熟雄ラットに 3%カルボニル鉄を 12 週間摂取させた鉄過剰摂取モデルにて、部分肝切除を行い肝再生過程で上記と同様の検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 2007 年 1 月には、DMR (Lower Myanmar) 内外から 25 名前後の医学研究者の参加の下、第 6 回 wet-lab 講習会を開催し、子宮頸癌試料で human papilloma virus 16 及び多数の HPV 型を纏めて検出する免疫組織化学的検出法を体験させた。2008 年 12 月には、同じく DMR (Lower Myanmar) に於いて 40 名前後の医学研究者の参加の下、第 7 回 wet-lab 講習会を開催し、本年度は転写因子解析の一例として、エストロゲン受容体を免疫組織化学とサウスウエスタン組織化学によりマウス子宮及び卵巣切片で検出してその有効性を列証した。更に 2009 年 12 月には、ネピドーの DMR (Central Myanmar) に於いて、25 名前後の医学研究者・技術者の参加の下、第 8 回 wet-lab 講習会を開催し、エストロゲン受容体を標的として免疫組織化学とサウスウエスタ

ン組織化学の実技実習を行い、延べ 90 余名の研究者との交流を持った。

(2) 新たに入手した肝癌試料併せて 23 例を詳細に解析した結果、HBV 陽性例は 7 例で、その内 5 例は HCV との重複感染であった。HCV 陽性試料と異なり、HBV 単独感染では鉄沈着は認められず、両ウイルスの発癌誘発機構の差異が見い出された。

(3) 鉄沈着と 8-OHdG 陽性細胞頻度を詳細に検討したところ、必ずしも明白な相関関係を得られなかった。今後、鉄沈着を定量化し詳細な比較が必要と思われるが、HBV 単独陽性例でも強い酸化障害を認めたことから、他の因子 (例えばカビ毒素 Aflatoxin B1) の関与も要検討であることが示唆された。

(4) 同様のウイルス陽性例でも種々のパラメーターに大きな差異が認められたため、感染ウイルスのゲノム変異の可能性を考え検討した。肝癌試料を併せて 30 例を新たに入手し、一部の試料で組織から抽出した DNA を用い、PCR 法にて HBV 遺伝子解析を行ったところ、変異ウイルス感染を見出した。しかし、抽出 RNA を用いた RT-PCR 法による HCV 遺伝子の解析は不首尾に終わり、現地での RNA 抽出法の再検討を余儀なくされた。

(5) 鉄過剰摂取ラットモデルに於いて、部分肝切除後の再生が早期化される機構として KGF の産生誘導が同時に起こることを明らかにした。また鉄過剰摂取ラットで、NF- $\kappa$ B の有意な発現増大並びに酸化障害が観察され、鉄による酸化ストレスの増大が確認された。一方鉄摂取の制御に関与するヘプサイジンの mRNA 並びに蛋白の発現は正常肝と比較して大きな差異は認められなかった。また、ヒト試料での検討に於いても、試料間の質的変動を超える発現状態の変化は見い出せなかった。

(6) 以上の結果は、両ウイルス感染及び鉄や環境因子による酸化ストレスの増大が NF- $\kappa$ B 等の転写因子の活性化を介して肝細胞の増殖・死といったターンオーバーの過剰促進をもたらす、若年性での肝細胞癌発症に結びついていることが示唆された。酸化中和剤の利用等、これらの結果のミャンマー臨床現場への還元には一層の努力を要するが、学術的・人的交流の益々の促進によりミャンマー人医療関係者の支持を得て近い将来の実現に向かいたい。

#### 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 1 件)

(1) Shirendeb U, Koji T (他 7 名、9 番目)  
(2009) Human Papillomavirus infection

and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia, and Myanmar. **Acta Histochem Cytochem**, 42(6): 181-190. (査読有)

(2)Moriuchi H, Koji T (他7名、9番目) (2009) Diverse effects of FK506 on the apoptosis of hepatocytes and infiltrating lymphocytes in an allografted rat liver. **J Surg Res**, in press. (査読有)

(3)Goto S, Koji T, Kondo T (他5名、7番目) (2009) Glutathione S-transferase  $\pi$  localizes in mitochondria and protects against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 46(10): 1392-1403. (査読有)

(4)Suyama Y, Koji T, Shirasuna K (他3名、5番目) (2009) Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, 38(5): 476-480. (査読有)

(5)Matsumoto K, Koji T (他7名、9番目) (2009) Keratinocyte growth factor accelerates compensatory growth in the remaining lung after trilobectomy in rats. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 137(6): 1499-1507. (査読有)

(6)Nagai K, Koji T (他12名、11番目) (2008) Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: A novel in vitro model of the growth of acute ATL cells. **Int J Hematol**, 88(5): 551-564. (査読有)

(7)Nakamura H, Koji T, Eguchi K (他3名、5番目) (2008) Rapid and significant induction of TRAIL-mediated type II cells in apoptosis of primary salivary epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. **Apoptosis**, 13(11): 1322-1330. (査読有)

