

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590790
 研究課題名（和文） 脂肪性肝炎からの肝発癌における抗酸化酵素 SOD1 の役割
 研究課題名（英文） The role of anti-oxidative enzyme SOD1 on the development of hepatocellular carcinoma from steatohepatitis

研究代表者

齋藤 英胤（SAITO HIDETSUGU）

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：80186949

研究成果の概要：

SOD1 K/O ヘテロ K/O マウスという酸化ストレスに弱いマウスを使い、様々な方法で脂肪化、線維化、発癌を惹起し、抗酸化剤の抑制効果を検討した。その結果、脂肪化の進展と線維化は相関しないこと、SOD1 活性の低下に連れて肝細胞傷害が惹起すること、肝内の抗酸化酵素は特定の酵素活性が弱くなるとそれを補うように他の酵素活性が上昇する「補填効果」を生ずることが示唆された。また DEN 濃度による多方向性分化細胞の存在が認められた。今後ホモ K/O マウス供給の目処がたち SOD-1 の作用についてはさらに明らかになる予定である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：SOD K/O マウス、酸化ストレス、高カロリー（高脂肪）食、レスベラトロール、DEN、四塩化炭素、胆管細胞癌、多方向性分化細胞

1. 研究開始当初の背景

わが国の急激な高齢化は世界主要国のなかで群を抜いており、5人に1人が65歳を超える社会となった。福祉や介護を含めた医療費は、少子化による生産人口の減少と、生活習慣病による健康寿命の伸び悩みにより膨れ上がる一方である。この問題を解決することは急務であり、少なくともわれわれ医療人は、健康寿命の延長を推進する責任がある。

近年、メタボリックシンドロームあるいは

内臓脂肪症候群と呼ばれる病態が、生産人口の男子に特に多く認められ、この病態を中心に様々な疾患が生ずることがわかってきた。そしてこの病態が、健康寿命を脅かす最も重大な問題であることが認識されるようになり、内臓脂肪蓄積に基づく疾患の是正は重要な課題となってきた。この中で消化器領域においては、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）なる疾患が注目されるようになったが、本疾患をもとに肝硬変への進展、さらに肝発癌に至

ることが判明して、重大な問題となっている。われわれも早くからNASHの発癌例に遭遇し (Saito H, et al. Intern Med 1997) 様々な考察をしてきた。

NASHは通常、脂肪肝から進展するが、その進行には、セカンドヒットと称される何らかの刺激が必要とされ、その一つの候補に活性酸素あるいは酸化ストレスが考えられてきたが、その詳細なメカニズムはいまだ不明である。肝臓は活性酸素を産生する大きな臓器である一方、酸化ストレスに対して抗酸化物質を多く保持する臓器であることを述べてきたが (齋藤英胤, 他. 日本消化器病学会雑誌2006) 中でもsuperoxide dismutase (SOD)1は肝臓に存在する重要な抗酸化酵素である。申請者は現在、慶應義塾大学医学部眼科学教室坪田一男教授、東京都老人研究所白澤卓二教授との共同でSOD1 ノックアウト (K/O) マウスにおける肝発癌を観察中である。このSOD1 K/Oマウスでは通常飼料でも脂肪肝をきたすとの報告があるが (Elchuri S, et al. Oncogene 2005)、詳細は不明である。また、眼科領域では人の老化に伴って生ずる「網膜色素変性症」と同一の変化がこのマウスに生ずることから (Imamura H, et al. Proc Natl Acad Sci 2006)、酸化ストレスを除去できないことが、ある種の臓器では老化のフェノタイプを生ずることが判明した。

一方、近年、糖尿病が肝発癌の重要な因子であることが疫学的に判明してきた (Caldwell SH et al. Gastroenterology 2005; Gonzalez L et al. Semin Liver Dis 2004; Kiyosawa K, et al. Gastroenterology 2004他)が、さらにインスリンシグナルとNASH肝発癌を示唆する報告が行われた (Horie Y, et al. J Clin Invest 2004)。また一方、カロリー制限による老化遅延、寿命延長効果は1935年のMcCayらの報告以来、種を超えた現象と考えられてきたが、特に線虫の研究により、この過程にインスリンシグナルが関与することが明らかとされた。

NASHの発癌においては以上のように、インスリンシグナル、酸化ストレスが重要な因子となることが推定される。カロリー制限による代謝活性の低下は、活性酸素発生量を低下させ、そのことが老化遅延につながるという意見もある。SODの過剰発現により、寿命の延長がみられることはこの仮説を支持するものである。しかし、現在までに肝発癌における

