

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03139

研究課題名(和文) 副腎-肝臓連関によるイヌ肝細胞癌発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Interaction of adrenal glands and liver in canine hepatocellular carcinoma

研究代表者

滝口 満喜 (Takiguchi, Mitsuyoshi)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：70261336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：犬の代謝機能障害疾患である副腎皮質機能亢進症が肝細胞癌の発症リスクであることから、副腎ステロイドホルモンと肝細胞癌発症の関連性の解明を目指した。まずは、ステロイドホルモンの網羅的解析を可能とする液体クロマトグラフ質量分析法(LC/MS/MS)を開発した。LC/MS/MSにより19種類のステロイドホルモンの解析が可能となったが、血中ステロイドホルモンと肝細胞癌の発症の関連性はあまり強くなかった。続いて、ステロイドホルモンと肝臓のエピゲノム変異の関連を探索したところ、9種類の遺伝子が候補遺伝子として抽出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではステロイドホルモンの網羅的解析法を開発し、臨床応用した。血中ステロイドホルモンと肝細胞癌発がんの関連性は明確にならなかったが、開発した網羅的解析法を肝臓組織中のステロイドホルモンや尿中の代謝産物の測定に応用することで、代謝機能障害疾患と肝細胞癌の関連性の解明に貢献できる。一方、エピゲノム変異(DNAの配列によらない遺伝子変異)の解析により、ステロイドホルモン(副腎皮質機能亢進症)と肝細胞癌との間に関連すると思われる候補遺伝子の抽出に成功した。これらの遺伝子を軸に、代謝機能障害疾患である副腎皮質機能亢進症と肝細胞癌の関連性の解明が進むだろう。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common primary liver tumor in dogs. Hyperadrenocorticism (HAC) was a highly concurrent disease with canine HCC. The aim was to specify the relationship between HCC and HAC in dogs. A total of 19 steroids were quantitatively measured using a developed liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. In addition, DNA methylation levels were compared among liver tumor, surrounding region, and normal liver.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：肝細胞癌 副腎肝臓連関 網羅的ステロイドホルモン測定 エピゲノム変異 副腎皮質機能亢進症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの回顧的疫学研究により、犬肝細胞癌の特徴を明らかにしてきた。その中でも

- (1) 副腎皮質機能亢進症の併発は肝細胞癌発症リスクを 6.9 倍高める
- (2) 6 葉の肝臓の 1 葉から発生し限局性腫瘍を形成する

の 2 点は、犬肝細胞癌の発がんメカニズムを考える上で重要であると考えられた。副腎皮質機能亢進症は犬で最も多い内分泌代謝性疾患である。副腎皮質でのステロイドホルモンが産生過多になり、肝腫大・高脂血症・インスリン耐性などの病態を来す。特に、肝臓への影響は顕著で、肝細胞の空胞変性が起こり、ステロイド誘発性アルカリホスファターゼ (ALP) が上昇する。ヒトではいわゆる脂肪肝である、代謝機能障害関連脂肪肝 MAFLD (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease) から脂肪肝炎・肝硬変を経て肝臓癌に至ることが知られている。したがって、犬でも代謝機能障害疾患である副腎皮質機能亢進症が肝細胞癌の発症リスクであることから、ヒトの MAFLD-肝細胞癌に類似した病態が、犬においても存在するのではないかと推測された。

