

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390060

研究課題名（和文）核内受容体 PPAR の機能に着目した C 型肝炎関連肝癌の予防法の開発

研究課題名（英文）Development of prevention methods for hepatitis C - related liver tumor focusing function of nuclear receptor PPAR

研究代表者

青山 俊文（AOYAMA TOSHIFUMI）

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50231105

研究成果の概要（和文）：C型肝炎関連肝癌発症は核内受容体 PPAR の活性化を必須因子として生じることを発見してきた。本研究では、C型肝炎ウイルスコア蛋白を発現するトランスジェニックマウスを用いて、PPAR のアンタゴニスト（MK886）等の投与により肝発癌を妨ぐ試みを行った。高用量 MK886（40 mg/kg/日）の投与により肝発癌を完全に阻止出来ることが確認されたが、一部のマウスに対する致死的毒性が生じるという問題点も確認された。

研究成果の概要（英文）：Presentation of hepatitis C virus - related liver tumor was found that activation of nuclear receptor: PPAR exerts as an essential factor. In this study, several attempts to prevent occurrence of liver tumor by means of PPAR antagonist (MK886) etc. were done, using transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. Administration of high dose MK886 (40 mg/kg/day) was confirmed to completely prevent occurrence of liver tumor, however, MK886 could cause fatal toxicity in some mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学・C型肝炎

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルスの感染に由来する肝癌の発生は未知な点が多かった。感染患者が、抗ウイルス剤投与によりウイルスの除去に成功して肝炎症状が低下しても、RNAウイルス由来の遺伝子導入の影響は全く未知の問題であり、肝癌の発生リスクについては不明である。HepG2細胞にC型肝炎ウイルスコア蛋白を発現させた *in vitro* 系では核内受容体の一種である PPARalpha の発現低下が観察さ

れ、これにより脂肪肝が形成されるとの報告があった。我々はC型肝炎ウイルスコア蛋白を発現させたトランスジェニックマウスを用いて関連研究を行ったところ、*in vitro* 実験系での結果に反して、PPARalpha の発現増加とその活性化が肝発癌の必須因子であることを発見報告した。そこで、PPARalpha 活性化を妨げることにより、肝発癌を抑制することを案出した。

2. 研究の目的

当該研究においては、PPARalpha アンタゴニストの投与・PPARalpha を活性化させる脂肪酸類を減少させるための抗高脂血症剤の投与・PPARalpha を活性化させる脂肪酸類を減少させるための栄養処方などを介して、当該トランスジェニックマウス肝臓におけるPPARalpha 活性化の阻害と肝発癌の低下を目的として実験を行った。内容が多岐にわたり、報告書のスペースに制限があることから、主にPPARalpha アンタゴニストに関する結果をまとめた。

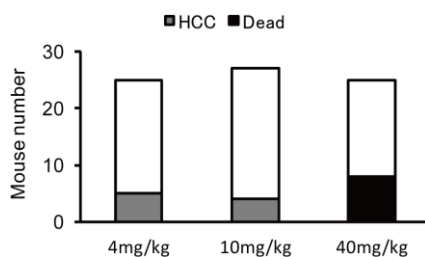
3. 研究の方法

生後6ヶ月齢の当該トランスジェニックマウスにPPARalpha アンタゴニスト (MK886) を、4 mg/kg/日・10 mg/kg/日・40 mg/kg/日の用量で16ヶ月間経口投与した。1投与量グループは25匹または27匹のマウスで構成され、事故なしに長期投与を遂行出来た。投与後に解剖し、肝発癌を調べ、血清と肝臓を回収した。肝臓の中性脂肪含量を測定し、H&E染色により組織的検討を行った。肝臓でのPPARalpha 活性化を調べるために、PPARalpha mRNA とPPARalpha 標的遺伝子であるAOX (アシル CoA オキシダーゼ) mRNA およびMCAD (中鎖脂肪酸アシル CoA 脱水素酵素) mRNA をRT-PCR法にて半定量化した。