酸化ストレス、その消去系であるSOD1とインスリンシグナルの関係についてはよく知られていない。また、同じ過栄養によるアルコール性脂肪肝炎 (ASH) においてもNASHと同様の自然史を経過し、肝発癌を生ずると考えられているが、両者の違いについても詳細は不明である。ウイルス感染の多い日本では、ウイルスの関与しない純粋な肝発癌が少なく、果たして飲酒だけで肝発癌が起こるかも定かではない。

2. 研究の目的

本研究全体ではSOD1 K/O マウスを用いて、肝発癌における酸化ストレスの関与を探索する。また抗酸化酵素薬の左葉を検索する。

3. 研究の方法

SOD K/O マウスという酸化ストレスに弱いマウスを使い、様々な方法で脂肪肝肝線維化 肝発癌を惹起し、SOD-1 の欠損あるいは活性低下がそれらに及ぼす影響を観察し、さらに抗酸化剤の抑制効果の検討を重ねている。

ヒトの慢性肝炎の忠実な動物モデルはないために、様々な方法で肝内に慢性炎症、線維化、脂肪化を作成することを試みている。マウス疾患モデルとしては、四塩化炭素高カロリー (高脂肪) 食およびレスベラトロール併用投与 DEN (Diethylnitrosamine) を考えており、対照マウス、およびヘテロマウスには同様の処置を行い、どのような変化が生ずるかを検討する。具体的には病理学的検査、各種蛋白の免疫組織、蛋白発現量の比較、酸化ストレス状態の評価 (8-OHdG, 4HNE など)、real-time PCR による転写量の比較等を行う。は活性酸素傷害の影響と何らかの補填効果を見るために行い、は発癌に関する検討のために行う。SOD1 ノックアウトの効果を十分に発揮させるためにワイルドマウスではほとんど変化のない刺激濃度を設定する。薬物の投与方法は以下の通りである。

(1) 四塩化炭素

5%四塩化炭素 in olive oil 500 ul/kg 週2回投与

(2) 脂肪食およびレスベラトロール

CRF-1 飼料 / CRF-1+ラード飼料 / CRF-1+ラード+レスベラトロール飼料の3者飼育による肝臓の変化

(3) DEN

50 mg/l 濃度の飲水

(1) SOD-1 K/O マウスの飼育

マウスの飼育等は当施設の動物実験倫理規定に従い飼育される。

K/O マウスは既に当施設にて維持されているが、本ホモマウスの雌は不妊であることから、K/O マウスを得るにはヘテロマウス同士の掛け合わせを行うしかない。この状況化で繁殖を試みているが、なかなかマウスを得られていない状態である。同じ週齢で同時期に多くのマウスを得るために工夫が必要である。研究を進めるためには、雄または雌として月に 20 匹程度のマウスが必要となることから、産仔は最低で 40 匹必要で、1 組の掛け合わせで得られる産仔の数が平均 5 匹、交配マウスの 70% が妊娠、と仮定して体外受精に頼らざるを得ないと結論された。

体外受精により 400 個程度の 2 細胞を得て、それを 15 匹程度のレシピエントマウスに移植 1 レシピエントより 5 匹産仔を得るとして同じ性の産仔は約 30 匹。

さらに体外受精により 240 個程度の 2 細胞を得て、8 匹のレシピエントに移植すれば約 40 匹程度の産仔が得られ、その半数は同性と考えられる。

この体外受精に関しては、専門業者に受託依頼。

(2) われわれは以前、肝局所の AT 系シグナルの亢進が肝脂肪化、肝線維化を助長し、その遮断は発癌抑制にも繋がり、さらに Rho kinase がそのシグナルの下流で重要な役割を果たしていることを見出した (Tada S, Saito H ら 2003; Kitamura K, Saito H ら J Gastroenterol Hepatol 2007) が、K/O マウスにおいて AT 系の阻害やレチノイン酸の作用が発癌の抑制に働くかを明らかとする。

(3) 活性酸素・消去系では、グルタチオン、レチノイン酸シグナル、AT 系が肝内に存在する。外界からの抗酸化物質の投与がない状態で、SOD1 欠損をこれら他の抗酸化物質が補えるかどうかを明らかにすることも重要である。また炎症や TNF α などサイトカインの果たす役割も大きく (Tomita K, et al. Gut 2006; Nakamoto N, et al. Free Radic Res 2003)、できればこれらの関与についても検討する。

(4) Elchuri らの報告では、SOD-1 K/O にて通

常食での 2 年以上の飼育で肝発癌をみたしているが、申請者らの検討では、HCC とは診断できない組織であり、まだこのマウスの自然史も解明されていない。インスリンシグナルの過程を検討することにより、過剰カロリー摂取状態で SOD K/O マウス肝におけるこれらのシグナルは対照マウスと比較してどう変化しているのが調べられる。

