

厚生労働省科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
「末期肝硬変に対する治療に関する研究」
平成 16 年度分担研究報告書

末期肝硬変の治療アルゴリズムにおける生体肝移植前の抗ウイルス療法

研究分担者：市田 隆文

順天堂大学医学部附属消化器内科（順天堂静岡病院）教授

研究要旨：わが国の生体肝移植レシピエントを調査し、肝細胞癌を合併する肝炎ウイルス陽性レシピエントを除いた慢性肝不全症例を retrospective に検討し、末期肝硬変に対する治療アルゴリズムにおける生体肝移植の位置づけを考察した。ここで取り上げたウイルス性末期肝硬変の肝移植前の抗ウイルス療法の有無と治療効果を検討し、さらに術後肝炎ウイルスの再発によるグラフトの正着率に関係する因子を検討した。その結果、大半の症例で C 型肝硬変では過去の抗ウイルス治療の既往があり、すべて無効例であった。一方、B 型肝硬変は前例に抗ウイルス療法を術前から術後まで継続して投与を受け、そのグラフト生着率はきわめて高かった。

さらに、今期は再発する C 型肝炎ウイルスグラフト肝臓を用いた、網羅的遺伝子解析を行い、連続解析結果を踏まえて、いくつかの有力な遺伝子群の同定を試みたが、時間的制約から、継続調査が必要と考え、症例数を増やした検討が、遺伝子相関としての因子を導き出すものと考えられた。

A. 研究目的

生体肝移植を施行したウイルス性肝硬変を日本肝移植研究会の基本資料から抽出し、班研究として当班員がアンケート調査を施行し、集計した生体肝移植レシピエントの術前、術後状態を検討し、末期肝硬変の治療アルゴリズムに生体肝移植が如何に寄与し、どのような問題点が存在し、それが治療アルゴリズムに如何に影響を与えるかを検討した。ならびに、自験例を合わせて、検討した。

B. 研究方法

わが国における生体肝移植の実態調査を日本肝移植研究会の資料を基に独自のアンケート調査を施行し、特に肝細胞癌の合併を

示さない純粹に末期肝硬変で生体肝移植が施行された症例を抽出して、その術前状況と術後成績ならびに死因を検討し、末期肝硬変の治療アルゴリズムとして生体肝移植が如何に寄与するか検討した。対象はウイルス性肝硬変 30 例である。

C. 研究結果

生体肝移植を受けたウイルス性肝硬変の抗ウイルス療法の既往は全例に認められ、HCV に関しては、過去の短期間インターフェロン治療、HBV に関しては術直前の短期間投与が特徴的であった。HCV に関してはすべての症例でインターフェロン治療を受けていたが、いずれもウイルスを排除することは出来ず、むしろ治療後短期間に慢性肝炎から肝硬変に進展し、生体肝移植を受けて

いた。一方、HBV に関しては、抗ウイルス療法はいずれも、慢性肝炎の時期には受けておらず、生体肝移植の適応を評価した後に、肝移植の前から経口投与を受け、その後も継続して、抗ウイルス療法を受けている。このことより、HBV と HCV では、根本的に生体肝移植前の抗ウイルス療法の目的が異なっていることが判明した。

HCV は全例で生体肝移植後、再感染し、5 例に短期間に重症型肝炎を惹起し、3 例に二年以内での肝硬変の進展を見た。

これら、短期間に重症型肝炎や肝硬変へ進展するグラフト肝臓を生検し、DNA 解析を行い、その検出遺伝子を 30 項目の関連遺伝子群に分類し、連続解析を行い、重症化の関連遺伝子の抽出を図ったが、症例数が少なく、有意な連続解析を得ることは困難であったが、傾向は十分に認められ、さらに症例の増加が急務と考えられた。

D. 考察

ウイルス性肝硬変の治療アルゴリズムにおける生体肝移植の位置付けは極めて重要である。特に、抗ウイルス療法を肝硬変の時期に行うことの意義と生体肝移植への橋渡しだが、如何なる基準で行うか、客観的事実がないのが現状である。肝硬変に対して抗ウイルス療法を行うことで、肝移植まで行わなくてすむのか、retrospective なレシピエントの検討がさらに必要である。

