

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590986

研究課題名(和文)慢性肝疾患進展制御法の確立：効果予測に基づく個別化医療

研究課題名(英文)Establishment of new therapy for chronic liver diseases progression

研究代表者

吉治 仁志(Yoshiji, Hitoshi)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40336855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肝疾患進展抑制法の開発に繋がる多くの成果を得た。安全性がすでに確立している薬剤を組み合わせるカクテル療法により肝線維化進展および肝発癌抑制効果を多数の実験モデルで確認して論文として報告した。これら基礎的研究の知見と併せて各種臨床試験を行い、既に臨床で使用されている各種のレニンアンジオテンシン系(RAS)阻害薬と分岐鎖アミノ酸(BCAA)の併用により根治治療後の肝癌再発が有意に抑制されることを明らかにした。またこの治療効果を予測する因子として可溶性VEGF受容体type2(sVEGFR2)を同定した。これら本研究による成果は慢性肝疾患患者の予後向上に寄与し得ると考える。

研究成果の概要(英文)：During the period of this grant, we revealed many new findings about the usefulness of the combined cocktail therapy of clinical available agents in patients with chronic liver diseases. Even at clinically comparable low doses of these agents, we observed significant inhibitory effects on the liver fibrosis development, hepatocarcinogenesis, and the growth of hepatocellular carcinoma (HCC). We mainly focused on renin-angiotensin system (RAS) in the chronic liver diseases, and found that angiotensin-II (AT-II), aldosterone (Ald), and renin play important roles in the respective processes. Several different combination cocktail treatments also exerted marked inhibitory effects even at clinically comparable low doses. Furthermore, not only in the animal studies, but also we revealed clinical usefulness with these agents. Collectively, our studies with this grant could contribute to the improvement of prognosis in patients with chronic liver diseases.

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：肝硬変 肝癌 血管新生

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患における治療ゴールのひとつは肝硬変への進展および肝発癌を阻止することである。慢性肝疾患の多くを占める慢性ウイルス性肝炎ではインターフェロン (IFN) や抗ウイルス剤を中心とした精力的な研究によりウイルス排除率は著明に改善してきているものの、高齢者や進行例には無効例が多く存在し、これら難治例に対して肝病態進展抑制を目的とする治療法開発が望まれていた。しかし、本研究開始時点ではこのような治療法は開発されておらず、アプローチ方法についても明確でなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、本研究開始までの基盤研究で得られた成果を基礎として、臨床へ展開し得る研究を行い慢性肝疾患患者の生命予後を改善することを目的とした。我々は前年度までの基盤研究において、臨床で広く使用されている ACE 阻害薬 (ACE-I) や IFN などの薬剤を併用投与することにより血管新生抑制に基づく肝線維化・肝発癌抑制効果を基礎的に確認すると共に、内科的根治治療後の肝癌再発における血管新生抑制に基づく臨床的有用性についても明らかにしてきた。そこで本研究では、これまでに得られた研究成果をさらに発展させるために多面的アプローチを行うこととした。

3. 研究の方法

(1): 肝線維化進展抑制に関する検討として以下の検討を行った。即ち、平成 23 年度の初年度はこれまでに抗線維化効果が確認されている ACE-I, ARB, SAB といった RAAS 阻害薬に加え、昨年臨床で使用可能となった直接的レニン阻害薬 (DRI) である aliskiren について血管新生と活性化肝星細胞 (HSC) に対する影響を *in vitro* における検討を中心に行った。24 年度以降は *in vitro* で得られた成果に基づいて *in vivo* での検討を中心に解析を行った。

(2): 肝発癌に対する検討として、DRI などの薬剤について *in vitro* で HSC に加えて血管内皮細胞 (EC) に及ぼすさまざまな影響を通常条件下および IR 類似条件下で検討した。また、Rib の血管新生阻害効果については、未だ作用機序が明らかではないので、各種実験モデル (Tubular formation, MTT など) を用いて VEGF 発現に及ぼす影響など作用機序の解析を含めた検討を加えた。

