

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461013

研究課題名(和文) 血清脂質バイオマーカーによる非B非C型肝炎発癌リスク予測法の開発

研究課題名(英文) Serum lipid biomarker for the prediction of non-B, non-C liver cancer development

研究代表者

池上 正 (IKEGAMI, TADASHI)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40439740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：NASHに特徴的な血清胆汁酸濃度の増加や分画の変化がみられ、これらの疾患における腸内細菌叢の変化を反映しているものと推測されたが、発がんの高リスク群の絞り込みをおこなうためのマーカーにはなりえなかった。NASH発がんモデルであるSTAMマウスの血清ならびに組織中の胆汁酸や酸化ステロール(OS)を経時的に追跡すると、発症のごく早期に酸化ストレスにより産生されるOSの増加がみられ、一方27-hydroxycholesterolに代表される酵素的に産生されるOSは減少していた。本研究により、コレステロール異化産物としてのみならず、病態の進展に関連してOSが質的に変動していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Through the determination of profiles of serum bile acids (BA) in patients with NASH with or without HCC, a presence of specific serum BA pattern in NASH and NASH-HCC was demonstrated. This supports possible alteration of intestinal microbiota in these diseases as previously reported. However, as only modest change between NASH and NASH-HCC was observed, altered BA profile may not be a screening marker for high-risk group in HCC development among NASH patients. Next, we employed an animal NASH model developing HCC, and determined BA profile as well as various oxysterol (OS) levels. Decrease of OS synthesized by enzymatic response and increase of OS induced by autoxidation have been seen in early phase of disease development. It is hypothesized that these qualitative differences in OS could influence the disease progression through the regulation of cholesterol accumulation in various hepatic cells..

研究分野：消化器内科学

キーワード：酸化ステロール 非アルコール性脂肪性肝炎 非B非C肝細胞癌 胆汁酸 腸内細菌

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来我が国における肝臓癌発生の最大のリスクは肝炎ウイルス感染であり、B型、C型慢性肝炎患者からの発がんが80%程度を占めていた。しかし近年の抗ウイルス療法の劇的な変化によって、肝炎ウイルスのコントロールは十分可能になったため、ウイルス肝炎からの肝発がん患者は減少すると考えられている。一方近年増加している非B非C (NBNC) 肝癌症例については、糖尿病の合併や高齢化、あるいはPNPLA3 遺伝子の SNPs 変異などの関連が示唆されているが、発がんに関与するメカニズムは詳細に検討されていない。

(2) われわれは先行研究において、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) や慢性 C 型肝炎患者 (CHC) の血清で、種々の酸化ステロール (Oxysterol, OS) が増加していることを明らかにした。OS はコレステロール代謝の中間産物と考えられてきたが、近年では代謝、免疫、炎症などを制御する生理活性物質であることが多数報告されており、NBNC 肝癌、あるいは HCV 排除後の発がんにおける OS の役割について検討することから研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

非 B 非 C 発がんにおける OS の役割について、患者血清を用いた解析を行い、これを元にした仮説を動物モデルで理解する。

- (1) OS はコレステロールの代謝物であり、胆汁酸合成とも密接な関連がある。さらに近年の報告では、肥満モデルラットでの肝発がんに関与しており、腸内細菌が変調を与えるファクターとして二次胆汁酸の増加、さらに二次胆汁酸による肝星細胞を介した細胞老化関連分泌現象 (Senescence Associated Secretory Phenotype: SASP) の発現を示唆する報告があり、ヒトサンプルにおいて同様の変化がみられるかを検討する。
- (2) NAFLD で肝癌を伴った症例とそうでない症例での OS のプロファイルを検討する。
- (3) NAFLD から肝癌を発症する動物モデルを用いて、OS プロファイルを対照モデルと比較し、発がんに関連する OS ならびに胆汁酸変化を検討する。

これらの検討を通じて、NBNC、ことに NAFLD からの発がん、HCV 排除後の発がんに関連する OS プロファイルを探索し、さらに特徴的な OS がどのように関連するのかを考察することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者ならびに NASH に肝細胞がん (Hepatocellular carcinoma: HCC) を合併した患者の血清を集積し、既報

