

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461024

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎における幹細胞関連遺伝子の発現状況と発癌機構の解明

研究課題名(英文) Expression status of stemness-related genes in nonalcoholic steatohepatitis and clarification of the carcinogenesis mechanism

研究代表者

小木曾 智美 (Kogiso, Tomomi)

東京女子医科大学・医学部・准講師

研究者番号：10318082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1)非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝組織では、Nanog は85%、EpCAMは45%に発現を認めた。2)肝線維化の軽度群(20%)と高度群(80%)の比較では、高度線維化群でEpCAM発現が高度であった。癌部でのNanog発現増強例はNASH-肝癌(HCC)に有意であり、NASH-HCCでの発癌機構に重要であると考えられた。3) iTRAQを用いた蛋白の相対定量解析で、現在までに約4000例の蛋白を抽出した。現在、個々の蛋白の相対比較を行い、有意性の検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：1)Nanog was expressed in 85% of liver tissue from patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and EpCAM was expressed in 45%. 2) A comparison of clinical parameters between patients with strongly positive/weakly positive Nanog expression revealed total-bilirubin of 0.9/0.4 mg/dL, alanine transaminase of 47/22 U/L, prothrombin time (PT) of 84/100%, and fasting blood sugar of 104/227 mg/dL with significant differences ($p < 0.05$). PT% was higher in the weakly positive EpCAM group (81/98%) than that in the strongly positive EpCAM group. 3) EpCAM expression was higher in advanced fibrosis cases. Nanog expression was higher in cases of NASH-hepatocellular carcinoma (HCC); therefore, it may be important in the initiation of HCC. 4) The iTRAQ technique, which detects protein expression, led to the detection of 4,000 candidate proteins. Each protein was evaluated for its role in HCC initiation and progression.

研究分野：肝臓病学

キーワード：steatohepatitis stemness marker hepatocellular carcinoma

1. 研究開始当初の背景

わが国の肝細胞癌の基盤肝疾患は、ウイルス性から非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) へと変わりつつある。我々は NASH を基盤とした肝硬変の肝癌の5年発癌率は11.3%と報告し、本邦の全国集計では肝癌の2.0%が NASH からの発癌と推定されている。20-30年後には肝癌の主要な要因であるC型肝炎を抜き、肝癌発生母地として最も高頻度となることが予測される。肝癌研究はウイルス性を中心に進められており、NASH肝癌(NASH-HCC)の発癌機構を明らかにすることが急務である。NASH-HCCは、形態学的にはHCV由来の肝癌(HCV-HCC)と同様、孤発が多く、肉眼型は索状、分化度は中分化が多い。しかし、腫瘍マーカーはNASH-HCCではAFPの上昇がHCV-HCCと比較し低値であり、むしろPIVKA-IIが上昇するなど癌部での分泌蛋白が異なることが推定される。また、非硬変肝からの発癌の報告もあり、背景肝の発癌における役割は両者で異なることが推定され、基礎肝病変の研究も肝癌の発癌や増殖機構の理解において重要であると考えられる。

肝発癌においては、多分化能と自己複製能の両方の性質を併せもつ幹細胞が重要な役割を担い、これらCancer stem cellから癌は発育・進展とする仮説が提唱されている。近年肝癌において多能性幹細胞の分子マーカーの1つであるNanog遺伝子が、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 受容体シグナル経路を介した癌幹細胞の自己再生に関与していると報告され、特にインスリンシグナルの制御と癌化との関連が示唆されている。さらに既存のCancer stem cell markerであるCD133陽性細胞群で、Nanog遺伝子のdemethylationを認めていることや、同じく多能性幹細胞の分子マーカーの1つであるOct4遺伝子発現が増強し、肝癌再発に関わっているとの報告もあるなど、肝癌においても多能性幹細胞の存在が推定されるが、NASH-HCCにおける検討は不十分である。

また、NASH-HCCでは、肥満やインスリン抵抗性により誘導される炎症性サイトカイン、活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)による酸化ストレスが発癌と関係していると報告されている。MakiらはC型肝炎を基盤として発症した肝癌治療切除標本を用いて、非癌部の8-OHdGと脂質過酸化による産生物質であるtrans-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)の組織染色のレベルの高いもので肝癌の再発を認めたと報告しており、肝発癌に寄与する可能性が示唆されるが、いずれもNASH-HCCでの役割は明らかではない。