4. 研究成果

当初、4 mg/kg/日・10 mg/kg/日投与を行ったが、図1に示されたように、MK886による肝発癌抑制効果は十分なものではなかった。4 mg/kg/日投与では、25匹中5匹に明瞭な多数の肝発癌が確認された。10 mg/kg/日投与では、27匹中4匹に小型のHCCを認めた。これを基に、投与量を40 mg/kg/日に増加させたところ、25匹中8匹が途中で死亡したが、残りのマウス肝臓にはHCCは検出されなかった。40 mg/kg/日では、途中で死亡した個体を含めて、全てのマウスにHCCは検出されなかったが、この投与量では致死的毒性を生じることが明らかになった。

図 1



肝臓の中性脂肪含量を解析したところ、各

投与量グループ間で大差がなく (図2)、全てのマウスがNAFLDを呈していた。この結果はH&E染色においても同様であった (図3)。

図 2

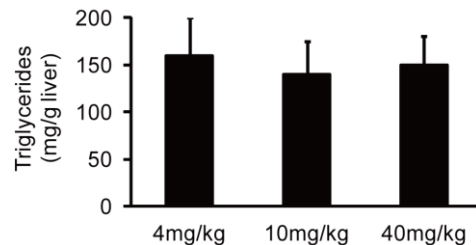
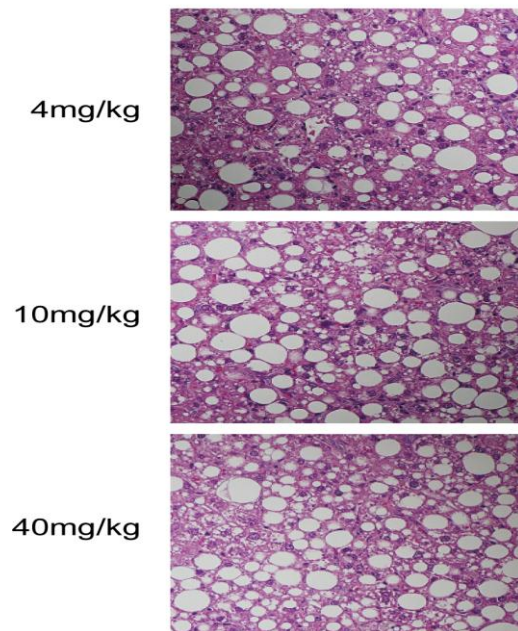
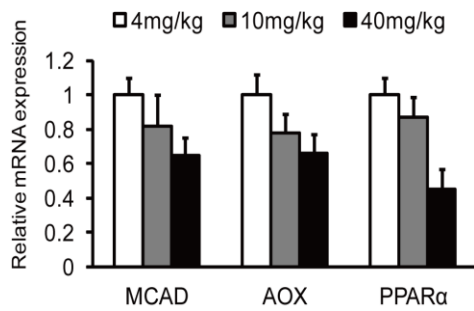


図 3



MK886がPPARalpha アンタゴニストとして作用したか否かを調べるために、典型的な標的遺伝子であるMCADとAOXを含めた3分子種のmRNA発現量を測定した (図4)。3分子種のmRNA発現量はMK886投与量依存的に減少した。PPARalpha mRNA発現量はセルフコントロールされることが知られており、標的遺伝子同様の变化を示すことはMK886のアンタゴニスト作用を強調する結果である。他のPPARalpha 標的遺伝子 (長鎖アシル CoA 脱水素酵素・極長鎖アシル CoA 脱水素酵素・ペルオキシソームチオラーゼ・CYP4A1・L型脂肪酸結合蛋白) のmRNA発現変化を調べたところ、図4の結果と矛盾のない結果が得られた。

図 4



MK886 が PPARalpha アンタゴニストとして作用し、肝発癌を強力に阻止することは確認できたが、実験期間中に25匹中8匹のマウスに致死性の毒性を引き起こしたことは予想外の結果であった。この毒性について調べたところ、腎臓に異常が検出された。近位尿細管が膨満し、内皮細胞が剥離する障害が観察された。この障害は PPARalpha ノックアウトマウスに多量のアルブミンを腹腔内注射した時に生じるネフローゼ様障害に類似している。MK886 または その代謝産物が尿排泄される際に、腎臓糸球体・近位尿細管・遠位尿細管・集合管に濃縮され、特に、近位尿細管細胞内の PPARalpha 機能を阻害するため脂肪酸代謝が抑制され、再吸収機構が破綻したものと推測された。従って、MK886 自体は肝発癌を抑制する新薬としては不適切な化合物であるが、PPARalpha 結合部分を保持したうえで、疎水性構造を付加することにより腎排泄から胆汁排泄に切り替えることは容易と思われる。これにより、腎臓集積を避け、肝臓滞留時間を増加出来れば、肝発癌を抑制する新薬となりうる可能性を持つものと思われる。