のごとく LC-MS/MS を用いて血清胆汁酸分画を測定した。

2H で標識した内部標準と、2ml の 0.5M のカリウムリン酸バッファー (pH7.4) を 20 $\mu$ L の血清に加え、この混合物を Bond-Elut C18 を通過させた。標的分子を水・メタノール混合物 (1:1, vol/vol) にて溶出させ、窒素下にて蒸発乾固させ、再度 20mM の酢酸アンモニアバッファー (pH7.5) で溶解した。一部を LC-MS/MS に投入しクロマトグラフィーで分離、質量分析に供する。カラムは Hypersil GOLD column (150 X 2.1 mm, 3 $\mu$ m: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。溶媒として 20mM の酢酸アンモニアバッファー (pH 7.5)、アセトニトリル、メタノール (70:15:15, vol/vol/vol) を 30 分かけて 30:35:35, vol/vol/vol にグラジエントとして用いた。

- (2) NASH から HCC を発生するモデルとして知られる STAM マウスについて肝組織、血清中の OS ならびに胆汁酸プロファイルを測定し、脂肪肝～発がん過程での経時的な変化を検討した。

まず、肝組織の重量を測定した上でホモジナイザーでペレットとし、遠心によって夾雑物を除去。得られた標本の蛋白濃度を測定した。この組織ならびに同時に得られた血清に内部標準として 2 H 標識された OS を加え、1N エタノール水酸化カリウムにて 37、1 時間アルカリ加水分解をおこなった。N-hexane により抽出後、イオン化高率をあげて高感度化する目的でピコリン酸で誘導体化した。N-hexane にて過剰な誘導体化試薬を沈殿除去し、上清を蒸発乾固した。アセトニトリルに再溶解後、一部を HPLC-MS/MS に導入し分析した。

- (3) また、脂質代謝に影響を及ぼす遺伝子発現に関して、STAM マウス肝組織から得た cDNA をもとに PCR を施行し発現レベルを比較した。

### 4. 研究成果

#### NAFLD ならびに NAFLD-HCC 患者の血清胆汁酸プロファイルの特徴

胆汁酸は肝で合成され (一次胆汁酸)、グリシン、タウリン抱合体となった後胆汁中に分泌され腸管内に排出される。腸管内の細菌によって脱抱合がおこり、脱水素酵素を有する腸内細菌によって二次胆汁酸に変化する。胆

胆汁酸は主として回腸末端から再吸収され、門脈血流から肝臓へ循環し、再度化学変化を受けた後に胆汁に排出されるという腸肝循環を繰り返す。二次胆汁酸は割合の多いものとして、コール酸から産生されるデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸から産生されるリトコール酸が知られている。古くからデオキシコール酸などの二次胆汁酸の細胞毒性や変異原性が知られ、1970年代には便中の胆汁酸組成と大腸癌発がんの問題が研究のテーマとなった時期がある。特定の二次胆汁酸は腸内細菌叢のうち特定の菌種により産生されるため、胆汁酸分画は腸内細菌叢の変化を示している可能性が示唆され、また細胞や組織の直接作用を示す物質として、腸内細菌叢の変化の影響を検討できる可能性が示唆される(図1)。

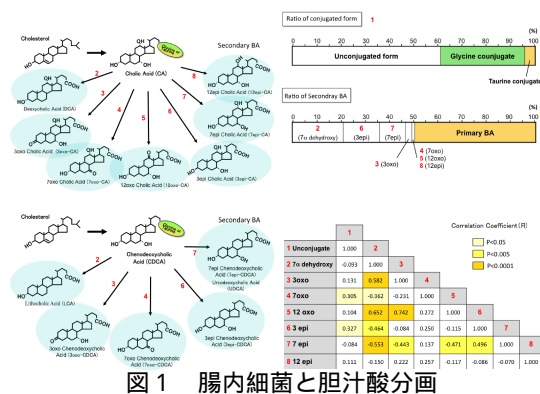


図1 腸内細菌と胆汁酸分画

これらの観点から、近年では、肥満モデル動物中の腸内細菌叢の違いにより二次胆汁酸、ことにデオキシコール酸が増加し、これが腸肝循環を介して肝臓の星細胞へ作用しSASPを誘導することにより肝発がんに関連するという論文が報告された。われわれの検討では、NASHならびにHCCを伴った患者の血清胆汁酸分画を測定し、モデル動物で示された変化が再現できるかどうかをまず検証した。図2に示すように、血清中二次胆汁酸の割合は、肝組織中の二次胆汁酸と相関しており、簡易的な指標として用いることが十分可能と判断された。

Association between Serum Secondary BAs and Hepatic Secondary BAs

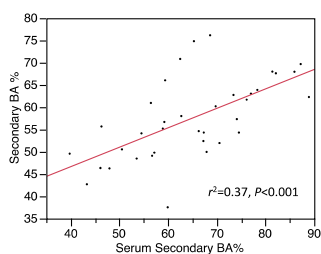


図2 血中胆汁酸と肝組織中胆汁酸

NASH, NASH-HCC患者の血清胆汁酸を測定したところ、総胆汁酸量は健常者に比較してNASH, NASH-HCCの順に有意に高くなっていった(P<0.05, 健常者に比較して)。一方、胆汁酸組成をみると、NASH, NASH-HCC群では非抱合胆汁酸量の低下が認められ、また、二次胆汁酸の割合の低下が認められた(図3および4)。これらの所見はNASHやNASH-HCC患者の共通する腸内細菌叢の変化を示唆するものと推測できるが、両群では大きな差は認められないことから、NASHでのHCC発生のハイリスクグループのスクリーニングには不向きであろうと考えられた。

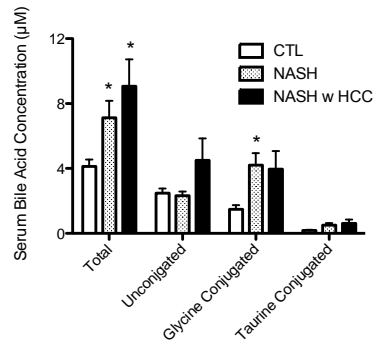


図3 抱合型胆汁酸の違い

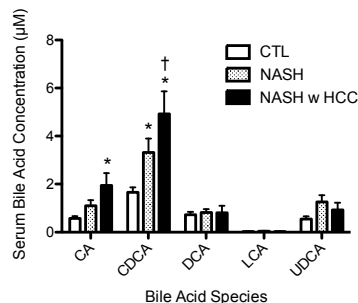


図4 胆汁酸成分の違い

### HCCを発生するNASHモデル動物における胆汁酸、OSの変化

STAMマウスは少量のストレプトゾトシンを生後すぐに投与し、その後高脂肪食を与えてNASHを誘導するモデルであるが、週齢10~20週でほぼ全例に肝細胞がんを合併する。このモデルを用いて経時的に胆汁酸、OSの変化を評価した。

STAMでは、8週齢でNASHを、12週齢で進行した線維化を、20週齢で肝発がんをみた。HFDでは脂肪沈着を認めたが、線維化の進行は見られなかった。8週齢での肝組織中CHOL濃度は対照群に比してHFDでは変化なかったが、STAMでは増加していた。一方、CHOLの異化産物である胆汁酸については、8週齢においてはHFD, STAMの両方でCTLに比して低下していた。胆汁酸のうち、classical pathwayで産生されるコール酸はHFD群でSTAMに比べさらに低下がみられ

たが、alternative pathway で産生されるムリコール酸についてはCTLと比較してHFD, STAMとも差が見られなかった。肝組織中OSとして最も量の多いのは4-hydroxycholesterol (4BHC)であり、8週齢ではHFD, STAMともCTLに比して低下していた。一方、LXRリガンドである27-hydroxycholesterol (27HC)はHFDとCTLとでは差がなかったが、STAMでは低下していた。またLXRに対するアンタゴニスト作用をもつ5,6-Epoxycholesterol (5A6AEC)はSTAMで有意に増加していた。これらの結果から、STAMにおいては、OSの質的バランスがCTLやHFDと異なり、これが炎症を促進しNASH病態の進行に関与している可能性が示唆された。STAMにおける高血糖がこれらの質的变化に関連しているものと推測された。

#### 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)

Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Iwamoto J, Monma T, Hirayama T, Saito Y, Yamashita K, Matsuzaki Y. Simultaneous quantification of salivary 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisobutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, and 2-hydroxybutyrate as possible markers of amino acid and fatty acid catabolic pathways by LC-ESI-MS/MS. Springerplus 4. 2015, p494 (査読有) DOI: 10.1186/s40064-015-1304-0

Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies for the prediction of PBC with and incomplete biochemical response to UDCA and bezafibrate. Hepatol Res. 45(8), 2015, p827-828. (査読有) DOI: 10.1111/hepr.12461

Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Kohjima M, Nakamuta M, Matsuzaki Y. Increased serum oxysterol concentrations in patients with chronic hepatitis C virus infection. Biochem Biophys Res Commun 446 (3) 2014, p736-740 (査読有) DOI: 10.1007/s00535-012-0585-0

Saito Y, Matsuzaki Y, Honda A, Iwamoto J, Ikegami T, Chiba T, Sugawara S, Okumura T, Tsujii H, Doy M, Tokue K. Post-therapeutic needle biopsy in patients with hepatocellular carcinoma is a useful tool to evaluate response to proton irradiation. Hepatol Res 44 (4) 2014, p403-409 (査読有) DOI: 10.1111/hepr.12133

Iwamoto J, Mizokami Y, Saito Y,

Shimokobe K, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. Small-bowel mucosal injuries in low-dose aspirin users with obscure gastrointestinal bleeding. World J Gastroenterol 20, 2014 p13133-13138 (査読有) DOI: 10.3748/wjg.v20.i36.13133

Iwamoto J, Saito Y, Honda A, Miyazaki T, Ikegami T, Matsuzaki Y. Bile acid malabsorption deactivates pregnant X receptor in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 19(6)2013, p1278-1284 (査読有)

DOI:10.1097/MIB.0b013e318281f423

Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. The role of taurine on skeletal muscle cell differentiation. Adv Exp Med Biol 776.2013. p321-328 (査読有)

DOI: 10.1007/978-1-4614-6093-0\_29

##### [学会発表](計12件)

池上正、屋良昭一郎、本多彰、松崎靖司 慢性肝疾患における酸化ステロールの役割 第113回日本内科学会総会 2016.4.21-4.23 (東京)

Yara S, Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Monma T, Murakami M, Konishi N, Iwamoto J, Saito Y, Matsuzaki Y. Dysregulation of hepatic 27-hydroxycholesterol in steatohepatitis model with hyperglycemia. The 25<sup>th</sup> Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2016.2.20-2.24 (東京)

Yara S, Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Murakami M, Iwamoto J, Matsuzaki Y. Reduction of hepatic 27-Hydroxycholesterol in steatohepatitis model mice with insulin resistance The Liver Meetings 2015. 2015.11.13-11.17 (San Francisco, CA, USA)

池上正、本多彰、松崎靖司 NASH-HCC患者における血清胆汁酸プロファイルの特徴 第19回日本肝臓学会大会 2015.10.19-10.22 (東京)

Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Yara S, Matsuzaki Y. Characteristic features of serum bile acids profile in patients with Non-alcoholic steatohepatitis with hepatocellular carcinoma. AACR Special Conference: Metabolism and Cancer 2015.6.7-6.10 (Bellvue, WA, USA)

池上正、本多彰、松崎靖司、宮崎照雄、国府島庸之、中牟田誠 血清ステロールマーカーからみた慢性C型肝炎の薬物代謝に関する検討 第36回胆汁酸研究会 2014.11.22 (東京)

池上正、本多彰、松崎靖司 生活習慣病としての慢性肝疾患における血中酸化ステロール濃度測定の意義 第 18 回日本肝臓学会 2014.10.23-2014.10.24 (神戸)

池上正、本多彰、松崎靖司、宮崎照雄、国府島庸之、中牟田誠 血清ステロールマーカーからみた慢性 C 型肝炎の薬物代謝における性差に関する検討 第 10 回消化器病における性差医学・医療研究会 2014.7.26 (東京)

池上正、本多彰、松崎靖司 NASH および NASH 肝癌における血中胆汁酸分画測定とその意義 第 100 回日本消化器病学会総会 2014.4.23-4.26 (東京)

池上正、本多彰、松崎靖司 慢性 C 型肝炎患者に見られる血清コレステロール値低下のメカニズム 第 17 回日本肝臓学会大会 2013.10.9-2013.10.10 (東京)

宮崎照雄、本多彰、池上正、岩本淳一、宮本和宣、松崎靖司 肝硬変患者の骨格筋における脂肪酸酸化活性の評価 第 49 回日本肝臓学会総会 2013.6.6-6.7 (東京)

岩本淳一、本多彰、松崎靖司 クローム病における核内レセプター Pregnane X receptor の活性低下と胆汁酸吸収障害の影響 第 49 回日本肝臓学会総会 2013.6.6-6.7 (東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池上 正 (IKEGAMI, Tadashi)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40439740

### (2) 研究分担者

本多 彰 (HONDA, Akira)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10468639

宮崎 照雄 (MIYAZAKI, Teruo)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60532687

### (3) 連携研究者

松崎 靖司 (MATSUZAKI, Yasushi)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50209532