

機関番号：32644
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590615
 研究課題名（和文） 肝発癌機構の解明とそれに基づく発癌予防戦略
 研究課題名（英文） Understanding the mechanism of liver carcinogenesis and strategy for the prevention of hepatoma development
 研究代表者
 渡辺 哲（WATANABE TETSU）
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号：10129744

研究成果の概要（和文）：CDAA 食投与によるラット NASH モデルでは、早期より肝に著明な脂肪沈着を認め、4 ヶ月で肝硬変を呈した。肝の脂質過酸化と門脈血エンドトキシンの上昇がみられた。酪酸菌を 1% の割で餌に混ぜて投与すると、エンドトキシン濃度が有意に低下し、脂質過酸化も著明に抑制された。また、肝の有意な線維化抑制と前癌病変である GST-P の産生低下がみられた。これらの変化は、腸内細菌叢の変化と、菌が産生する酪酸によることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The CDAA diet induced NASH in Fisher rats, characterized by steatosis, inflammation, fibrosis, and cirrhosis in the liver. Serum level of endotoxin in the portal vein and lipoperoxidation in the liver were observed at 2 months of CDAA diet. On the contrary, treatment of rats with *Clostridium butyricum* in CDAA diet markedly improved liver fibrosis and lowered the level of endotoxin and GST-P. Alteration of the intestinal flora and butyrate produced by *Clostridium butyricum* may involve in these protective responses to the NASH progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：予防医学、脂肪肝、肝発癌、酪酸菌

1. 研究開始当初の背景

(1)我々はこれまで職場健診で多くみられる肝機能障害に着目し、その大多数が非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) と考えられることや、この病態がメタボリックシンドロームと関連することを報告した (Metabolism 2003, Jpn J Public Health 2005)。NAFLD は健

診受診者の約 10～25% にみられ、内臓肥満やインスリン抵抗性と密接に関連し、現在ではメタボリックシンドロームの肝病変であると考えられている。その中で約 15% をしめる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は高率に肝硬変、肝細胞癌へと進展することが報告されており、近い将来、現在のウイルス性肝

炎からの発癌と同程度の患者が発症することが想定される。

(2) NASHの機序としては脂肪蓄積 (first hit) を基盤とし、酸化ストレス、エンドトキシンなどが second hit として関与すると考えられている。NASHの治療としては、食事や運動療法以外に抗酸化剤 (ビタミン剤等) や糖尿病治療薬であるインスリン抵抗性改善薬などが臨床研究で使用されているが、病気の進行および肝発癌の阻止に関してはいずれも期待はずれである。

(3) 最近 NASH の発症における腸内細菌の関与が注目されている。NAFLD では腸内細菌の異常増殖により産生されるエンドトキシンが炎症性サイトカイン TNF- α の産生を誘導し、これがインスリン抵抗性を増すとともに肝細胞に炎症を引き起こすとされる。

(4) 酪酸は、食物繊維を摂取すると腸内細菌により腸管内で産生される中鎖脂肪酸で、大腸癌の発生予防効果が認められている。酪酸は、*in vitro* で種々の癌細胞に対する強力な分化誘導、アポトーシス作用が認められており、培養ヒト肝癌細胞に対しても分化誘導作用を示す。その作用は発癌抑制遺伝子 p21^{WAF1} を介することを報告した (Int J Cancer 1991, J Gastroenterology 1994)。酪酸菌 (*Clostridium butyricum*) は、芽胞を形成する嫌気性菌で、経口摂取すると腸管内で増殖し酪酸を産生する。

2. 研究の目的

そこで本研究では、

(1) 人の NASH と類似の肝病変 (脂肪肝から肝硬変、肝癌へ) を呈するコリン欠乏食 (CDAA) 投与ラットモデルを用い、脂肪肝からの肝発癌過程を酸化ストレスの面および炎症関連遺伝子や matrix metalloproteinase (MMP) の動態を中心に解析し、肝線維化の進展、改善の中心となる MMPs 発現との関連を明らかにする。

(2) 同モデルで、酪酸菌経口投与による肝線維化および発癌抑制効果を検討し、その機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Fisher344 雄性ラット (6~7 週齢) に CDAA 食を投与した。この系で2週間後、2ヵ月後、4ヵ月後、1年後にラットを屠殺し、血液と肝臓を採取した。CDAA 食にコリンを付加した群 (CSAA 食) をコントロールとして比較検討した。