これら基礎的検討に加えて、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) と ACE-I の併用による肝癌再発抑制効果について当院の臨床審査委員会に諮った後、臨床的効果を検証した。さらに、効果予測のためのバイオマーカーを検索した。患者血清を用いて血管新生因子アレイによる血管新生因子の変動と治療効

果との関連について詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) 平成 23 年度は以下の研究成果を得た。

肝線維化進展抑制に関するカクテル療法について動物モデルを用いて生体内における有効性を確認すると共に作用機序について詳細な検討を加えた。我々はこれまでに、Angiotensin-II 受容体阻害薬 (ARB) などによるレニンアンジオテンシン系ブロックが肝線維化抑制につながることや、IFN 抵抗例に ACE-I と低用量 IFN の併用が抗線維化作用を示すことを報告してきた。今回は、リバビリン (RVB) を加えることでより強い抗線維化作用が認められるか否かについて作用機序を含めて検討した。ARB、IFN、RVB 各群共に C 群に比し肝線維化が有意に抑制された。二剤併用投与では単剤投与より線維化抑制効果が強く、三剤全てを投与した群において最も強い線維化抑制効果が認められた。以上のことから、強力な抗ウイルス療法が困難な例やウイルス陰性化を望めない臨床例に対する予後改善を目指した治療として有用である可能性が示唆された。治療効果予測のためのバイオマーカー検討については、これまでの研究で明らかにしてきた ARB と分岐鎖アミノ酸製剤 (BCAA) 併用による肝癌再発抑制について血管新生因子探索アレイを用いて有力な候補を絞り込んだ。VEGF 関連因子としては可溶性 VEGFR2 が鋭敏なマーカーとなり得る可能性があることを確認した。

(2) 平成 24 年度は以下の研究成果を得た。

注射剤を含まない経口内服薬による組み合わせによる検討を行った。ARB、選択的 Ald 阻害薬 (SAB) による治療の可能性について報告した。なお、本研究は各専門学会で発表すると共に英語論文として報告した。24 年度の研究結果から、Ald は血管新生を促進して肝癌の進展過程に重要な役割を果たしていることが明らかとなりレニンアンジオテンシン系 (RAS) 制御が慢性肝疾患進展抑制に極めて有用なアプローチであることが明らかとなった。さらに、AT-II や Ald の上流にあり、RAS の rate limiting enzyme であるレニンが活性化肝星細胞 (Ac-HSC) を介して重要な役割を果たしており、DRI は抗線維化作用を示すことを本年度の研究で確認した。

(3) 平成 25 年度は以下の研究成果を得た。

研究の最終年度である 25 年度は、慢性肝疾患進展抑制法の確立に向けたより臨床へ還元できる可能性を秘めた種々のデータを得た。本研究初年度である 23 年度の研究で、Angiotensin-II (AT-II) 受容体阻害薬 (ARB)、リバビリン、およびインターフェロンを用いた 3 剤併用療法による肝線維化抑制効果につき有用な知見を得た。即ち、すでに臨床

で広く使用されている薬剤を用いて単剤よりも2剤を併用した方が肝線維化抑制効果は強く、さらに3剤を併用投与するとインターフェロンは低用量であっても非常に強力な肝線維化抑制効果を示すことを見出した。その機序として活性化肝星細胞抑制や血管新生阻害作用が重要な役割を果たしていることを明らかにして論文化した。しかしながら、インターフェロンは患者背景により血球減少や間質性肺炎を来すことがある。従ってより低侵襲である治療法の開発も重要な課題である。そこで今回我々は、注射剤を含まない経口内服薬による組み合わせによる検討を行った。今回の研究で有効性が示された組み合わせとしてARBと選択的アルドステロン阻害薬 (SAB)の併用投与が同様に強い肝線維化および肝発癌抑制効果を示すことを見出し、論文として報告した。さらに、本年度は直接的レニン阻害薬であるアリスキレンや糖尿病薬として広く使用されているDPP-IV阻害薬が肝線維化抑制効果を示すことを見出した。さらに、ARBの線維化抑制機序として自然免疫との関係を明らかにすることができた。即ち、TLR-4がAT-IIのシグナル経路と密接な関連を持ち肝線維化伸展に重要な役割を果たしていることを明らかにして論文として報告した。