2. 研究の目的

胚性幹細胞の特徴である多分化能と自己複製能の維持に関与するstemness遺伝子であるNanogやEpCAMが肝線維化の程度や肝発癌と相関するか、肝発癌・進展における誘導因子は何かを検討するために、研究を行った。

3. 研究の方法

当院でNASH患者620例以上を加療し、44例に肝癌を認めた。そのうち肝切除を施行した症例を対象として、年齢、性別、血液検査成績、肝癌の個数、腫瘍径、分化度など臨床病理学的に患者背景を検討した。また、コントロールとしてはC型肝炎を基盤に肝癌を発症し、同様に肝切除を施行した症例を用いた。肝癌の癌部・非癌部においてOct4・Nanogなどのstemness markerの局在を免疫染色にて病理組織学的に検討した。また、ストレスマーカーとして8-OHdG、細胞障害性脂質過酸化の指標である4-HNE、サイトカインや増殖因子により発現が誘導されるシクロオキシゲナーゼの1つであるCOX2、スーパーオキシドの消去に働くMn-SOD、フリーラジカル的一种であるNOの誘導合成酵素であるiNOSの発現を免疫組織学的に検討した。

1) HCV-HCCとNASH-HCCの外科的切除標本を用い、癌部・非癌部における発現遺伝子の相違を免疫組織染色を用いて検討し、肝発癌・進展における誘導因子を同定する。2) stemness遺伝子-インスリンシグナル-酸化ストレスによる発癌仮説を証明する。3) これら遺伝子のコードする蛋白発現を検討するために、肝切除時に摘出した肝癌の癌部・非癌部の凍結標本の一部をホモジナイズし、iTRAQ®を用いた相対定量で解析する。iTRAQ®とは、2004年にApplied BiosystemsのPhilip L. Rossらが発表したもので、複数のサンプル間でタンパク質の存在量を網羅的に比較することができる。これらの手法を用いて研究を行った。

4. 研究成果

1) NASH肝組織では、Nanogは85%、EpCAMは45%に発現を認めた。Oct3/4はほとんど発現せず、SOX9は90%以上に発現していた。

2) Nanog発現が強陽性群(80%)とその他群(20%)の臨床検査値の比較では、T-BIL (0.9/0.4 mg/dL)、ALT (47/22 U/L)、PT% (84/100%)、FBS (104/227 mg/dL)に有意差を認めた($p < 0.05$)。EpCAM発現が強陽性群(40%)とその他群(60%)の比較では、PT% (81/98%)に有意差を認めた($p < 0.01$)。3) 線維化の軽度群(20%)と高度群(80%)の比較では、高度線維化群でEpCAM発現が高度であった。活動性の軽度群(40%)と中-高度群(50%)の比較では、幹細胞マーカーの染色性に有意差は認めなかった。癌部でのNanog発現増強例はNASH-HCCに有意であり、NASH-HCCでの発癌機構に重要である可能性が高いと考えられた。4) iTRAQ®を用いた蛋白の相対定量解析で、現在までに約4000例の蛋白を抽出した。現在、個々のたんぱく質の相対比較を行い、有意性の検討を行っている。

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 14 件)

Kogiso T, Yamamoto K, Kobayashi M, et al. Response to tolvaptan and its effect on prognosis in cirrhotic patients with ascites. *Hepatol Res*. 査読有 2016. in press doi: 10.1111/hepr.12822.

Chishima S, Kogiso T, Matsushita N, et al. The Relationship between the Growth hormone/Insulin-like Growth Factor System and the Histological Features of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Intern Med*. 査読有 56: 2017:473-480. doi: 10.2169/internalmedicine.56.7626.

Kogiso T, Hashimoto E, Ito T, et al. Successful treatment of ascites using a Denver® peritoneovenous shunt in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and Budd-Chiari syndrome. *Intern Med*. 査読有 55: 2016: 2957-2963.

Kogiso T. Clinical Importance of Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. Topics: IV. Relation of NAFLD with lifestyle-related disease including obesity, dyslipidemia and hypertension. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*. 査読無 105: 2016: 31-7.

Kogiso T, Tokushige K, Hashimoto E, et al. Safety and efficacy of long-term tolvaptan therapy for decompensated liver cirrhosis. *Hepatol Res*. 査読有 46: 2016: E194-200. doi: 10.1111/hepr.12547.

