

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461006

研究課題名(和文) 脂肪肝～肝発癌の病期に応じた最適な酸化ストレス介入療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment protocol for oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis and liver cancer

研究代表者

高木 章乃夫 (Takaki, Akinobu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80359885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは発癌に関与するが、抗腫瘍的にも働く。肝癌リスクである非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の治療として抗酸化療法が適切であるか、議論がある。本研究で、肝癌では酸化ストレスが亢進してはならず、抗酸化力の低下が特徴的である事が判明。動物モデルでは一般的な抗酸化薬により癌部の抗酸化力が高まり、癌がより悪性化する可能性が判明。発癌リスクの高い肝硬変においては酸化ストレス除去よりも抗酸化力サポート機能を有する薬が有用である可能性がある。今後、臨床データの集積が必要。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is associated with the progression of chronic liver disease. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is an oxidative stress-related disease. However, the oxidative / anti-oxidative balance has so far not been fully characterized in NASH. The objective of the present study was to investigate the oxidative stress and the anti-oxidative activity in NASH, including concomitant hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCC). NASH-HCC patients exhibited a lower OXY than NASH. In mice, vitamin E administration induced antioxidant hemoxygenase (HO)-1 protein expression in CCC cancer tissue, while the number of stem-like cells increased. L-Carnitine administration improved intestinal microbiome and biliary acid balance, upregulated the hepatic mitochondrial membrane uptake related gene in non-cancerous tissue, and did not alter stem-like cell numbers. The mitochondrial function-supporting agent L-carnitine is a good candidate to control oxidative stress conditions.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝癌 非アルコール性脂肪性肝炎 胆管癌 酸化ストレス 抗酸化薬

1. 研究開始当初の背景

近年、高脂肪食・肥満に関連する肝臓・胆管癌は増加基調にある。高脂肪食は腸内細菌叢バランスを悪化させ微生物レセプター活性化などによる細胞ストレスを誘導、発癌へと導くことが明らかになってきた。中でも酸化ストレスはDNA損傷・発癌に関与することが知られている。一方、酸化ストレスは抗腫瘍的に働くとも考えられている。肥満関連肝疾患の代表である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH; Non-alcoholic steatohepatitis)の治療は世界的に抗酸化剤であるビタミンEが推奨されている。炎症低減のみでなく発癌も視野に入れた治療として抗酸化剤が最適なのか、十分な評価がなされていない。

2. 研究の目的

本研究で肥満関連肝・胆道癌の種類・病期、腫瘍部・非腫瘍部、癌幹細胞・それ以外の癌細胞、の比較で酸化ストレス・抗酸化力バランスを確認し、どのように調整する事が予後延長に寄与する可能性があるか検討する。

3. 研究の方法

肝細胞癌・胆道癌・非発がん NASH 患者の末梢血及び病変組織における酸化ストレス状態の評価と、動物実験による抗酸化療法の生体環境への影響につき明らかにする。

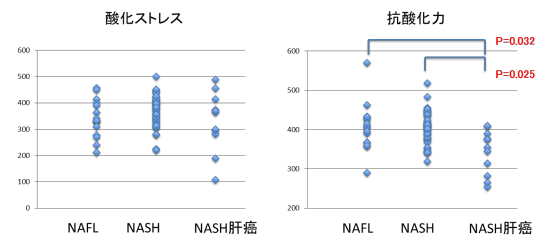
- 1) **肝細胞癌・胆道癌患者・非発癌脂肪肝炎患者の末梢血・手術組織での酸化ストレス状態の把握**：血液の酸化ストレス状態と抗酸化力状態を経時的に測定を行い、癌の進行度と全身状態でどのようなバランスになっているのか、評価を行う。癌切除症例では、組織を用いて、酸化ストレスマーカー染色を行い、健全部と癌部でどのような分布になっているか確認する。
- 2) **患者組織・マウスモデル癌幹細胞でのCD44-Variant 発現の評価**：癌部で幹細胞マーカーCD133 と幹細胞様細胞にて発現する CD44-Variant の二重染色を行い幹細胞様細胞における CD44-Variant 発現状況の確認を行う。脂肪性肝炎-肝細胞癌モデルマウスと、脂肪性肝炎-胆管癌モデルマウスを用いて、様々な臨床病態を再現して酸化ストレスと抗酸化作用のバランスを癌細胞と正常肝細胞の間で比較する。
- 3) **マウスモデル・細胞株での抗酸化剤の有効性評価**：特に酸化ストレス誘導剤と水素など抗酸化剤の併用による癌経過・生命予後につき検討を行う。株化肝細胞癌細胞・胆管癌細胞と正常肝細胞・胆管細胞を用いて酸化ストレス誘導剤・抗酸化剤の感受性も確認し、最適の酸化ストレス介入治療を探索する。