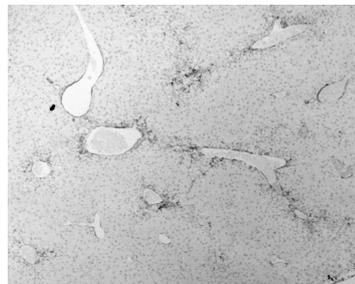
4. 研究成果

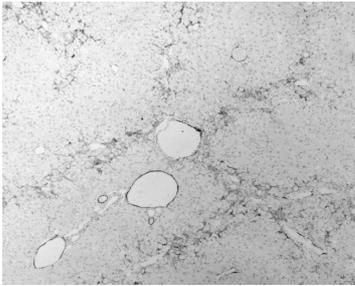
どのモデルも長期間の薬剤投与と観察が必要であり、マウスの供給数との兼ね合いから少しずつ匹数を重ねていくより仕方がない状況であり、研究の完遂までは時間がかかる作業である。

(1) 四塩化炭素モデル

組織変化 / 酵素変化

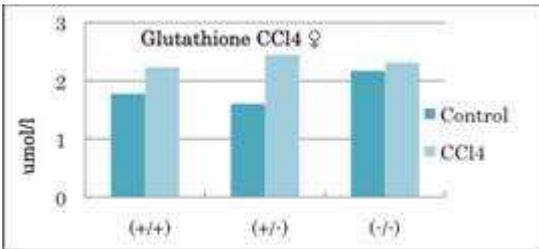
SOD-1 の活性に従い線維化の程度が低下 (欠損すると線維化が強くなる) することがわかったが、脂肪化の程度には差は認められず、線維化の進展と脂肪化の進展には異なる機序が想定され、脂肪化が進むと直接、線維化が惹起されるわけではないことが明らかとなった。この状態では、SOD1 が低下するに連れて肝逸脱酵素である AST や ALT は上昇する成績が出ている。以下に Wild mouse / Hetero mouse / K/O mouse の順に組織変化を示す。





グルタチオン活性 / SOD活性

四塩化炭素投与実験系において、肝内のグルタチオン活性を測定すると、SOD1 が低下するに連れてグルタチオン活性が上昇していた。また、四塩化炭素を投与するとグルタチオン活性が上昇することから、肝内の抗酸化酵素はある特定の酵素活性が弱くなるとそれを補うように他の抗酸化酵素活性が上昇する「補填効果」を生じていることが考えられた。ただしノックアウトマウスでは四塩化炭素投与後に十分な活性の上昇は見られていないために補填効果もある程度以上には働かない可能性が考えられる。



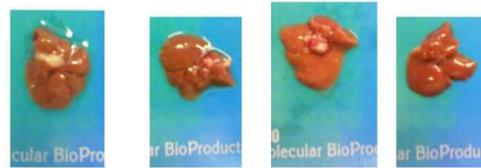
SOD1, 2に関しては、まだワイルドとヘテロマウスの肝臓をアッセイした状況であるが、ヘテロマウスの肝臓ではSOD1+SOD2活性がワイルドに比べて亢進しているため、SOD2の活性がグルタチオンと同様に「補填効果」にて上昇している可能性が示唆されている。

(2) 高脂肪食およびレスベラトロールの併用効果について

Elchuriらの報告によれば2年間の通常飼料投与実験にて肝臓に悪性腫瘍が発生することであるが、われわれが4年前に観察した高齢マウスでは、悪性腫瘍と呼べる病変は存在しなかった (hyperplasiaではないか?)。現在、高齢マウスを観察中である。

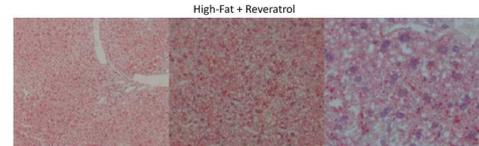
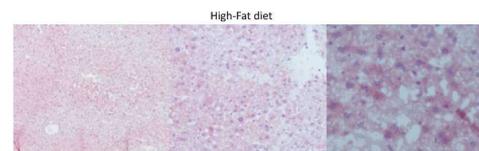
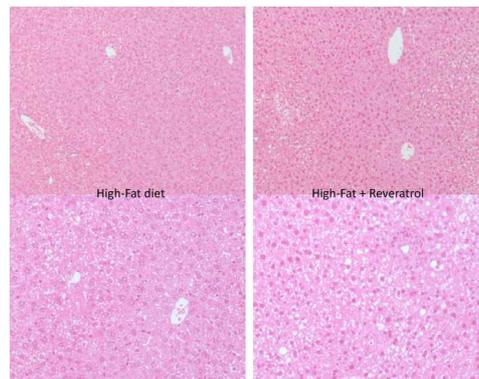
われわれは高脂肪食をSOD1 K/Oに与えると悪性腫瘍の発生が早まるのではないかと考え、その際に起こる炎症や線維化を追求している。2か月までの観察では腫瘍の発生はみられていないため、現在、6か月投与を行い観