E. 結論

末期肝硬変に対する治療アルゴリズム構築では、抗ウイルス療法の位置づけが重要となる。今回、アルゴリズム構築のための肝硬変に対する抗ウイルス療法のエビデンスを得るための解析を班員全員で行っているが、未解決である。また、肝移植後の重症型肝炎や肝硬変への短期移行は、生体肝移植の適応を考慮すると negative な材料になる。そのためにも、遺伝子解析を含めた、生体肝移植後の予後予測も必要になるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeishi T, Sato Y, Ichida T, Yamamoto S, Hirano K, Kobayashi T, Watanabe T, Hatakeyama K. Rapid progressive hepatitis C after liver transplantation: a case report. *Transplant Proc.* 2004 ; 36: 2304
2. Yamamoto S, Sato Y, Ichida T, Kurosaki I, Nakatsuka H, Hatakeyama K: Acute renal failure during the early postoperative period in adult living-related donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 1815-1819.
3. 市田隆文, 嶋田裕慈. 肝細胞癌に対する肝移植 Explant liver と画像所見の一致率. *肝胆膵* 2004; 49: 575-579.
4. Ikai I, Arii S, Kojiro M, Ichida T, Makuuchi M, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Okita K, Omata M, Takayasu K, Yamaoka Y: Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer* 2004; 101: 796-802
5. 市田隆文: 肝移植より変貌を遂げた肝臓病診療. *新潟医学会誌.* 2004; 118: 327-332.
6. 市田隆文, 石川雅邦, 渋谷智義, 小川薫: 原発性胆汁性肝硬変、外科 2004; 66: 1055-1060.
7. 市田隆文, 嶋田裕慈, 石川雅邦, 渋谷智義, 小川薫: 原発性硬化性胆管炎と原発性胆汁性肝硬変の肝移植と再発問題. *肝胆膵* 2004; 49: 251-255.
8. Sato Y, Watanabe H, Ichida T, Yamamoto S, Nakatsuka H, Oya H, Kameyama H, Watanabe T, Shimamura K, Abo T, Hatakeyama K: Wall shear stress and intrahepatic leukocytes of graft in living related donor liver

transplantation.
Hepatogastroenterology. 2004; 51:
329-333.

9. 市田隆文：シャーロック肝臓病学
翻訳、西村書店、監訳小俣政男、
肝硬変 pp315-328、2004年
10. 日本肝移植研究会ドナー安全対策
委員会（清澤研道、市田隆文(文責)、
梅下浩司、川崎誠治、溝上雅史、
持田 智、矢永勝彦、中沼安二、
米本昌平）生体肝移植ドナーが肝
不全に陥った事例の検証と再発予
防への提言. 移植 2004; 39: 47-55.
11. 市田隆文、川崎誠治：肝細胞癌、
コンセンサス 2004 肝疾患治療、各
務伸一監修、編集市田隆文、岡上
武、川崎誠治、熊田博光、佐田通
夫、林紀夫、アークメディア、東
京、2004年、57-74頁.
12. Sato Y, Ichida T, Watanabe H,
Yamamoto S, Abo T, Hatakeyama K.
Macrochimerism of donor type CD56+
CD3+ T cells in donor specific
transfusion via portal vein following
living related donor liver
transplantation.
Hepatogastroenterology. 2003; 50:
2161-2165.

2.学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定
を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
「末期肝硬変に対する治療に関する研究」
平成 16 年度分担研究報告書

肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法のための基盤研究

研究分担者：沖田 極

山口大学医学部附属病院病院長、山口大学医学部消化器病態内科学教授

研究要旨 我々はより多くの肝不全患者を救命するために、生体肝移植前に行うブリッジ的な治療法として『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発を進めたいと考え研究を行ってきた。(自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法)の臨床応用を進める基盤モデルとして骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル(GFP/CCI4 モデル)の開発し、骨髄細胞が持続的肝障害の肝硬変時に肝臓に遊走され肝細胞へ分化・増殖することを明らかにした(JB 2003、特公 2003-70377)。さらにこのモデルの解析を通じ、骨髄細胞移植により生存率の回復、また肝線維化の改善を発見した(Hepatology 2004, この発見はWiley社よりHepatology News Alert 記事とし世界に発信された)。さらに骨髄細胞を用いた再生療法をより効率的に行うための骨髄細胞の肝細胞への分子制御機構をMicro array-Self Organization Map(SOM)解析法にて解析した(FEBS letters 2004, 生データは<http://liver-project.med.yamaguchi-u.ac.jp/research>のサイトにて公開している。)。また我々の開発したLiv8抗体は骨髄中の肝再生に有効な細胞分画の分離に有効であることが明らかになった(BBRC 2004)。今後は抗原同定を進め人抗体を作ることで、効率的な再生療法の臨床開発を目指す。