これら3年間にわたる本研究で明らかにし得た新規発見は、近い将来臨床応用が可能であり、慢性肝疾患患者の予後改善にきわめて有用であると考えられる。

5. 主な発表論文など

「雑誌論文」(計16編)

英文誌全て査読有り

1. Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Kaji K, Aihara Y, Fukui H. Impact of Renin-angiotensin system in hepatocellular carcinoma. *Current Cancer Drug Targets.* 11(4):431-441, 2011.

2. Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Aihara Y, Shirai Y, Douhara A, Fukui H. Possible involvement of angiogenesis in chronic liver diseases: Interaction among renin-angiotensin-aldosterone system, Insulin resistance and oxidative stress. *Kaji K, Current Medicinal Chemistry.* 19(12):1889-1898, 2012.

3. Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Kaji K, Aihara Y, Shirai Y, Yoshiji H, Yanase K, Fukui H. Cocktail therapy with a combination of interferon, ribavirin and angiotensin- type 1 receptor blocker attenuates murine liver fibrosis development. *International Journal of Molecular Medicine.* 28:81-88, 2011.

4. Kaji K, Yoshiji H, Kitade M, Ikenaka Y, Noguchi R, Shirai Y, Aihara Y, Namisaki T, Yoshii J, Yanase K, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Combination treatment of angiotensin

type receptor blocker and new oral iron chelator attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300:G1094-1104, 2011.

5. Kawaratani H, Tsujimoto T, Kitazawa T, Yoshiji H, Uemura M, Fukui H. Therapeutic effects of cytokine modulator Y-40138 in the rat alcoholic liver disease model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 26:775-783, 2011.

6. Yamazaki M, Sano R, Kuramoto C, Yoshiji H, Uemura M, Fukui H, Kamiya M, Okamoto Y. Rapid detection of spotaneous bacterial peritonitis by granulocyte elastase latex immunoassay and reagent strip. *Rinsho Byori.* 59(6):549-558, 2011.

7. Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Kaji K, Aihara Y, Shirai Y, Yoshiji H, Yanase K, Fukui H. Combination of branched-chain amino acids and angiotensin-converting enzyme inhibitor suppresses the cumulative recurrence of hepatocellular carcinoma: A randomized control trial. *Oncology Reports,* 26:1547-1553, 2011.

8. Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Kaji K, Shirai Y, Aihara Y, Yamao J, Toyohara M, Mitoro A, Sawai M, Yoshida M, Morioka C, Fujimoto M, Uemura M, Kawaratani H, Tsujimoto T, Fukui H. Soluble VEGF receptor-2 may be a predictive marker of anti-angiogenic therapy with clinically available safe agents. *Oncology Letters.* 2:69-73, 2011.

10. Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Kaji K, Aihara Y, Douhara A, Yamao J, Toyohara M, Mitoro A, Sawai M, Yoshida M, Morioka C, Fujimoto M, Uemura M, Fukui H. Combination of branched-chain amino acid and angiotensin-converting enzyme inhibitor improves liver fibrosis progression in patients with cirrhosis. *Molecular Medicine Reports.* 5:539-544, 2012.

11. Shirai Y, Yoshiji H, Noguchi R, Kaji K, Aihara Y, Douhara A, Moriya K, Namisaki T, Kawaratani H, Fukui H. Cross talk between toll-like receptor-4 signaling and angiotensin- in liver fibrosis development in the rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 28(4):723-30, 2013.