察予定である。



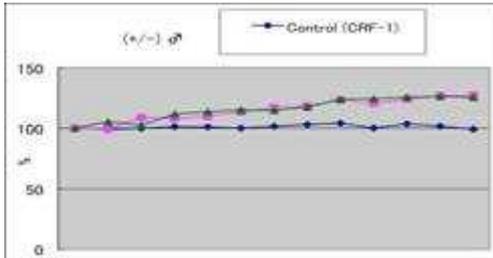
飼料の種類	High fat diet (lard 20%)		0.04% Resveratrol + High fat diet (lard 20%)	
4-21-08時の肝臓の重さ(g)	1.3	1.22	1.36	1.65
マウス重量	27.2	25.1	29.1	29.7
肝臓/体重	4.78%	4.88%	4.67%	5.56%

これらの飼料と同時に、カロリー制限を行った際に発現するSirtuin遺伝子の刺激物質であるレスベラトロールを同時投与して、脂肪食の影響にどのように拮抗するのかを検討している。高脂肪食による脂肪肝に対してレスベラトロールが拮抗して脂肪肝を改善することはBaurらがNatureに発表して話題をさらったが、残念ながらわれわれのか月の投与では、同様の結果が得られていない。



Serum Transaminase levels

	High fat diet (lard 20%)		0.04% Resveratrol + High fat diet (lard 20%)	
	#34 B6J +/- ♀	#35 B6J +/- ♀	#27 B6J +/- ♀	#19 B6J +/- ♀
GOT (IU/L)	5730	254	1580	681
GPT (IU/L)	490	34	165	85
溶血	(4+)	(+)	(4+)	(+2)



これらの図に示すように期待に反して高脂肪食群に比較してレスベラトロール併用群の方が肝内の脂肪が増加していた。しかし血清トランスアミナーゼ値に関しては併用群の方が低下していた。そのため、現在6か月投与ではどうかを検討しているところである。今後、同様の結果が出る場合には飼料の種類等を再検討しなければならない。マウスの体重変化からは高脂肪食群と併用群に差は認められていなかった。

以上の系は、今後、ノックアウトマウスに行う予定である。

(3) DEN投与系

DENは慢性投与により肝臓内に腫瘍を発生することが知られている。今回はノックアウトマウスの供給が足りずに、ノックアウトマウスでの検討はできていない。

通常投与の1000倍量の濃度で投与したところ、マウスは投与2週間位から死亡するケースが増えた。これらのマウスの肝臓では予想に反して肝細胞癌ではなく、胆管細胞癌様の腫瘍が発生していた。

多方向性分化細胞の存在と、それに対するDENの濃度による異なる作用が認められ、大変興味深い。現在病理と共同で解析中である。

以上の研究全般に関して、今後 SOD1 ホモ K/O マウス供給の目処がたち、SOD1 の作用に関する検討は今後の更なる研究に依るものである。

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10件)

S. Tada, H. Saito, H. Ebinuma, K. Ojiro, Y. Yamagishi, N. Kumagai, Y. Inagaki, T. Masuda, J. Nishida, M. Takahashi, H. Nagata, T. Hibi. Treatment of hepatitis C virus with peg-interferon and ribavirin combination therapy significantly affects lipid metabolism. *Hepatol. Res.* 39(2), 195-199, 2009 (査読有)

T. Nishimura, T. Azuma, A. Yokoyama, H. Ochiai, H. Saito, T. Hibi. New mechanism of transforming growth factor-beta signaling in hepatoma: Dramatic up-regulation of tumor initiating cells and epidermal growth factor receptor expression. *Hepatol. Res.* 39, 501-509, 2009 (査読有)

A. Takeda, M. Takahashi, E. Kunieda, T. Takeda, N. Sanuki, Y. Koike, K. Atsukawa, T. Ohashi, H. Saito, N. Shigematsu, A. Kubo. Hypofractionated stereotactic radiotherapy with and without transarterial chemo-embolization for small hepatocellular carcinoma not eligible for other ablation therapies: Preliminary results for efficacy and toxicity. *Hepatol. Res.* 38(1), 60-68, 2008 (査読有)