Ikarashi Y, Kogiso T, Hashimoto E, et al. Four cases of type 1 diabetes mellitus showing sharp serum transaminase increases and hepatomegaly due to glycogenic hepatopathy. *Hepatol Res*. 査読有 2016 in press. doi: 10.1111/hepr.12713.

Tokushige K, Hyogo H, Nakajima T, Ono M, Kawaguchi T, Honda K, Eguchi Y, Nozaki Y, Kawanaka M, Tanaka S, Imajo K, Sumida Y, Kamada Y, Fujii H, Suzuki Y, Kogiso T, Karino Y, Munekage K, Kuromatsu R, Oeda S, Yanase M, Mori K, Ogawa Y, Seko Y, Takehara T, Itoh Y, Nakajima A, Kanemasa K, Nishino K, Masaki N, Takahashi H, Seike M, Torimura T, Saibara T, Toyota J, Chayama K, Hashimoto E. Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease: multicenter survey. *J Gastroenterol*. 査読有 51: 2016: 586-96. doi: 10.1007/s00535-015-1129-1.

Kogiso T, Hashimoto E, Yamamoto K, et al. Daclatasvir/Asunaprevir Therapy Provides High Tolerability and Effectiveness for HCV-Positive Kidney Transplant Recipients. *Journal of Liver: Disease & Transplantation*. 2015.

Kogiso T, Hashimoto E, Ikarashi Y, et al. Spontaneous clearance of HCV accompanying hepatitis after liver transplantation. *Clin J Gastroenterol*. 査読有 8:2015: 323-9. doi: 10.1007/s12328-015-0602-y.

Kogiso T, Tokushige K, Hashimoto E, et al. Mycophenolate mofetil may induce prolonged severe anemia during pegylated-interferon/ribavirin/simeprevir therapy in liver transplant recipients. *Clin J Gastroenterol*. 査読有 8:2015: 156-61. doi: 10.1007/s12328-015-0570-2.

Kogiso T, Tokushige K, Hashimoto E, et al. Primary hyperoxaluria complicated with liver cirrhosis: A case report. *Hepatol Res*. 査読有 45:2015: 1251-5. doi: 10.1111/hepr.12494.

Kogiso T, Nagahara H, Hashimoto E, et al. Efficient induction of apoptosis by wee1 kinase inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 査読有 9:2014:e100495. doi: 10.1371/journal.pone.0100495. eCollection 2014.

Matsushita N, Hashimoto E, Tokushige K, Kodama K, Tobarai M, Kogiso T, Torii N, Taniai M, Shiratori K, Murayama H. Investigation of ornithine carbamoyltransferase as a biomarker of liver cirrhosis. *Matsushita N, Intern Med*. 査読有 53:2014: 1249-57.

小木曾智美, 橋本悦子, 徳重克年ら. 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)における性差と年齢の関与 -生活習慣病、脂肪測定、アディポサイトカイン、遺伝子多型を中心に - 肝臓 査読有 55:2014: 199-205.

<http://doi.org/10.2957/kanzo.55.199>

〔学会発表〕(計 16 件)

小木曾智美, 江川裕人, 徳重克年. ワークショップ 移植後の原発性胆汁性肝硬変再発におけるリスク因子の検討 第58回日本消化器病学会大会 2016年11月神戸コンベンションセンター(神戸)

Kogiso T, Egawa H, Hashimoto E, Tokushige K, Sakisaka S, Teramukai S, Sakabayashi S, Yamamoto M, Umeshita K, Uemoto S. Risk factors of primary biliary cholangitis (PBC) recurrence after liver transplantation in female

patients: A Japanese multicenter retrospective study. The 67th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Nov., 2016. Boston (U.S.A.)

小木曾智美、橋本悦子、徳重克年. NASH 発症・進展に関する遺伝的バックグラウンドの検討 第 52 回日本肝臓学会総会 2016 年 5 月 ホテルニューオータニ幕張 (千葉)

小木曾智美、橋本悦子、五十嵐悠一、児玉和久、谷合麻紀子、鳥居信之、徳重克年 腎移植後 C 型肝炎ウイルスに対するインターフェロンフリー治療の有効性と安全性の検討 第 102 回日本消化器病学会総会 2016 年 4 月 京王プラザホテル (東京)

Kogiso T, Hashimoto E, Kuniko Y, Ikarashi Y, Kodama K, Torii N, Taniai M, Tokushige K. An efficacy and safety of daclatasvir/asunaprevir therapy for HCV-positive kidney transplantation. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Feb., 2016. Tokyo (Japan)