4. 研究成果

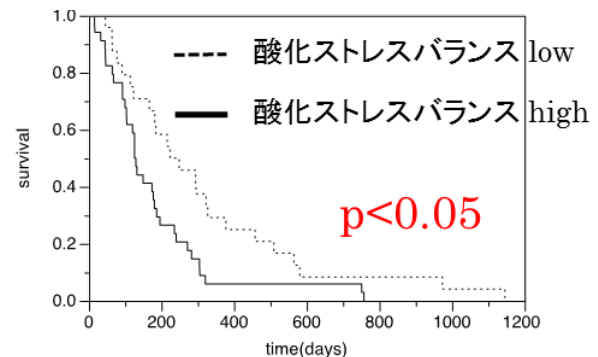
(1) 臨床データに関する検討

NASH 及び NASH 関連肝細胞癌患者及び胆道癌患者末梢血での臨床データの結果は以下のようにまとめることが出来た。

i) NASH 及び非進行性の単純脂肪肝 (NAFL: Non-alcoholic fatty liver) を含めた非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)) 全体において、酸化ストレスマーカーは肥満・HbA1c・肝生検組織炎症に相関していた。抗酸化マーカーはアルブミンなど肝予備能と相関していた。肝細胞癌症例においては抗酸化力の低下が特徴的であった。糖尿病治療薬を中心とした治療により6年後の抗酸化力は改善していた。

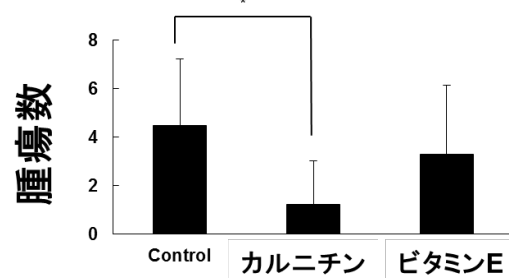


ii) 胆道癌患者において酸化ストレスバランスが酸化ストレス指向になっている症例において、生命予後が悪い傾向にあった。



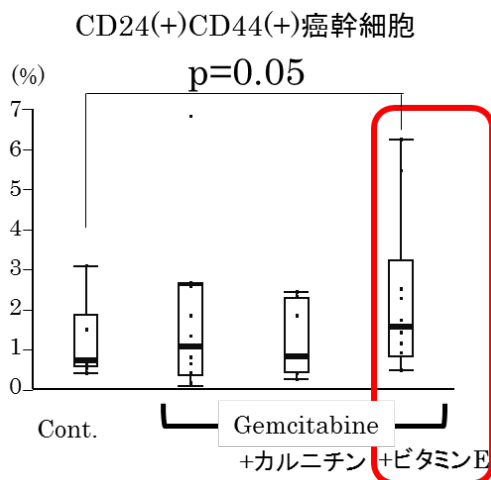
(2) 動物モデルを利用した酸化ストレス介入治療の可能性に関する検討

i) NASH 肝細胞癌モデル：酸化ストレス除去剤としてのビタミンEとミトコンドリア機能補助薬としてのカルニチンの肝発癌に対する効果は、カルニチンでのみ肝腫瘍数が少ないという結果であった。



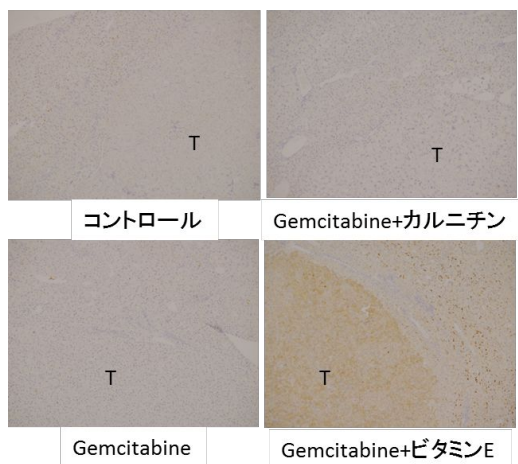
ii) 胆管癌モデル：抗癌剤 Gemcitabine にビタミンEとカルニチンを併用した場合、腫瘍数は有意差ないが、癌幹細胞がビタミンEで