共同研究者
坂井田 功 (山口大学医学部消化器病態内科学助教授)
寺井 崇二 (山口大学医学部消化器病態内科学助手)

A. 研究目的

C型肝炎の蔓延とともに近年肝疾患が増加している。それとともに肝不全(肝硬変、肝癌、劇症肝炎)患者が増加している。現在肝不全患者に対しては日本においては生体肝移植が行われているが、手術侵襲の問題、ドナーの問題などまだまだ障害が多い。また今後高齢者を対象とした医療を行うには、より侵襲の少ない移植にかわる次世代の再生医療技術の開発が急務である。人剖検例において骨髄中に存在する細胞が肝細胞へ分化転換することが報告された。また肝臓は胎児期において二次造血の場であるなど、骨髄細胞から肝細胞への分化の可塑性は存在すると考えられる。我々はその機序を解明し、さらに実際に人の治療に応用するために、骨髄細胞から肝細胞への分化転換についてその機序を解明するために、

GFP/CCI4 model を用い、基礎的検討を進めてきた。

B. 研究方法

基礎研究

GFP/CCI4 モデルの解析を通じ以下の基礎研究を行った
(J Biochem 2003 Oct;134(4):551-8. 特公 2003-70377)。

※骨髄細胞の肝細胞への分化に関与する

細胞外マトリックスの解析と肝線維化改善効果に対する解析
骨髄細胞の投与により、肝線維化の改善が認められたことより、この機序についてさらに解析する。実際に Matrix Metalloproteinase(MMP)-9 の発現が増加していたことよりさらに In situ zymography を行い肝線維化改善について評価した。

※骨髄細胞の肝細胞への分化に関与する遺伝子群の解析
効率的な骨髄細胞の肝細胞への分化制御機

構を解析するために、すでに開発した GFP/CCl4 モデルの解析を通じて、骨髄由来幹細胞の肝細胞への分化過程に関与する遺伝子群を同定する。DNA chip を用いた Micro array により遺伝子発現のプロファイリングを行い、さらに統計学的理論の一つである Self Organization Map(SOM)解析を用い遺伝子群を抽出した。

※胎児肝特異抗体の認識する抗原分子の同定
既に作製済みの 10 種類以上の胎児肝を認識するモノクローナル抗体のうち、特に Liv8 抗体の抗原については、骨髄中の肝幹細胞の同定に使用できる抗体になりえるかを評価した。

C. 研究結果

*骨髄細胞の肝細胞への分化に伴う肝線維化の改善
GFP/CCl4model において骨髄細胞の肝細胞への分化とともに、シリウスレッド染色での評価により肝線維化が改善していた。この結果は骨髄細胞の投与による肝硬変症に対する肝線維化改善効果というあらたな可能性を示した。

*骨髄中の肝臓再生に有用な細胞群
胎児肝特異的な分子マーカーを単離する目的で、胎生期 11.5 日(E11.5)のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製してきた。抗 Liv2 と命名した抗体は、マウス肝芽細胞を特異的に認識する (Dev. Biol. 250, 332-347, 2002)。抗 Liv8 抗体は、CD45 陽性細胞を認識し大きく認識し、血球系細胞と非血球系細胞の分離に有用な抗体である。今回の肝硬変マウスへの移植では骨髄中の Liv8 抗体陰性分画が肝再生、肝線維化改善に有用な細胞群であることが明らかになった。

D. 考察

1. 基礎研究について
骨髄中に肝幹細胞の同定、また分化転換の目的のため、骨髄細胞から肝細胞への in vivo 分化評価モデル(GFP/CCl4 MODEL)を開発しさらに詳細に解析した。さらにこのモデルを基盤とした解析を通じ、骨髄細胞移植により生存率の回復、また肝線維化の改善を発見し、肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の有効性の論理的な根拠を明確にした。さらに骨髄細胞を用いた再生療法をより効率的に行うための骨髄細胞の肝細胞への分子制御機構を Micro array-Self Organization Map(SOM)解析法にて解析した。この遺伝子解析は骨髄細胞が肝細胞