MK886 を 10 mg/kg/日投与した場合、4 mg/kg/日投与した場合よりも肝発癌頻度が低下し、HCC サイズが明らかに小型になることが確認された。40 mg/kg/日投与の場合に生じる腎障害も明瞭には生じなかった。本研究の試みの中で、カロリー制限食実験が行われ、この場合も、肝発癌頻度が有意に低下し、かつ、HCC サイズの小型化が観察された。カロリー制限食実験では肝臓の中性脂肪量が低下することから、核内 PPARalpha の配位子濃度が低下するため、PPARalpha 活性化が抑制されるという機構が想定される。上述した機構の異なる MK886 投与とカロリー制限食の併用により、より安価でリスクの小さい肝発癌阻止法が創出できることを期待している。

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 7 件)

- ① Kamijo Y, Wang LX, Matsumoto A, Nakajima T, Hashimoto K, Higuchi M, Kyogashima M, Aoyama T, Hara A: Long-term improvement of oxidative stress via kidney transplantation ameliorates serum sulfatide levels. Clin Exp Nephrol 16: 959-967, 2012. DOI: 10.1007/s10157-012-0634-2
査読あり
- ② Sheng XN, Nakajima T, Wang LX, Zhang XW, Kamijo Y, Takahashi K, Tanaka N, Sugiyama E, Kyogashima M, Aoyama T, Hara A: Attenuation of kidney injuries maintains serum sulfatide levels dependent on hepatic synthetic ability: a possible involvement of oxidative stress. Tohoku J Exp Med 227: 1-12, 2012. DOI: 10.1620/tjem.227.1
査読あり
- ③ Hashimoto K, Kamijo Y, Nakajima T, Harada M, Higuchi M, Ehara T, Shigematsu H, Aoyama T: PPARα activation protects against anti-Thy1 nephritis by suppressing glomerular NF-κB signaling. PPAR Res 2012: 976089, 2012. doi: 10.1155/2012/976089
査読あり
- ④ Kimura T, Nakajima T, Kamijo Y, Tanaka N, Wang L, Hara A, Sugiyama E, Tanaka E, Gonzalez FJ, Aoyama T: Hepatic cerebroside sulfotransferase is induced by PPARα activation in mice. PPAR Res 2012: 174932, 2012.

doi: 10.1155/2012/174932

査読あり

- ⑤ Wakabayashi M, Kamiyo Y, Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Tian YY, Kimura T, Aoyama T:

Fatty acid accumulation and resulting PPAR α activation in fibroblasts due to trifunctional protein deficiency.

PPAR Res 2012: 371691, 2012.

doi: 10.1155/2012/371691

査読あり

- ⑥ Nakagawa T, Ramdhan DH, Tanaka N, Naito H, Tamada H, Ito Y, Li YF, Hayashi Y, Yamagishi N, Yanagiba Y, Aoyama T, Gonzalez FJ, Nakajima T:

Modulation of ammonium perfluorooctanoate-induced hepatic damage by genetically different PPAR α in mice.

Arch Toxicol 86: 63-74, 2012.

doi: 10.1007/s00204-011-0704-3

査読あり

- ⑦ Nakagawa K, Tanaka N, Morita M, Sugioka A, Miyagawa S, Gonzalez FJ, Aoyama T:

PPAR α is down-regulated following liver transplantation in mice.

J Hepatol 56: 586-594, 2012.

doi: 10.1016/j.jhep.2011.08.021.

査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 俊文 (AOYAMA TOSHIFUMI)
信州大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 50231105

(2) 研究分担者

原 厚 (HARA ATSUSHI)
信州大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 70126697