

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K15790  
研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝疾患を背景にした肝癌研究（新規モデルの作成および化学予防）  
  
研究課題名（英文）Liver cancer research in non-alcoholic fatty liver disease  
  
研究代表者  
本多 靖（HONDA, Yasushi）  
  
横浜市立大学・医学部・助教  
  
研究者番号：00784844  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、ヒトNAFLD/NASHに近いモデルある食餌負荷モデルであるAMLN modelを用い、肥満、インスリン抵抗性、肝線維化を認める新たな肝発癌モデル（DEN+AMLN model）を作成した。肝化学発癌剤であるDiethylnitrosamineを使用し、マウスはB6C3F1マウスを使用した。NAFLDの治療薬として期待されているSGLT2阻害薬やPPAR $\alpha$ を用いて化学予防の検討を行い、また食事内容の違いによる発がんの違いを検討した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性肝がんの約90%を肝細胞癌が占め、その多くはB型およびC型肝炎ウイルスによるものである。近年、ウイルス性肝炎のない非B非C肝癌が増加しており、NASH由来の肝細胞癌が原因と考えられている。NAFLD/NASHの病態は未だ不明な部分も多く、NASH由来の肝細胞癌についても同様である。我々はこれまでにNASHのマウスモデルを用いて、NASHの薬物治療について検討を行ってきた。近年、ウイルス性肝炎のない非B非C肝癌が増加しており、この背景にはNAFLDの増加が原因と考えられており、その対応が急務である。

研究成果の概要（英文）：We developed a new hepatocarcinogenesis model (DEN+AMLN model) with obesity, insulin resistance, and liver fibrosis using the AMLN model, which is a food-induced model similar to the human NAFLD/NASH. We used the liver chemo-carcinogen diethylnitrosamine and B6C3F1 mice for chemoprevention using SGLT2 inhibitors and PPAR $\alpha$ , which are potential therapeutic agents for NAFLD, and also examined differences in carcinogenesis due to differences in diet.

研究分野：NAFLD

キーワード：NAFLD NASH HCC

## 1. 研究開始当初の背景

NAFLD は、飲酒歴がないにも関わらずアルコール性肝疾患に類似した組織像を呈し、NAFL から NASH、さらに NASH から進展した肝硬変、肝細胞癌までを包括する広範な疾患概念である。NAFL は肝臓に脂肪沈着のみを認める予後良好な疾患であり、NASH は NAFLD の中で 10~20% を占め、10 年の経過で約 20% が肝硬変へと進展し、時に肝細胞癌をも発症する進行性の疾患である。NAFLD の病態は多岐にわたるが、複数の因子が相互に関連しながら関与しているとされる。NAFLD の発症・進展機序として、Day らの two hit theory が広く受け入れられてきた (Day 2002)。Two hit theory は、肥満やインスリン抵抗性などによる肝臓への脂肪沈着 (1st hit) をきたすことで NAFL となり、インスリン抵抗性、酸化ストレス、脂質過酸化、腸内細菌由来のエンドトキシン、炎症性サイトカイン、アディポカイン、遺伝因子などが肝障害を進展させ、肝細胞に炎症細胞の浸潤や線維化が起こり (2nd hit)、NASH に至るといったものである。しかしながら、炎症が肝脂肪化に先行している場合もあり、two hit theory では NAFLD の病態を説明できない点が存在する。Tilg らは上記の多くの因子が、段階的にではなく並行して肝臓に作用し、NAFLD 発症・進展に関与しているという multiple parallel hits という説を提唱し (Tilg and Moschen 2010)、この説が支持されていく傾向である。しかしながら、NAFLD の全ての病態を解明するには至っていない。

我が国の原発性肝癌の約 90% を肝細胞癌が占め、そのほとんどの割合を B 型および C 型肝炎ウイルスが占めてきた。近年、ウイルス性肝炎のない非 B 非 C 肝癌が増加しており、この背景には NAFLD の増加が原因と考えられている。糖尿病や肥満者の増加とともに NAFLD 患者の増加が認められており、2012 年に Eguchi らは日本における NAFLD の有病率は 29.7% と報告している (Eguchi, et al. 2012)。NASH の有病率については肝生検患者のセレクトションバイアスなどの問題があり、いまだ正確には把握できていないが、近年では人口の 3~5% と推定されている。日本における NAFLD は 2000 万人以上、NASH は 200 万人以上と想定することができ、この数は年々増え続けていくと想定され、この増加に伴い NAFLD を背景とした非 B 非 C 肝癌も増加すると考えられており、その対応が急務である。

## 2. 研究の目的

NAFLD/NASH モデルについては、様々なマウスモデルが報告されているが、我々の中でも食餌負荷モデルである Amylin Liver NASH model (AMLN model) に着目している。これまでに AMLN model を使用し、NASH に対する新規治療薬について検討を行ってきた (Honda, et al. 2017; Honda, et al. 2016)。AMLN model の特徴は、遺伝子の変異がなく、食餌負荷 (高脂肪・高フルクトース・コレステロール添加食) のみで、肥満、インスリン抵抗性、肝脂肪化、肝線維化といったヒトに類似した NASH を発症する点である (Clapper, et al. 2013)。ob/ob マウスや db/db マウスのような遺伝子変異がなく、ヒト NAFLD/NASH の特徴とされる肥満やインスリン抵抗性を認めない MCD (methionine choline deficient diet) モデルとも異なり、AMLN model はよりヒトの病態に近いと考えられるモデルである。