(8)Koji T (他4名、1番目) (2008) In situ detection of methylated DNA by histone endonuclease-linked detection of methylated DNA sites (HELMET): A new principle of analysis of DNA methylation. **Histochem Cell Biol**, 130(5): 917-925. (査読有)

(9)Nakajima H, Koji T (他6名、8番目) (2008) Blockade of the Fas/Fas ligand interaction suppresses hepatocyte apoptosis in ischemia-reperfusion rat liver. **Apoptosis**, 13(8): 1013-1021. (査読有)

(10)Abe-Yoshio Y, Koji T, Kohno S (他5名、7番目) (2008) Involvement of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in glomerular capillary repair in habu snake venom-induced

glomerulonephritis. **Virchows Arch**, 453(1): 97-106. (査読有)

(11)Nakagawa T, Koji T, Ito T (他8名、7番目) (2008) Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. **Genes & Dev**, 22(1): 37-49. (査読有)

(12)An S, Hishikawa Y, Liu J, Koji T (2007) Lung injury after ischemia-reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF- $\alpha$  and activation of Bid pathway. **Apoptosis**, 12(11): 1989-2001. (査読有)

(13)Nakamura H, Koji T, Eguchi K (他2名、4番目) (2007) Epidermal growth factor inhibits Fas-mediated apoptosis in salivary epithelial cells of patients with primary Sjögren's syndrome. **Clin Exp Rheumatol**, 25(6): 831-837. (査読有)

(14)Nakamura H, Koji T, Eguchi K (他2名、4番目) (2007) EGF activates PI3K-Akt and NF- $\kappa$ B via distinct pathways in salivary epithelial cells in Sjögren's syndrome. **Rheumatol Int**, 28(2): 127-136. (査読有)

(15)Kawahara I, Koji T (他4名、6番目) (2007) The expression of vascular dendritic cells in human atherosclerotic carotid plaques. **Hum Pathol**, 38(9): 1378-1385. (査読有)

(16)Mochizuki K, Koji T (他5名、7番目) (2007) Possible protection of sinusoidal endothelial cells by endothelin B receptor during hepatic warm ischemia-reperfusion. **Surgery Today**, 37(6): 460-467. (査読有)

(17)Kumar A, Koji T, Godbole MM (他8名、5番目) (2007) Hyperthyroidism induces apoptosis in rat liver through activation of death receptor-mediated pathways. **J Hepatol**, 46(5): 888-898. (査読有)

(18)Kyaw Soe, Koji T (他6名、8番目) (2007) Possible correlation between iron deposition and enhanced proliferating activity in hepatitis C virus-positive hepatocellular carcinoma in Myanmar (Burma). **J Gastroenterol**, 42(3): 225-235. (査読有)

[学会発表] (計8件)

(1)Yin Min Htun, Koji T (他4名、3番目) (2010年1月) Association between carcinogenic effect of Aflatoxin B1 (AFB1) and other histochemical markers on Hepatocellular Carcinoma. Myanmar Health Research Congress 2010 (Yangon, Myanmar).

(2) Koji T (2009年11月5日) Nucleolar localization of rDNA transcripts detected by electron microscopical in situ hybridization. The 9th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (Nanning, China).

(3) 小路武彦 (2009年9月5日) DNAメチル化部位局在のための新しい組織化学: HELMET法。第41回日本臨床分子形態学会総会・学術集会(神戸)。

(4) Moh Moh Htun, Koji T (他6名、8番目) (2008年1月) Molecular detection of hepatitis B viral DNA (HBV-DNA) in liver tissues of primary hepatocellular carcinoma cases by nested polymerase chain reaction. Myanmar Health Research Congress 2008 (Yangon, Myanmar).

[図書] (計4件)

(1) 小路武彦 (2009) 遺伝子と蛋白質合成。[標準細胞生物学] (石川春律 監修、近藤尚武・柴田洋三郎・藤本豊士・溝口明 編集)、医学書院、東京、pp. 24-49.

(2) 小路武彦編著 (2009) [永遠の不死-精子形成細胞の生物学]、サイエンス社、東京、全143ページ。

(3) 小路武彦 (2007) In situ ハイブリダイゼーション法の基礎と応用。[組織細胞化学2007] (日本組織細胞化学会編)、中西印刷、京都、pp. 79-89.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: DNAメチル化部位の局在検出方法

発明者: 小路武彦・近藤志穂

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願2008-241679

出願年月日: 2008年9月19日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小路 武彦 (KOJI TAKEHIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

教授

研究者番号: 30170179

### (2) 研究分担者

菱川 善隆 (HISHIKAWA YOSHITAKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

准教授

研究者番号: 60304276

安 樹才 (AN SHUCAI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

研究者番号: 30404213

(H19→H20)

佐藤 陽子 (SATO YOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

(H20→H21)

研究者番号: 50398963

和泉 伸一 (IZUMI SHINICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

研究者番号: 40264246

安倍 邦子 (ABE KUNIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

講師

研究者番号: 00253641