### 2. 研究の目的

犬における副腎皮質機能亢進症が誘導する肝細胞癌発がんメカニズム説に立脚し、

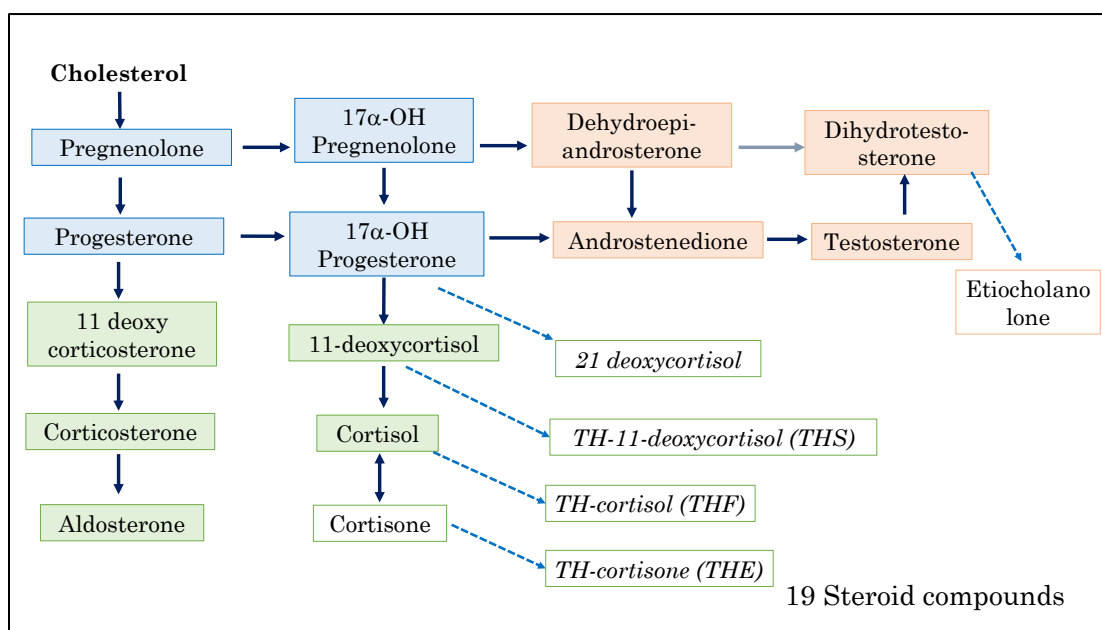
- (1) 副腎ステロイドホルモン産生・代謝のインバランス検出
- (2) それに引き続くエピゲノム変異の検出

を行い、犬の肝細胞癌の病態解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 副腎ステロイドホルモンの定量

肝細胞癌 30 例、副腎皮質機能亢進症 15 症例を対象とした。肝細胞癌 31 症例中、副腎皮質機能亢進症を併発していたのは 10 症例だった。合計 45 症例の血清を用い、下図で示す 19 種類のステロイドホルモンの定量を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) で行った。19 種のうち 5 種類 (cortisone, 21 deoxycortisol, THS, THF, THE, Etiocholanolone) は代謝産物であった。



#### (2) 肝細胞癌におけるエピゲノム変異の解析

エピゲノム変異とは DNA の核酸配列の変化に寄らずに遺伝子発現を制御もしくは伝達するシステムのことである。上述の肝細胞癌 30 症例を含む、37 症例の肝臓腫瘍および非腫瘍部位の肝臓、ならびに実験的ステロイドホルモン誘導脂肪肝 5 症例、正常肝臓 5 症例を対象に、エピゲノム変異の一つである DNA メチル化の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 副腎ステロイドホルモンの定量

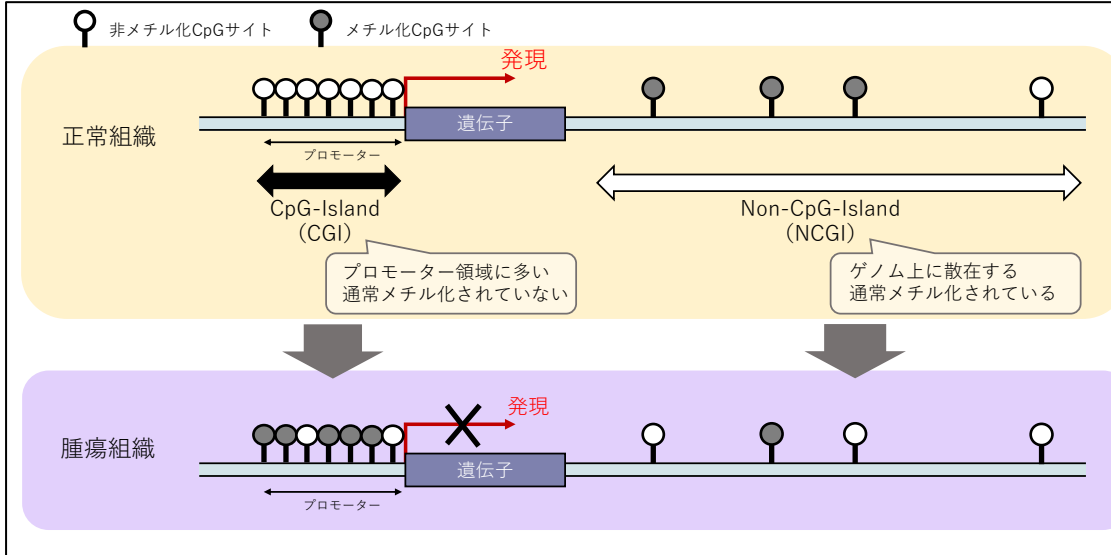
19 種類のステロイドホルモンのうち、3 種の代謝産物を含む 11 種類は肝細胞癌症例、副腎皮質機能亢進症症例、併発症例において定量が可能となった。それらの 11 種類のホルモン濃度に基づき主成分分析を行ったが、疾患特異的なパターンは存在しなかった。また、疾患の違いによ