増加傾向となった。



癌幹細胞分画がビタミン E 投与群で増加する傾向となった原因を探る為、癌及び周辺組織における抗酸化力マーカーHO-1 免疫染色を行った。非腫瘍部・腫瘍部ともに HO-1 はビタミン E により増強しており、特に腫瘍部での抗酸化力増強が癌細胞の幹細胞化を助けている可能性があるのではないかと考えられた。

HO-1 staining 抗酸化マーカー



(3) まとめ

臨床像より、肝細胞癌・胆道癌患者の共通した特徴として抗酸化力の低下が存在する事が判明した。動物実験より酸化ストレス除去剤よりもミトコンドリア機能補助などの薬剤のほうが発癌及び癌幹細胞化(悪性化)の抑制に有用である可能性が高いと考えられた。NASH 治療に用いられているビタミン E に関しても肝硬変が進行した発癌リスクの高い状態において慎重な投薬が必要と考えられた。

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 10 件)

Utsumi M, Takaki A, Umeda Y, Koike K, Napier SC, Watanabe N, Shinoura S, Yoshida R, Nobuoka D, Yasunaka T, Oto T, Araki M, Yamamoto K, Fujiwara T, Yagi T. Early Chimerism After Liver Transplantation Reflects the Clinical Course of Recurrent Hepatitis C. *Ann Transplant*. 2017; 22: 156-165. 査読有

Shimomura Y, Takaki A, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, Maruyama T, Tamaki N, Uchida D, Onishi H, Kuwaki K, Nakamura S, Nouse K, Miyake Y, Koike K, Tomofuji T, Morita M, Yamamoto K, Okada H. The Serum Oxidative/Anti-oxidative Stress Balance Becomes Dysregulated in Patients with Non-alcoholic Steatohepatitis Associated with Hepatocellular Carcinoma. *Intern Med*. 2017; 56(3): 243-251. 査読有

Wada N, Takaki A, Ikeda F, Yasunaka T, Onji M, Nouse K, Nakatsuka A, Wada J, Koike K, Miyahara K, Shiraha H, Yamamoto K, Okada H. Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*. 2017; 11(1): 115-124. 査読有

Kono Y, Kawano S, Takaki A, Shimomura Y, Onji M, Ishikawa H, Takahashi S, Horii J, Kobayashi S, Kawai D, Yamamoto K, Okada H. Oxidative stress controlling agents are effective for small intestinal injuries induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017; 32(1): 136-145. 査読有

Uchida D, Takaki A, Ishikawa H, Tomono Y, Kato H, Tsutsumi K, Tamaki N, Maruyama T, Tomofuji T, Tsuzaki R, Yasunaka T, Koike K, Matsushita H, Ikeda F, Miyake Y, Shiraha H, Nouse K, Yoshida R, Umeda Y, Shinoura S, Yagi T, Fujiwara T, Morita M, Fukushima M, Yamamoto K, Okada H. Oxidative stress balance is dysregulated and represents an additional target for treating cholangiocarcinoma. *Free Radic Res*. 2016; 50(7):732-43. 査読有

Nakatsuka A, Matsuyama M, Yamaguchi S, Katayama A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Ogawa D, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Watanabe E, Wada J. Insufficiency of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is risk for lean non-alcoholic steatohepatitis.

Sci Rep. 2016; 6: 21721. 査読有

Katayama A, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Kanzaki M, Nunoue T, Hida K, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, **Takaki A**, Yamamoto K, Kiyonari H, Makino H, Wada J.

Beneficial impact of Gpnmb and its significance as a biomarker in nonalcoholic steatohepatitis.

Sci Rep. 2015; 5: 16920. 査読有

Takaki A, Yamamoto K.

Control of oxidative stress in hepatocellular carcinoma: Helpful or harmful? (Review)

World J Hepatol. 2015; 7:968-79. 査読有

Matsushita H, Miyake Y, **Takaki A**,

Yasunaka T, Koike K, Ikeda F, Shiraha H, Nouse K, Yamamoto K.

TLR4, TLR9 and NLRP3 in biliary epithelial cells of primary sclerosing cholangitis: relationship with clinical characteristics.

J Gastroenterol Hepatol. 2015; 30(3): 600-8. 査読有

Ishikawa H, **Takaki A**, Tsuzaki R, Yasunaka T, Koike K, Shimomura Y, Seki H, **Matsushita H**, Miyake Y, Ikeda F, Shiraha H, Nouse K, Yamamoto K.

L-carnitine prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis in a mouse model with upregulation of mitochondrial pathway.