12. Yasuda S, Sho M, Yamato H, Yoshiji H, Wakatsuki K, Nishiwada S, Yagita H, Nakajima Y. Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor

receptor 2(VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo. *Clinical and Experimental Immunology*. 172:500-506, 2013.

13. Aihara Y, Yoshiji H, Noguchi R, Kaji K, Namisaki T, Shirai Y, Douhara A, Moriya K, Kawaratani H, Fukui H. Direct renin inhibitor, aliskiren, attenuates the progression of non-alcoholic steatohepatitis in the rat model. *Hepatol Res*. 2013 Nov;43(11):1241-50. doi: 10.1111/hepr.12081. Epub 2013 Feb 28.

14. Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Moriya K, Kitade M, Aihara Y, Douhara A, Yamao J, Fujimoto M, Toyohara M, Mitoro A, Sawai M, Yoshida M, Morioka C, Uejima M, Uemura M, Fukui H. Branched-chain amino acids suppress the cumulative recurrence of hepatocellular carcinoma under conditions of insulin-resistance. *Oncology Reports*. 30:545-552, 2013.

15. Noguchi R, Yoshiji H, Ikenaka Y, Kaji K, Aihara Y, Shirai Y, Namisaki T, Kitade M, Douhara A, Moriya K, Fukui H. Dual blockade of angiotensin- and aldosterone suppresses the progression of a non-diabetic rat model of steatohepatitis. *Hepatology Research*. 43(7):765-774, 2013.

16. Akahane T, Fukui K, Shirai Y, Yoshiji H, Uemura M, Fukui H. High hemoglobin level predicts non-alcoholic fatty liver disease in Japanese women. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*. 2(6):623-627, 2013.

「学会発表」(計 20 件: 海外学会のみ)

1. Yoshiji H. Chemoprevention of HCV-associated HCC by BCAA and ACE-inhibitor. JSH Single Topic Conference, Tokyo, 2012.11.22.

2. Yoshiji H. VEGF-targeted cancer therapy: Friends of Foes. National Cancer Institute Special Seminar 2013. Washington, DC. 2013.4.10.

3. Aihara Y, Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Kaji K, Fukui H. Combination of branched-amino acids and angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates the insulin resistance-based hepatocarcinogenesis via angiogenesis suppression. ASIA-PACIFIC PRIMARY LIVER CANCER EXPERT MEETING. Osaka, 2011.7.3.

4. Kaji K, Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Aihara Y, Fukui H. Inhibitory effect of selective aldosterone blocker on hepatocellular carcinoma development via angiogenesis suppression. ASIA-PACIFIC PRIMARY LIVER CANCER EXPERT MEETING. Osaka, 2011.7.3.

5. Noguchi R, Yoshiji H, Ikenaka Y, Kaji K, Shirai Y, Fukui H. Clinically available selective aldosterone blocker attenuates hepatocarcinogenesis via angiogenesis inhibition in rats. ASIA-PACIFIC PRIMARY LIVER CANCER EXPERT MEETING. Osaka, 2011.7.3

6. Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Kaji K, Aihara Y, Fukui H. Combination of branched-chain amino acid and angiotensin-converting enzyme inhibitor suppresses the cumulative recurrence of hepatocellular carcinoma under the condition of insulin resistance. ASIA-PACIFIC PRIMARY LIVER CANCER EXPERT MEETING. Osaka, 2011.7.3

7. Kaji K, Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Fukui H. Inhibitory effect of selective aldosterone blocker on hepatocellular carcinoma development via angiogenesis suppression. ILCA. Hong-Kong, 2011.9.3.

8. Aihara Y, Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Kaji K, Fukui H. Combination of branched-amino acids and angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates the insulin resistance -based hepatocarcinogenesis via angiogenesis suppression. ILCA. Hong-Kong, 2011.9.3.