A. Khan, Y. Tanaka, H. Saito, H. Ebinuma, H. Sekiguchi, H. Iwama, G. Wakabayashi, T. Kamiya, F. Kurbanov, A. Elkady, M. Mizokami. Transmission of hepatitis B virus (HBV) genotypes among Japanese immigrants and natives in Bolivia. *Virus Res.* 132(1-2), 174-180, 2008 (査読有)

M. Nakamura, H. Saito, M. Ikeda, S. Tada, N. Kumagai, N. Kato, K. Shimotohno, T. Hibi. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J. Med. Virol.* 80(4), 632-663, 2008 (査読有)

K. Ojiro, M. Naganuma, H. Ebinuma, H. Kunimoto, S. Tada, H. Ogata, Y. Iwao, H. Saito, T. Hibi. Reactivation of hepatitis B in a patient with Crohn's disease treated using infliximab. *J. Gastroenterol.* 43(5), 397-401, 2008 (査読有)

M. Nakamura, H. Saito, T. Hibi. Advances in henomic research on hepatitis C virus with a useful tool, replicon system. Keio J. Med. 57(2), 75-83, 2008 (査読有)

M. Takahashi, H. Saito, M. Higashimoto, T. Hibi. Possible Inhibitory Effect of Oral Zinc Supplementation on Hepatic Fibrosis Through Downregulation of TIMP-1: A Pilot Study. Hepatol. Res. 37, 405-409, 2007 (査読有)

N. Kumagai, F. Kaneko, S. Tsunematsu, K. Tsuchimoto, S. Tada, H. Saito, T. Hibi. Complexity of the HVR-1 quasispecies and disease activity in patients with hepatitis C. Eur. J. Clin. Invest. 37, 566-572, 2007 (査読有)

K. Kitamura, S. Tada, N. Nakamoto, K. Toda, H. Horikawa, S. Kurita, S. Tsunematsu, N. Kumagai, H. Ishii, H. Saito, T. Hibi. Rho/Rho kinase is a key enzyme system involved in the angiotensin II signaling pathway of liver fibrosis and steatosis. J. Gastroenterol. Hepatol. 22, 2022-2033, 2007 (査読有)

[学会発表](計 7件)

菊池真大、富田謙吾、中原理紀、北村直人、寺谷俊昭、押川哲也、鈴木貴博、齋藤英胤、日比紀文. ^{99m}Tc -フチン酸シンチグラフィ検査を用いたNASH診断の有用性に関する検討. 第95回日本消化器病学会総会(口演) 2009/5/7 札幌

尾城啓輔、齋藤英胤、日比紀文. 体成分分析装置によるHCC治療前後での入院患者の体成分パラメータ分析. ワークショップ「肝疾患と栄養(NASHを含めて)」第37回日本肝臓学会東部会 2008/12/3-4 東京

菊池真大、山岸由幸、尾城啓輔、海老沼浩利、多田慎一郎、堀江義則、齋藤英胤、加藤真三、日比紀文. 非B非Cアルコール性肝疾患における過形成性結節と肝細胞癌の鑑別. 第37回日本肝臓学会東部会 2008/12/3-4 東京

堀江義則、山岸由幸、菊池真大、齋藤英胤、加藤真三、石井裕正、日比紀文. アルコール性肝硬変の進展に関与する因子の検討. 第28回日本アルコール医学生物学研究会 2008/9/15-16 横浜

西村 健、東 俊文、齋藤英胤、日比紀文. 肝癌幹細胞におけるTGF-betaシグナルの二面性-細胞動態・遺伝子プロファイルの観点から. 第44回日本肝臓学会総会 2008/6/5-6 愛媛

菊池真大、海老沼浩利、山岸由幸、尾城

啓輔、金森英彬、富田謙吾、多田慎一郎、堀江義則、齋藤英胤、加藤真三、日比紀文. 肝線維化の定量的測定におけるElastometerの有用性. 第94回日本消化器病学会総会 2008/5/8-10 福岡
熊谷直樹、杉野陽子、渡辺紗希子、戸田京子、金子文彦、常松令、土本寛二、齋藤英胤、日比紀文. マウスNASHモデルにおける亜鉛の抗線維化作用に関する検討. 第11回日本肝臓学会大会(JDDW2007) 2007/10/17-20 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 英胤(SAITO HISETSUGU)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 80186949

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

坂元 亨宇(SAKAMOTO MICHIEE)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40221270

坪田 一男(TSUBOTA KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 401638780

(4) 研究協力者

高野 華久子(TAKANO KAKUKO)
慶應義塾大学・医学部・研究助手