(2) 組織学的検討として、採取した肝臓より新鮮凍結標本、4%パラホルムアルデヒド/パラフィン包埋標本を作製し、脂肪変性、肝障害、肝線維化、肝癌の有無を HE 染色、Azan

染色で確認した。前癌病変は GST-P 陽性細胞の検出により行った。免疫組織学的検討により、酸化ストレスのマーカー

(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-OHdG)、(4-hydroxy-2-nonenal; 4-HNE)を検出した。

(3) 肝組織における蛋白質の産生は、Western blot 法で行い、MMPs の酵素活性は Gelatin zymography で行った。

(4) 治療群として、CDAA 食に酪酸菌の原末を 1%の割合で混ぜて投与し、同様に肝臓と血液を採取した。酪酸菌の腸管内での増殖の有無や酪酸菌投与による腸内細菌叢の変化は、採取した糞便中の酪酸菌の定量的 PCR 法と T-RFLP 法による解析で行った。

4. 研究成果

(1) CDAA 食により、2 週目に著明な脂肪肝が、2 ヶ月で肝線維化、4 ヶ月で肝硬変に進展した。組織学的検討でも、2 ヶ月目より Azan 染色で線維化が著明にみられた (図 1)。

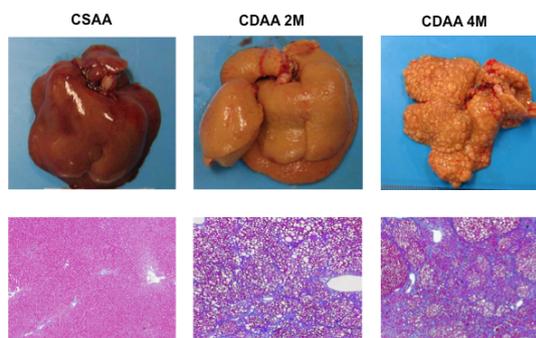


図 1 CDAA 食による肝線維化進展

(2) 酪酸菌を 1%の割合で CDAA 食に混ぜて投与し、脂肪肝、肝線維化に対する抑制効果を検討した。図 2 に示すように、2 ヶ月、4 ヶ月目とも CDAA 食投与群と比べ、線維化は有意に抑制されていた。

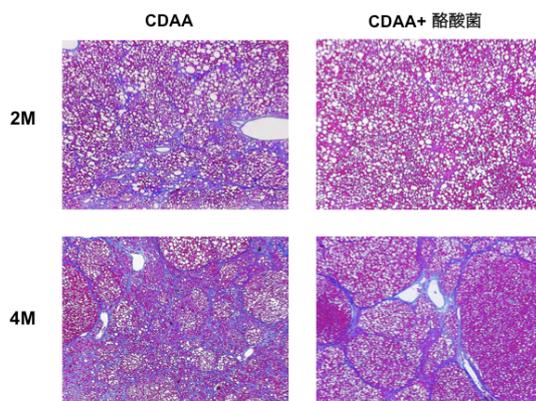


図 2-1 酪酸菌投与による肝線維化抑制

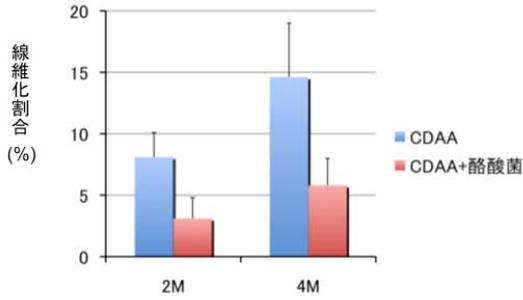


図 2-2 Azan 染色陽性面積の比較

(3) 各群のラットの2ヵ月目の門脈血を採取し、エンドトキシンを測定した。CSAA 群に比べ、CDAA 群ではエンドトキシンが著明に上昇し、腸内細菌叢の変化と産生されたエンドトキシンが CDAA による肝病変の進行に関与していることが示唆された。酪酸菌投与は、門脈血のエンドトキシン濃度を有意に減少させた (図 3)。