9. Yoshiji H, Ikenaka Y, Noguchi R, Kaji K, Aihara Y, Fukui H. Soluble VEGF receptor-2 may be a predictive marker of anti-angiogenic chemopreventive therapy with clinically available safe agents. ILCA. Hong-Kong, 2011.9.3.

10. Noguchi R, Yoshiji H, Ikenaka Y, Aihara Y, Fukui H. Clinically available selective aldosterone blocker attenuates hepatocarcinogenesis via angiogenesis inhibition in rats. ILCA. Hong-Kong, 2011.9.3.

11. Moriya K, Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Kaji K, Douhara A, Aihara Y, Yamao J, Mitoro A, Fukui H. Efficacy of combination therapy with peg-interferon alpha and ribavirin in elderly chronic hepatitis C. JSH Single Topic Conference. Tokyo, 2012.11.21.

12. Aihara Y, Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Moriya K, Kaji K, Douhara A, Fukui H. Crosstalk between glucose intolerance and liver fibrosis development in patients with chronic hepatitis C. JSH Single Topic Conference. Tokyo, 2012.11.21.

13. Douhara A, Moriya K, Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Kaji K, Aihara Y, Yamao J, Mitoro A, Fukui H. Effect of sorafenib on HCV-related hepatocellular carcinoma (HCC). JSH Single Topic Conference. Tokyo, 2012.11.21.

14. Yoshiji H, Noguchi R, Kaji K, Aihara Y, Namisaki T, Moriya K, Douhara A, Kitade M, Fukui H. Response-guided anti-angiogenic therapy for hepatocellular carcinoma recurrence with clinically available safety agent. AACR Annual Meeting 2013. Washington, DC. 2013.4.10.

15. Aihara Y, Yoshiji H, Noguchi R, Kaji K, Namisaki T, Moriya K, Kitade M, Fukui H. Direct renin inhibitor attenuates rat hepatocarcinogenesis via anti-angiogenic activity. AACR Annual Meeting 2013. Washington, DC. 2013.4.10.

16. Noguchi R, Yoshiji H, Namisaki T, Moriya K, Kitade M, Aihara Y, Douhara A, Kawaratani H, Nishimura N, Fukui H. Combination of angiotensin-converting enzyme inhibitor and selective aldosterone blocker, suppresses the liver fibrosis carcinogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in the rat. International Society for Hepatic Sinusoidal Research. Osaka. 2013.9.24.

17. Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Moriya K, Kitade M, Aihara Y, Douhara A, Kawaratani H, Nishimura N, Fukui H. Combined treatment of sorafenib and angiotensin- receptor blocker attenuates preneoplastic lesion development of non-alcoholic steatohepatitis in rats. International Society for Hepatic Sinusoidal Research. Osaka. 2013.9.24.

18. Douhara A, Moriya K, Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Kitade M, Aihara Y, Kawaratani H, Nishimura N, Fukui H. Inhibition of endotoxin cascade with antibiotics attenuates the liver fibrosis development in rat model of nonalcoholic steatohepatitis. International Society for Hepatic Sinusoidal Research. Osaka. 2013.9.24.

19. Kitade M, Yoshiji H, Snorri Thorgeirsson, Fukui H. Distinct role of EGFR and Met on adult hepatic progenitor cell differentiation in mice. Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells. Osaka. 2013.9.26.

20. Namisaki T, Yoshiji H, Noguchi R, Moriya K, Kitade M, Aihara Y, Douhara A, Kawaratani H, Nishimura N, Fukui H. Beneficial effects of combined treatment with ursodoxycholic acid (UDCA) and Angiotensin- type1 receptor blocker (ARB) on liver fibrosis development in the rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells. Osaka. 2013.9.26.

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
吉治仁志 (YOSHIJI HITOSHI)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40336856

(2) 研究分担者
野口隆一 (NOGUCHI RYUICHI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30423908

(3) 連携研究者
()
研究者番号：