PLoS One. 2014; 9(7): e100627. 査読有

[学会発表](計 10 件)

和田望, **高木章乃夫**, 岡田裕之

インスリン抵抗性と腸内細菌の非アルコール性脂肪性肝炎への関与についての検討

第 53 回日本消化器免疫学会総会 大阪 2016 年 7 月 14 日~15 日

シンポジウム 1 『NASH/NAFLD の基礎と臨床~病態解明に向けた新たな展開~』

河野吉泰, **高木章乃夫**, 川野誠司

NSAIDs 長期内服者における酸化ストレス状態とカプセル内視鏡所見についての検討

第 91 回日本消化器内視鏡学会総会 東京 2016 年 5 月 12 日~14 日

ワークショップ 2 『薬剤性消化管傷害の現状と対策 食道・胃・小腸・大腸』

和田望, **高木章乃夫**, 岡田裕之

インスリン抵抗性と TLR2 刺激の非アルコール性脂肪性肝炎病態への関与

第 102 回日本消化器病学会総会 東京

2016 年 4 月 21 日~23 日

プレナリーセッション 『NAFLD・肝線維化』

内田大輔, **高木章乃夫**, 友野靖子

胆管癌における酸化ストレスと便中胆汁酸の関連性の検討

第 19 回日本肝臓学会大会 東京

2015 年 10 月 8 日~11 日

ワークショップ 12 『消化器疾患と胆汁酸-病態・診断・治療への関わり』

内田大輔, **高木章乃夫**, 友野靖子:

胆管癌における酸化ストレスの関与と糖尿病関連肝内胆管細胞癌モデルにおける酸化治療の有用性

第 51 回日本肝臓学会総会 熊本

2015 年 5 月 21 日~22 日

ワークショップ 11 『肝内胆管癌の治療戦略』

河野吉泰, **高木章乃夫**, 川野誠司:

マウスモデルを用いた NSAIDs 起因性小腸粘膜障害に対する抗酸化治療の有効性に関する検討

第 101 回日本消化器病学会総会 仙台

2015 年 4 月 23 日~25 日

ワークショップ 4 『小腸疾患: 病態解明への新たな知見』

Kono Y, **Takaki A**, Kawano S, Okada H.

Oxidative Stress Controlling Agents Are Effective for NSAIDs-Induced Small Intestinal Injuries

Digestive Disease Week 2016, San Diego May, 2016

Wada N, **Takaki A**, Okada H.

Serum IP-10 is a highly sensitive marker for discriminating non-alcoholic fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis

Digestive Disease Week 2016, San Diego May, 2016

Uchida D, **Takaki A**, Tomono Y, Fukushima M, Yamamoto K.

Oxidative stress balance is dysregulated in cholangiocarcinoma that could be improved with L-carnitine administration

Digestive Disease Week 2015, Washington DC May, 2015

Ishikawa H, **Takaki A**, Yamamoto K:

L-carnitine prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis in a mouse model with upregulation of mitochondrial pathway.

AASLD The Liver Meeting 2014, Boston November, 2014.

〔図書〕(計 3 件)

Takaki A, Uchida D, Yamamoto K.
Chapter 12. Redox signaling in NASH. (分担)
Liver pathophysiology -Therapies &
Antioxidants. Muriel P (ed), Elsevier
Academic Press. 169-180, 2017.

Adachi T, Takaki A, Okada H. Chapter 1.
The effect of carnitine supplementation on
hepatic encephalopathy (HE) and
non-alcoholic steatohepatitis (NASH). (分担)
Advances in Medicine and Biology. Leon V.
Berhardt (ed), Nova Biomedical 1-16, 2016.

Takaki A, Wada N, Yamamoto K.
Immune mechanisms in non-alcoholic
steatohepatitis (NASH). (分担)
Research on Immunology. ISBN:
978-1-922227-91-1. iConcept Press. 92-115,
2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

高木 章乃夫 (TAKAKI, Akinobu)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
准教授
研究者番号：80359885

(2) 研究分担者

太田 成男 (OHTA, Shigeo)
日本医科大学・大学院医学研究科 教授
研究者番号：00125832

渡辺 信和 (WATANABE, Nobukazu)
独立行政法人国立病院機構(九州がんセン
ター臨床研究センター)・細胞治療科医長
研究者番号：10334278

恩地 正浩 (ONJI, Masahiro)
岡山大学医学部・客員研究員
研究者番号：20727391

松下 浩志 (MATSUSHITA, Hiroshi)
岡山大学医学部・客員研究員
研究者番号：20786107

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし