

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 24年 5月 21日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590865

研究課題名（和文）酸化アルブミン制御による肝発癌抑制効果の検討

研究課題名（英文）Effects of redox state of albumin on hepatocarcinogenesis

研究代表者

佐田 通夫（SATA MICHIO）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：10162398

研究成果の概要（和文）：アルブミンは酸化還元状態から「還元型アルブミン」と「酸化型アルブミン」に分類され、抗酸化作用のない酸化型アルブミンの増加は肝発がんに関与すると考えられる。本研究の目的は、1) 肝がんの発症母地である肝硬変におけるアルブミンの酸化還元状態、および2) 臨床応用が可能な酸化アルブミンの還元法を開発することである。1) 79名の慢性肝疾患患者を対象に血中酸化アルブミンを測定したところ、Child-Pugh分類の進行にともない酸化アルブミンの割合が上昇した（慢性肝炎 $28.3 \pm 1.1\%$ 、Child-Pugh A $33.5 \pm 1.2\%$ 、Child-Pugh B and C $37.8 \pm 1.3\%$ ）。また、酸化アルブミンはMELD (model for end-stage liver disease) score との間に有意な正の相関を認めた ($R^2=0.336$, $P<0.001$)。2) 抗酸化剤（システイン）を含有するグリチルリチン酸製剤を酸化アルブミンに添加することにより、有意に還元型アルブミンが増加した ($27.7 \pm 0.18\%$ vs. $78.7 \pm 0.36\%$; $P<0.01$)。また、経時的な検討では、グリチルリチン酸製剤添加15分後に還元型アルブミンは有意に増加した。本研究により、慢性肝疾患の病期進展にともない酸化型アルブミンが増加することが明らかとなった。また、我々は、グリチルリチン酸製剤による酸化型アルブミンの還元法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Albumin exists in both oxidized and reduced forms. Since oxidized albumin shows lower anti-oxidative effects, an increase in oxidized albumin seems to be associated with hepatocarcinogenesis. The aims of this study are 1) to investigate changes in redox state of albumin in patients with chronic liver disease and 2) to develop a reducing method for oxidized albumin. 1) The oxidized albumin rate was significantly increased by the severity ($n=79$, chronic hepatitis $28.3 \pm 1.1\%$, Child-Pugh A $33.5 \pm 1.2\%$, Child-Pugh B and C $37.8 \pm 1.3\%$). Furthermore, the oxidized albumin rate was significantly correlated with MELD score ($R^2=0.336$, $P<0.001$). 2) By treatment with a glycyrrhizin agent, reduced albumin rate was significantly increased ($27.7 \pm 0.18\%$ vs. $78.7 \pm 0.36\%$; $P<0.01$). The percentage of reduced albumin reached its peak at 15 min after treatment with a glycyrrhizin agent. This study showed that the oxidized albumin rate was significantly increased by disease progression. In addition, we have developed a reducing method for oxidized albumin by using a glycyrrhizin agent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：酸化型アルブミン・還元型アルブミン・肝細胞癌・酸化ストレス・グリチルリチン酸製剤

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の主な原因であるウイルス性慢性肝疾患、アルコール性肝疾患、非アルコール性肝疾患では様々な機序で酸化ストレスが増加することで肝発がんが引き起こされる。このため、生体内最大の抗酸化物質であるアルブミンは肝発がんに関与していると考えられる。

アルブミンは、N末端から34番目のSH基がフリーの状態が存在する「還元型アルブミン」と、SH基にシステインやグルタチオンが結合した「酸化型アルブミン」とに分類される。抗酸化作用のない酸化型アルブミンの増加は慢性疾患の病期進展に関与すると考えられるが、その関連は未だ不明である。また、酸化型アルブミンは抗酸化作用を有する還元型アルブミンに可逆的に変化する事が報告されているが、臨床応用が可能な酸化アルブミンの還元法も未だ検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 肝がんの発症母地である肝硬変におけるアルブミンの酸化還元状態、および 2) 臨床応用が可能な酸化アルブミンの還元法を検討することである。

3. 研究の方法

1) 肝硬変におけるアルブミンの酸化還元状態の検討

79名の慢性肝疾患患者を対象に、血中酸化型アルブミンと還元型アルブミンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて測定した (図1)。

還元型アルブミン (青矢印)

酸化型アルブミン (赤矢印)

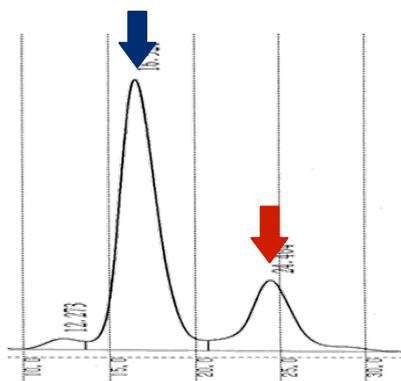


図1. HPLCによる還元型・酸化型アルブミンの評価

対象者の背景因子および血液生化学検査結果から、Child-Pugh 分類および MELD (model for end-stage liver disease) score を評価し、酸化アルブミンとの関連を検討した。

2) 酸化アルブミンの還元法の検討

抗酸化剤であるシステインを含有し、慢性肝疾患患者に投与可能であるグリチルリチン酸製剤のヒト酸化アルブミンに対する還元能を評価した。

4つの異なるアルブミン製剤 (62.5mg) に対し、グリチルリチン酸製剤 (200 μ L) を添加した。グリチルリチン酸製剤添加 15 分後のアルブミンの酸化還元状態を HPCL にて評価した。また、グリチルリチン酸製剤添加によるアルブミン酸化還元状態におよぼす経時的な変化 (10-480 分) についても併せて検討した。

4. 研究成果

1) 肝硬変におけるアルブミンの酸化還元状態の検討

患者背景

対象者 79 名の患者背景を表1に示す。慢性肝疾患の成因は、HCV 65名/HBV 14名であった。また、慢性肝炎/Child-Pugh A/B/C の患者数はそれぞれ 25/21/23/10名であった。

表1. 患者背景

n	79	γ GT (U/L)	78.4 \pm 11.0
HCV/HBV	65/14	Total cholesterol (mg/dL)	151.7 \pm 4.0
Age (yr)	62.5 \pm 1.4		
Sex (M/F)	55/24	Total protein (g/dL)	7.35 \pm 0.06
Body weight (kg)	60.2 \pm 1.4	Albumin (g/dL)	3.40 \pm 0.09
Height (cm)	162.4 \pm 1.1	Total bilirubin (mg/dL)	1.35 \pm 0.10
BMI	22.7 \pm 0.4	Prothrombin time (%)	82.0 \pm 1.8
Hemoglobin (g/dL)	12.6 \pm 0.3	BUN (mg/dL)	15.9 \pm 0.6
Platelet ($\times 10^4/\mu$ L)	12.1 \pm 0.6	Creatinine (mg/dL)	0.76 \pm 0.03
AST (IU/L)	61.6 \pm 3.8		
ALT (IU/L)	55.5 \pm 5.4	CH/Child-Pugh A/B/C	25/21/23/10

酸化型アルブミンと Child-Pugh 分類との関連

Child-Pugh 分類の進行にともない酸化アルブミンの割合が上昇した (図2, 慢性肝炎; 28.3 \pm 1.1%, Child-Pugh A; 33.5 \pm 1.2%, Child-Pugh B and C; 37.8 \pm 1.3%)。

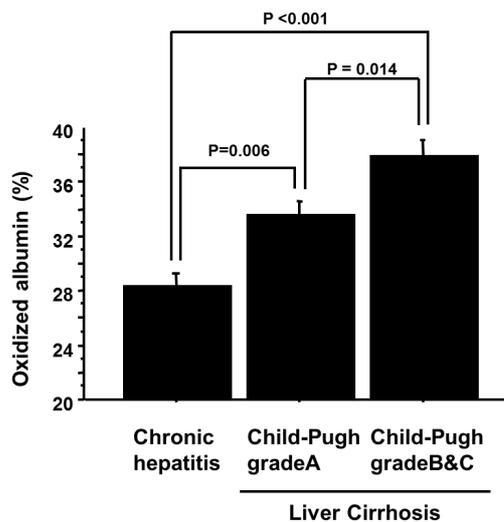


図 2. Child-Pugh 分類と酸化アルブミンの関連

酸化型アルブミンと MELD score の関連

酸化アルブミンは MELD (model for end-stage liver disease) score との間に有意な正の相関を認めた (図 3. $R^2 = 0.336$, $P < 0.001$)。

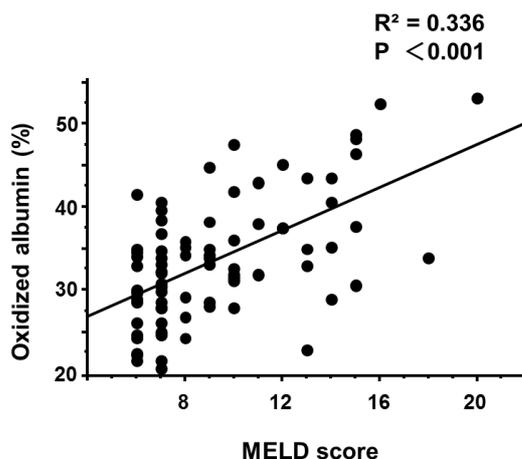


図 3. 酸化型アルブミンと MELD score の関連

2) 酸化アルブミンの還元法の検討

本研究では日常臨床への応用を考え、抗酸化剤である L-システインを含有するグリチルリチン酸 (表 2) の酸化アルブミン還元能について検討した。

表 2. グリチルリチン酸製剤の組成

成分	容量 (40 mL)
グリチルリチン酸— アンモニウム	106 mg
グリシン	800 mg
L-システイン塩酸 塩水和物	44.58 mg

4つの異なるヒトアルブミン製剤 (A, B, C, D Co. LTD, 62.5mg) に対し、グリチルリチン酸製剤 (200 μ L) を添加した。15 分間の反応後、すべてのアルブミン製剤において還元型アルブミンの割合は有意に増加した (図 4, 表 3 ; $P < 0.01$)。

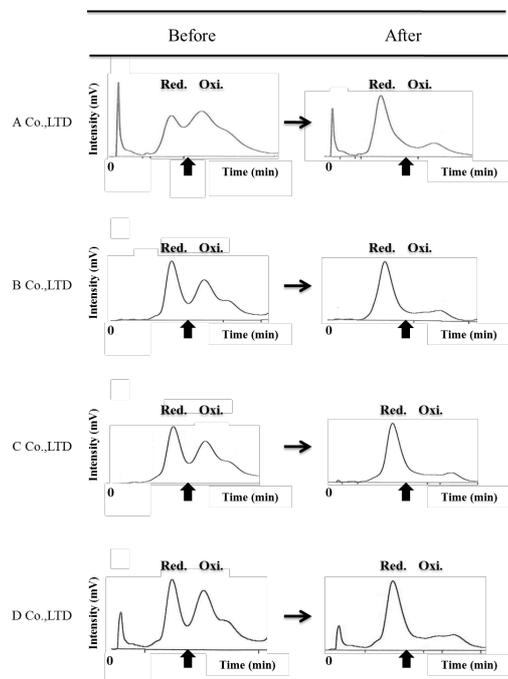


図 4. グリチルリチン酸の酸化アルブミン還元能 (HPLC チャート図; Red. 還元型アルブミン, Oxi. 酸化型アルブミン, 矢印; 溶出時間 17 分)

表 3. グリチルリチン酸の酸化アルブミン還元能

Manufacturer	Reduced albumin (%)		P-value
	Before glycyrrhizin treatment	After glycyrrhizin treatment	
A (n = 4)	27.7 \pm 0.18	78.7 \pm 0.36	<0.01
B (n = 4)	39.6 \pm 0.79	83.6 \pm 0.30	<0.01
C (n = 4)	40.2 \pm 0.50	80.5 \pm 0.31	<0.01
D (n = 4)	35.7 \pm 0.95	71.4 \pm 0.25	<0.01

アルブミン還元化の経時的変化を検討したところ、還元型アルブミンの割合は添加後 15 分をピークに上昇し、その後は徐々に減少した (図 5, 前 27.7 \pm 0.2%; 10 分 73.7 \pm 0.3%; 15 分 78.7 \pm 0.4%; 60 分 73.8 \pm 0.4%; 480 分 37.6 \pm 0.2%)。

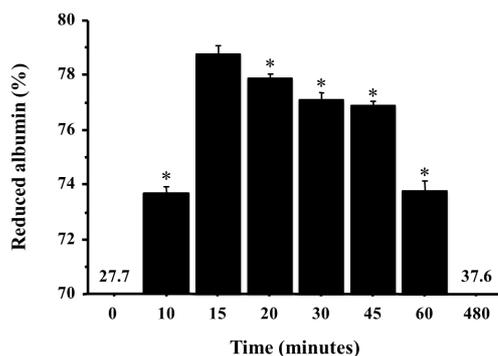


図5. グリチルリチン酸製剤によるアルブミン還元化の経時的変化. *, P<0.05 (15分の還元型アルブミン%と比較)

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 8 件)

- ① Sakata M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Abe M, Koga H, Sata M,
Quick and simple method for increasing the reduced albumin fraction in human serum albumin preparations by using stronger neo-minophagen C, Hepatol Res, 査読有、Vol. 41、2011、1120-1125、DOI:10.1111/j.1872-034X.2011.00863.x
- ② Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR, Sata M,
Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease, Hepatology, 査読有、Vol. 54、2011、1063-1070、DOI:10.1002/hep.24412
- ③ Kawaguchi T, Sata M,
Importance of hepatitis C virus-associated insulin resistance: therapeutic strategies for insulin sensitization, World Journal of Gastroenterology, 査読有、Vol. 16、2010、1943-1952、DOI:10.3748/wjg.v16.i16.1943
- ④ Sakata M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Nakayama A, Ishizaki S, Sonaka I, Maganuma M, Nakamura T, Itou M, Oriishi T, Abe M, Yanagimoto C, Koga H, Harada M, Sakamoto T, Oda S, Sata M,
Redox state of albumin is not associated with colloid osmotic pressure, Molecular Medicine Reports,

査読有、Vol. 3、2010、685-687、DOI:10.3892/mmr_00000317

- ⑤ Sakata M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Nakayama A, Ishizaki S, Sonaka I, Nakamura T, Itou M, Oriishi T, Abe M, Yanagimoto C, Koga H, Sata M,
Oxidized albumin is associated with water retention and severity of disease in patients with chronic liver diseases, e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 査読有、Vol. 5、2010、e247-e253、DOI:10.1016/j.eclnm.2010.09.003
- ⑥ Kawaguchi T, Yamagishi S, Itou M, Okuda K, Sumie S, Kuromatsu R, Sakata M, Abe M, Taniguchi E, Koga H, Harada M, Ueno T, Sata M,
Pigment Epithelium-derived factor inhibits lysosomal degradation of Bcl-xL and apoptosis in HepG2 cells, Am J Pathol, 査読有、Vol. 176、2010、168-176
DOI:10.2353/ajpath.2010.090242
- ⑦ Kawaguchi T, Taniguchi E, Morita Y, Shirachi M, Tateishi I, Nagata E, Sata M,
Association of exogenous insulin or sulphonylurea treatment with an increased incidence of hepatoma in patients with hepatitis C virus infection, Liver Int, 査読有、Vol. 30、2010、479-486、DOI:10.1111/j.1478-3231.2009.02191.x
- ⑧ Kawaguchi T, Kuromatsu R, Ide T, Taniguchi E, Itou M, Sakata M, Abe M, Sumie S, Sata M,
Thrombocytopenia, an Important interfering factor of antiviral therapy and hepatocellular carcinoma treatment for chronic liver diseases, Kurume Med J, 査読有、Vol. 56、2009、9-15、DOI:10.2739/kurumemedj.56.9

[学会発表] (計 3 件)

- ① 坂田雅浩、他、アルブミン製剤のレドックス状態：肝硬変症における臨床効果への影響と製剤還元法、第53回日本消化器病学会大会、2011年10月22日、福岡県福岡市
- ② 坂田雅浩、他、慢性肝疾患における酸化型アルブミンと体水分貯留との関連、第52回日本消化器病学会大会、2010年10月14日、神奈川県横浜市

- ③ Kawaguchi T et al.
Pigment Epithelium-Derived Factor
Suppresses Apoptosis through
Lysosomal、
Degradation of Bcl-xL in HepG2 cells
The 60th Annual Meeting of the
Association for the Study of Liver
Disease、2009.11.1、Boston
Massachusetts, USA.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：アルブミン含有静注剤
発明者：佐田通夫
権利者：久留米大学・味の素株式会社
種類：特許・特願
番号：2011-047777
出願年月日：平成 23 年 3 月 4 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐田 通夫 (SATA MICHIO)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：10162398

(2) 研究分担者

川口 巧 (KAWAGUCHI TAKUMI)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：00320177

谷口 英太郎 (TANIGUCHI EITARO)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：50341318