Kogiso T, Hashimoto E, Hyogo H, Nakajima T, Ono M, Kawaguchi T, Honda K, Eguchi Y, Nozaki Y, Kawanaka M, Imajo K, Sumida Y, Kamada Y, Fujii H, Suzuki Y, Tokushige K. Risk factors for hepatocellular carcinoma recurrence in patients with nonalcoholic and alcoholic fatty liver diseases: A Japanese multicenter survey. The 66th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Nov., 2015. San Francisco (U.S.A)

小木曾智美、徳重克年、橋本悦子、児玉和久、戸張真紀、谷合麻紀子、鳥居信之、白鳥敬子 肝硬変に伴う腹水に対するトルバプタン治療の長期経過の検討 第 51 回日本肝臓学会総会熊本 2015 年 5 月 ホテル日航熊本など (熊本)

小木曾智美、徳重克年、橋本悦子、五十嵐悠一、児玉和久、谷合麻紀子、鳥居信之、白鳥敬子、江川裕人、山本雅一 移植後の C 型肝炎ウイルス再感染の経過 第 101 回日本消化器病学会総会 2015 年 4 月 仙台国際センター (仙台)

Kogiso T, Hashimoto E, Tokushige K. The histological course of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of sequential liver biopsies. 第 19 回日本肝臓学会大会、第 57 回消化器病学会大会: 第 23 回日本消化器関連学会週間 2015 年 10 月 グランドプリンスホテル新高輪・国際館パミール・グランドプリン

スホテル高輪 (東京)

Kogiso T, Hashimoto E, Kodama K, Ikarashi Y, Torii N, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K. Resistance to TGF-beta-induced apoptosis is not associated with the de-differentiation in hepatocellular carcinoma. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2015, Apr., 2015. Philadelphia (U.S.A.)

小木曾智美、徳重克年、橋本悦子. 成人急性肝不全に対する生体部分肝移植の検討 第 40 回日本肝臓学会東部会 2014 年 11 月 京王プラザホテル (東京)

Kogiso T, Taniai M, Hashimoto E. Cancer stem cell marker expression and their clinicopathological features in NASH patients with hepatocellular carcinoma. The 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Gastroenterological Carcinogenesis. Nov., 2014. Fukuoka (Japan)

Kogiso T, Hashimoto E, Kodama K, Tobarai M, Matsushita N, Torii N, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K. Differential expression of cancer stem cell markers and their clinicopathological features in hepatocellular carcinoma patients with different etiologies. American Association for Cancer Research (AACR), Apr., 2014. San Diego (U.S.A.)

小木曾智美、徳重克年、橋本悦子. 肝硬変による難治性腹水に対するトルバプタンの有効性およびその効果予測因子に関する検討 第 18 回日本肝臓学会大会、第 56 回日本消化器病学会大会 2014 年 10 月 神戸国際展示場など (神戸)

小木曾智美、谷合麻紀子、橋本悦子. 幹細胞マーカー発現から見た非アルコール性脂肪性肝炎の病態の臨床病理学的検討 第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 ホテルニューオータニ (東京)

小木曾智美、徳重克年、橋本悦子、児玉和久、戸張真紀、谷合麻紀子、鳥居信之、白鳥敬子、江川裕人、山本雅一. 当院における成人急性肝不全に対する生体部分肝移植の検討 第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月 東京国際フォーラム (東京)

〔図書〕(計 3 件)

小木曾智美. Annual Review 2016 NAFLD 研究と臨床の進歩 日本内科学会雑誌第

105 卷第 1 号 2016

小木曾智美、徳重克年、橋本悦子. 肝性浮腫 病態・診断・薬物療法 トルバプタンの効果予測因子 Fluid management renaissance メディカルレビュー社 4: suppl.: 2014:95-102.

小木曾智美、谷合麻紀子、橋本悦子. PBC の診断 第 4 巻『難治性肝疾患の診療を極める』Hepatology Practice II 診断編 文光堂 4:2014:62-5.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小木曾 智美 (KOGISO Tomomi)
東京女子医科大学・消化器内科・准講師
研究者番号 : 10318082

(2)研究分担者

橋本 悦子 (HASHIMOTO Etsuko)
東京女子医科大学・消化器内科・教授
研究者番号 : 40130273

(3) 研究分担者

山本 雅一 (YAMAMOTO Masakazu)
東京女子医科大学・消化器外科・教授
研究者番号 : 60220498