る各ホルモンの濃度変化も観察されなかった。

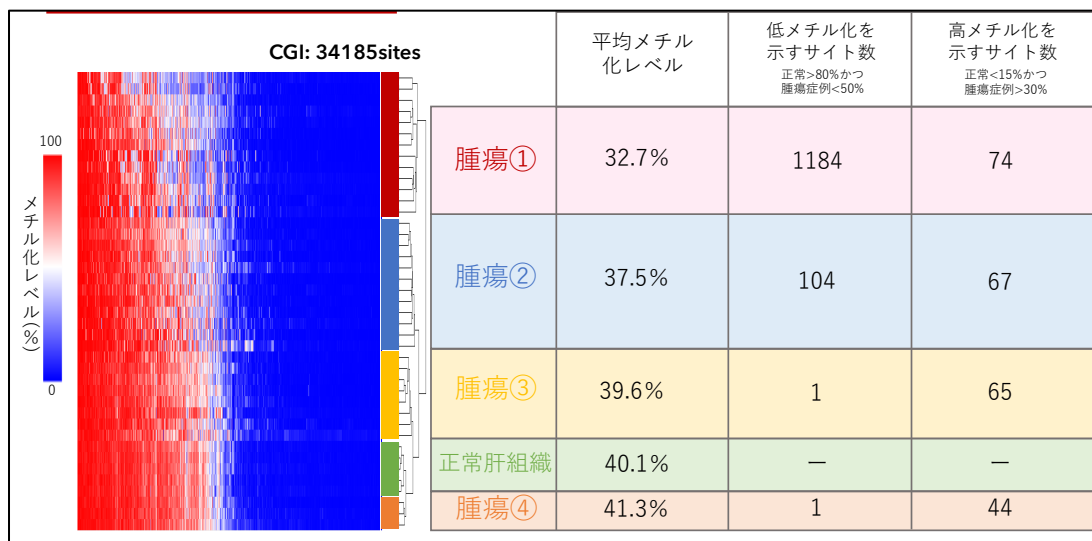
血液中のステロイドホルモン濃度に疾患による差もしくは疾患特有的なパターンは確認できなかったが、本研究において開発された網羅的ステロイドホルモン測定系は、今後の研究において有用と考えられる。

## (2) 肝細胞癌におけるエピゲノム変異の解析

DNA メチル化が生じやすい、シトシンとグアニンの集中する配列 CpG を 72,367 ヶ所 (7630 遺伝子) 解析した。正常な肝臓ではほとんどの CpG サイトが高メチル化されていたのに対し、腫瘍部位では多くの CpG サイトが低メチル化する傾向にあったが、個体差も観察された。



また、メチル化の程度に基づいて肝細胞癌 37 症例をクラスタリングすると、4 つのクラスターに分かれ、中には正常肝臓組織と同レベルの DNA メチル化を呈する症例も存在した。



さらに、実験的ステロイドホルモン誘導脂肪肝—非腫瘍肝臓—肝細胞癌組織の順に DNA メチル化に変化のある遺伝子を解析したところ、9 種類の遺伝子が抽出された。

病理組織学的に肝細胞癌と診断されても、エピジェネティックには複数の集団に分かれることが明らかになり、犬の肝細胞癌に新たな知見をもたらした。また、犬における副腎皮質機能亢進症—肝細胞癌に関連する遺伝子候補が発見され、今後の発がんメカニズム研究に大いに役立つだろう。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 SASAKI Noboru, OO Thandar, YASUDA Yoshikazu, ICHISE Takahiro, NAGATA Noriyuki, YOKOYAMA Nozomu, SASAOKA Kazuyoshi, MORISHITA Keitaro, NAKAYAMA Shouta MM, ISHIZUKA Mayumi, NAKAMURA Kensuke, TAKIGUCHI Mitsuyoshi, IKENAKA Yoshinori	4. 巻 83
2. 論文標題 Simultaneous steroids measurement in dogs with hyperadrenocorticism using a column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1634 ~ 1642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 SASAKI Noboru, IKENAKA Yoshinori, INOUE Yumiko, ICHISE Takahiro, NAGATA Noriyuki, ISHIZUKA Mayumi, NAKAYAMA Syouta MM, NAKAMURA Kensuke, TAKIGUCHI Mitsuyoshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Urinary free metanephrines measurement in dogs with adrenal gland diseases using a new simple liquid chromatography tandem mass spectrometry method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 648 ~ 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oo Thandar, Sasaki Noboru, Ikenaka Yoshinori, Ichise Takahiro, Nagata Noriyuki, Yokoyama Nozomu, Sasaoka Kazuyoshi, Morishita Keitaro, Nakamura Kensuke, Takiguchi Mitsuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Serum steroid profiling of hepatocellular carcinoma associated with hyperadrenocorticism in dogs: A preliminary study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 1014792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2022.1014792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 NAGATA Noriyuki, SAWAMURA Hiryu, MORISHITA Keitaro, HOSOYA Kenji, YOKOYAMA Nozomu, SASAOKA Kazuyoshi, SASAKI Noboru, NAKAMURA Kensuke, IKENAKA Yoshinori, TAKIGUCHI Mitsuyoshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Urinary corticoid to creatinine ratios using IMMULITE 2000 XPi for diagnosis of canine hypercortisolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 954 ~ 959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 LEELA-ARPORN Rommaneeya, OHTA Hiroshi, SHIMBO Genya, SASAKI Noboru, TAKIGUCHI Mitsuyoshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Morphometric evaluation of canine hepatocellular carcinoma using computed tomography: a promising tool for predicting malignancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1459 ~ 1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0218	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Oo Thandar, 佐々木東、池中良徳、永田矩之、一瀬貴大、Yong Bin Teoh、川元誠、小島一輝、菅原芽伊、中山翔太、石塚真由美、中村健介、滝口満喜
2. 発表標題 Comprehensive analysis of steroid profile in dogs with Cushing' syndrome and hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅利友、山崎淳平、Oo Thandar、細谷謙次、金尚昊、木之下怜平、竹内恭介、賀川由美子、佐々木東、中村健介、滝口満喜
2. 発表標題 イヌの肝細胞腫瘍におけるDNAメチル化の網羅的解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村伽奈, 佐々木東, 永田矩之, Thandar Oo, 池中良徳, 中村健介, 滝口満喜
2. 発表標題 血中コルチゾール測定におけるコルチゾール以外のステロイドホルモンの影響
3. 学会等名 第18回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田淑一、永田矩之、佐々木東、池中良徳、Thandar Oo、中村健介、滝口満喜
2. 発表標題 カラムスイッチングLC-MS/MS法による犬副腎皮質ホルモンの網羅的測定
3. 学会等名 第17回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Thandar Oo, Noboru Sasaki, Yoshinori Ikenaka, Mei Sugawara, Yong Bin Teoh, Kazuki Kojima, Noriyuki Nagata, Masahiro Tamura, Shouta Nakayama, Kensuke Nakamura, Mayumi Ishizuka, Mitsuyoshi Takiguchi
2. 発表標題 Steroid profile in dogs with hepatocellular carcinoma and hyperadrenocorticism
3. 学会等名 The 8th SaSSOH (Sapporo Summer Symposium for One Health) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Thandar Oo, Noboru Sasaki, Yoshinori Ikenaka, Noriyuki Nagata, Nozomu Yokoyama, Kazuyoshi Sasaoka, Keitaro Morishita, Kensuke Nakamura, Mitsuyoshi Takiguchi
2. 発表標題 serum steroid profile in dogs with hepatocellular carcinoma with/without hyperadrenocorticism
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学One Health リサーチセンター 特殊検査受託システム  
<https://ohrc.vetmed.hokudai.ac.jp/special-inspection/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 正晃  (Murakami Masaaki)  (00250514)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授    (10101)	
研究分担者	山崎 淳平  (Yamasaki Jumpei)  (20732902)	北海道大学・獣医学研究院・特任准教授    (10101)	
研究分担者	池中 良徳  (Ikenaka Yoshinori)  (40543509)	北海道大学・獣医学研究院・教授    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関