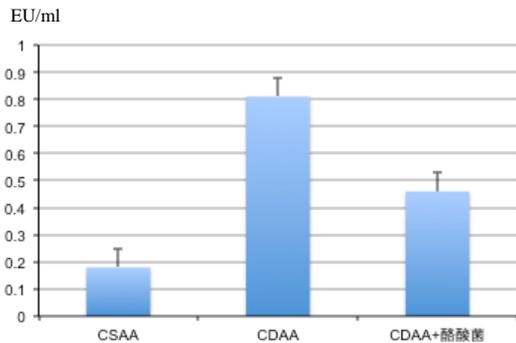


図 3 門脈血エンドトキシン濃度

(4) CDAA 食投与により、肝臓には脂質過酸化のマーカである 4-HNE が検出された。酪酸菌添加群では、4-HNE は検出されなかった (図 4)。

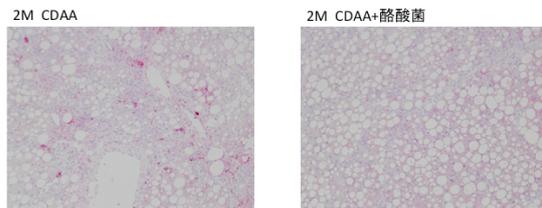


図 4 脂質過酸化マーカー4HNE の検出

(5) 前癌病変とされる GST-P 陽性細胞を酵素抗体法で検出すると、2ヵ月目では CDAA 食群で陽性細胞がみられたが、CDAA+酪酸菌群ではみられなかった。4ヵ月目では、CDAA 群に比べ、酪酸菌投与群では陽性細胞コロニーが著明に小さかった (図 5)。

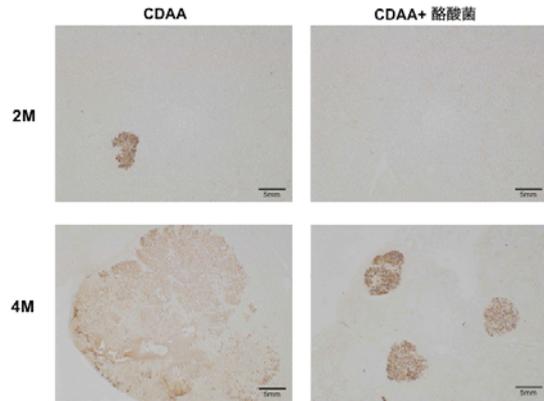


図 5 GST-P 陽性細胞の検出

(6) Western blot 法で肝線維化に関与する α -smooth muscle actin (α -SMA)と TGF- β を、前癌病変のマーカである GST-P の蛋白量を検出すると、酪酸菌投与群では α -SMA と GST-P の低下を認めたが、TGF- β には差がなかった (図 6)。

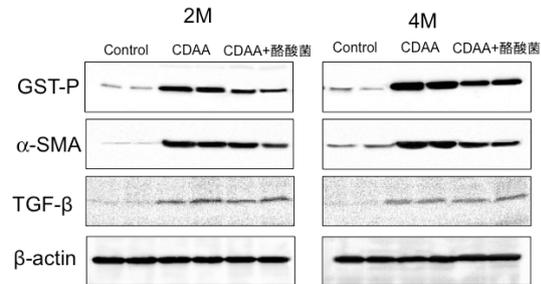


図 6 Western blot 法による解析

(7) Gelatin zymography による matrix metalloproteinase (MMP)の酵素活性を調べると、線維化に関与する MMP-2、MMP-9 の酵素活性は、2ヵ月目でコントロールに比べ上昇していたが、酪酸菌投与による差はみられなかった (図 7)。間質性コラゲナーゼ MMP-13 の酵素活性は検出できなかった。

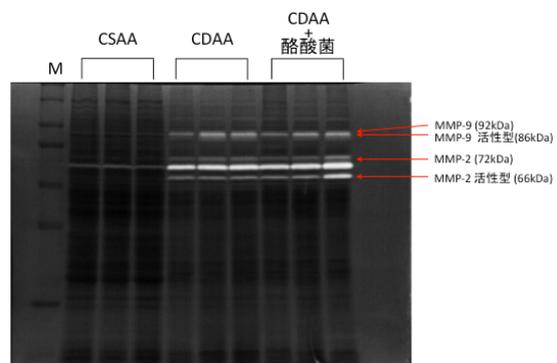


図 7 Gelatin zymography

(8) CDAA 群と CDAA+酪酸菌群における腸内細菌叢の解析を、採取した糞便の T-RFLP 法を用いて行った。CSAA 群のプロファイルは類似し、腸内フローラは一定のパターンを示した。一方 CDAA 投与群では CSAA 群と比べ多くの菌種が検出された。CDAA+酪酸菌群では酪酸菌のフラグメントがみられた。菌のプロファイルは、CDAA 群と CSAA 群で異なっていた。定量的 PCR では、CDAA+酪酸菌群では平均 1.1×10^8 cfu/g の酪酸菌を認めた。