非臨床試験における肝癌研究では、肝化学発癌剤であるジエチルニトロサミン (DEN: Diethylnitrosamine) が頻用されている。Park らは、DEN と高脂肪食 (HFD: High Fat Diet) を使用し、肥満が肝発癌に関連することを報告している (Park, et al. 2010)。しかしながら、DEN + HFD モデルでは、ヒトの NAFLD/NASH に重要である肝線維化がほぼ生じないという問題点があり、ヒトの NAFLD/NASH に近いモデルとは言いがたい。我々は、よりヒト NAFLD/NASH に近いモデルある AMLN model を用い、肥満、インスリン抵抗性、肝線維化を認める新たな肝発癌モデル (DEN+AMLN model) を作成し、世界中で危惧されている NAFLD を背景とした非 B 非 C 肝癌の化学予防について検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) AMLN model は、高脂肪・高フルクトース・コレステロール添加食を負荷したモデルである。20 週以上の負荷で肥満、インスリン抵抗性、肝脂肪化および肝線維化を認めるモデルある (Clapper, et al. 2013)。我々は C57BL/6J マウスおよび AMLN-model を用いて、NASH の薬物治療について報告してきた (Honda, et al. 2017; Honda, et al. 2016)。DEN の使用の際には様々なプロトコルが存在するが、生後 2 週で 25mg/kg を腹腔内投与する方法を、本研究では用いている。生後 2 週で DEN25mg/kg を腹腔内投与し、生後 4 週より食餌負荷、生後 24 週で評価を行い、肝発癌を認めた。肝発癌研究の困難さにおいて、その実験期間の長さは 1 つの問題とされる。Park らの報告では生後 36 週で肝発癌を認めているが、既存の報告より約 3 か月早い生後 24 週という期間で肝発癌が得られた。本研究では、DEN+AMLN model というヒトの病態に近い新規の肝発癌モデルを用いて、非 B 非 C 肝癌の化学予防について検討する。

(2) 既報では、肝発癌の評価は肉眼的に発生率、大きさ、個数で評価されてきた。しかしながら、上記検討を行った際に肉眼的に評価できない、つまり肝内に存在し肝表面に姿を

現わさない肝癌を評価していないことは問題があると考えている。我々は造影剤 (ExiTron nano 60000) を用いて、CT にて肝癌評価を行っている。本研究で用いている造影剤は、クッパー細胞に取り込まれるもので、肝癌では造影剤が取り込まれずに LDA として描出される。実際に造影剤を用いた検討で、肝表面にない肝内の肝癌を認識することが可能であった。本研究では、造影 CT を用いての発癌率、大きさ、個数といった肝発癌評価を行う予定である。また、CT で評価する場合は経時的評価も可能であり、肝発癌の経過を追うことができると考えている。

(3) NAFLD/NASH の病態には様々な因子が存在する。我々はこれまでに、糖尿病治療薬である選択的 SGLT2 阻害薬、脂質異常症治療薬である Pemafibrate について NASH 治療における有用性を報告してきた。新規治療薬を創造することは言うまでもなく重要であるが、費用面や安全面、研究期間を考慮し、本研究では既存の治療薬を用いて非 B 非 C 肝癌の化学予防について検討する予定である。中でも糖尿病治療薬であるメトホルミンや DPP4 阻害薬、SGLT2 阻害薬、脂質異常症治療薬である pemafibrate、抗酸化剤であるグルタチオンなどを用いて、本研究で開発したモデルを使用し、肝発癌の化学予防について検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 予備検討により、生後 2 週で DEN25mg/kg を腹腔内投与し、生後 4 週より食餌負荷、生後 24 週で評価を行い、肝発癌を認めた。しかしながら、生後 2 週のマウスを確保することの困難さがあり、予定していたプロトコールを断念せざるを得なかった。B6C3F1 マウス (C57BL/6J 3 C3H/HeJ hybrid) を用いて、DEN を生後 6,7,8,10,11,12 週に 45mg/kg 投与し、生後 5 週より ALMLN 食を負荷するプロトコールに変更し、研究を行った。発癌することが確認できたが、結果が出るまでには至らなかった。

(2) 当初マウス用の造影 CT を施行し、発癌の有無を評価する予定であった。しかしながら、どの大きさから発癌とするのか、何の画像所見を持って癌と診断するのか、造影 CT を行う上での課題も山積みであった。現時点では最初に立ち戻り、肉眼的に確認できる癌の数、大きさ、体積を評価することとした。

(3) 上記 のプロトコールに変更し、発癌は確認できた。また、 の評価方法を行う方針とした。化学予防を行うべく SGLT2 阻害薬、Pemafibrate を使用した検討を行っているが結果を得るには至っていない。また、AMLN-diet という食事負荷モデルであるが、AMLN 以外の食事に負荷による発癌の有無の違いも検討していたが、こちらの検討も結果を得るには至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------