以上の結果より、CDAA 食は、ラットに人の NASH と類似の病変を引き起こした。すなわち早期の著明な脂肪沈着に引き続き、肝線維化、肝硬変へと病変が進行した。また、CDAA 食投与 2 ヶ月目より前癌病変とされる GST-P 陽性コロニーが検出され、1 年後には一部に肝腫瘍を認めた。さらにこのモデルでは、肝臓での酸化ストレスの関与が脂質過酸化を示す 4-HNE 陽性より、また、エンドトキシン上昇が門脈血で認められたことより、過剰増殖した腸内細菌によるエンドトキシンが肝での炎症持続に関与することが示唆され、機序の面からも人の NASH モデルとして適している。

酪酸菌(*Clostridium butyricum*)は芽胞を形成する嫌気性菌で、経口摂取後腸管に到達すると発芽し、酪酸を産生する。今回の実験で、酪酸菌投与群のラット糞便からは全例酪酸菌が検出された。しかし、T-RFLP 法による腸内細菌叢のプロファイルの検討では、コントロールの CSAA 群と CDAA 群間では差がみられたが、酪酸菌投与群での細菌叢に特有のプロファイルはみられず、一部は CSAA 群と類似の、一部は CDAA 群と類似のプロファイルを示したが、いずれも CDAA 食群とは異なっていた。酪酸菌投与群での門脈血エンドトキシン濃度の低下は、酪酸菌投与による腸内細菌叢の改善(たとえわずかであっても)や、腸管の菌の透過性の変化によるものと考えられる。

酪酸菌の経口投与により、肝線維化と前癌病変である GST-P 陽性コロニー形成に対する著明な抑制効果が認められた。Western blot 法による解析で、 α -SMA の産生低下と、GST-P 産生低下がみられ、MMP-2、-9 の変化がみられなかったことより、酪酸菌が産生する酪酸が肝星細胞活性化を抑制し、線維化抑制につながり、さらに発癌抑制につながることが強く示唆された。

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 6 件)

- ① Hitoshi Endo, Maki Niioka, Yoshihiko Sugioka, Johbu Itoh, Kaori Kameyama, Isao Okazaki, Risto Ala-Aho, Veli-Matti Kähäri, Tetsu Watanabe. Matrix metalloproteinase-13 promotes recovery from experimental liver cirrhosis in rats. Pathobiology, 査読有、in press
- ② Tatehiro Kagawa, Jun Koizumi, Sei-ichiro Kojima, Naruhiko Nagata, Makoto Numata, Norihito Watanabe, Tetsu Watanabe, Tetsuya Mine. Transcatheter arterial chemoembolization plus radiofrequency ablation therapy for early stage hepatocellular carcinoma. Cancer, 査読有、116: 3638-44, 2010
- ③ Isao Okazaki, Minoru Sugita, Hideaki Matsuki, Syed Muhammad Baqui Billah, Tetsu Watanabe. Additional candidates to conventional genes susceptible for lung cancer and changing trend in Japan (Review). Oncology Reports, 査読有、23: 1493-1500, 2010
- ④ Junichi Saito, Yasutada Imamura, Joji Itoh, Shigeo Matsuyama, Akie Maruta, Toshihiko Hayashi, Ataru Sato, Norihito Wada, Kazuo Kashiwazaki, Yutaka Inagaki, Tetsu Watanabe, Yuko Kitagawa, Isao Okazaki. ELISA measurement for urinary 3-Hydroxyproline-containing peptides and its preliminary application to healthy persons and cancer patients. Anticancer Research, 査読有、30: 1007-1014, 2010
- ⑤ Endo H, Watanabe T, Sugioka Y, Niioka M, Inagaki Y, Okazaki I. Activation of two distinct MAPK pathways governs constitutive expression of matrix metalloproteinase-1 in human pancreatic cancer cell lines. Int J Oncology, 査読有、35: 1237-1245, 2009
- ⑥ 三廻部肇、古屋博行、渡辺 哲: 若年労働者の飲酒と肝障害がメタボリックシンドロームの発症に与える影響、アルコールと医学生物学、査読有、28:129-133、2009年3月(東洋書店)

[学会発表] (計 0 件)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 哲 (WATANABE TETSU)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10129744