への分化する過程での遺伝子の変化についてまとめたものであり、効率的な肝臓再生療法の開発のため非常に有用なデータベースを今回得ることができた。

E. 結論

我々は基礎研究を基盤とし、Phase I 臨床研究 (平成 15 年 11 月 14 日) を推進している。今後はさらに、基礎、臨床研究の両方を基盤とした『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』を推進し、次世代に有効な治療法にするべく研究を推進していく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

寺井 崇二、坂井田 功、沖田 極
自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床応用研究 (Phase I) 日本消化器病学会誌 Vol 1101, A56
第 90 回日本消化器病学会総会シンポジウム 7
消化器疾患における再生医療応用の現状

寺井 崇二 シンポジウム
自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の基礎的検討と臨床への展開
第 7 回移植遺伝子工学研究会 (当番世話人 磯部 光章、平成 16 年 9 月 16 日)
岡山市コンベンションセンター (第 40 回日本移植学会)

Sakaida I, Shen J, Uchida K, Aoyama K, Ishikawa T, Terai S, Okita K. Leptin enhanced TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. Hepatology 40-4,196A, 2004 (AASLD 2004)

Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Omori K, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Fibroblast growth factors enhance the repopulation and differentiation of bone marrow cells into hepatocyte. Hepatology 40-4,380A, 2004 (AASLD 2004)

Yokoyama Y, Terai S, Omori K, Aoyama K, Ishikawa T, Takami T, Sakaida I, Nishina H, OKita K. Proteomic analysis of serum protein in carbon tetrachloride treated mice transplanted bone marrow cells. Hepatology 40-4, 382A, 2004 (AASLD 2004)

Sakaida I, Tsuchiya M, Okamoto M, Terai S, Okita K. The effect of late evening snack in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 40-4, 632A, 2004 (AASLD 2004)

論文発表

Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada, Sakaida I, Nishina H, Okita K A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *BBRC* 313:1110-1118, 2004

Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. *Life Sci.* 2004 Mar 19;74(18):2251-63

Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics* 2004 Jul;4(7):2111-6.

Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology.* 2004 Dec;40(6):1304-11.

Omori K, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Sakaida I, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett.* 2004 Dec 3;578(1-2):10-20.

Takami T, Terai S, Yokoyama Y, Tanimoto H, Tajima K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I, Nishina H, Thorgeirsson SS, Okita K Human homologue of Maid (HHM) is a useful marker protein in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2005 in press

和文論文

山崎 隆弘、木村 輝昭、浦田 洋平、丸本 芳雄、青山 浩司、石川 剛、田島 邦彦、横山 雄一郎、大森 薫、川口 浩太郎、高見 太郎、土屋 昌子、山口 裕樹、寺井 崇二、黒川 典枝、坂井田 功、沖田 極

肝細胞癌に対する新バルーンマイクロカテーテルを用いたリポドール併用肝動脈バルーン閉塞下ラジオ波凝固療法
肝臓 45-9:505-506, 2004

寺井 崇二、大森 薫、石川 剛、青山 浩司、高見 太郎、横山 雄一郎、田島 邦彦、坂井田 功、沖田 極 自己骨髄細胞に対する肝硬変症に対する肝臓再生療法 治療学 Vol 38-10,114-115, 2004

寺井 崇二、石川 剛、大森 薫、青山 浩司、坂井田 功、沖田 極 骨髄細胞から肝細胞への分化制御機構の解析とその臨床応用 *GI Resaerch* 12:117-125,2004

寺井 崇二、坂井田 功、沖田 極 肝硬変治療の新たなストラテジー—自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法—炎症と免疫 Vol 12-6:66-73, 2004

沖田 極、寺井 崇二、坂井田 功 医学と医療の最前線 骨髄幹細胞移植による肝疾患の治療 日本内科学会誌 2005 in press

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

寺井 崇二、高見 太郎、坂井田 功、沖田 極
特許出願 2004-267065 新規肝細胞癌の腫瘍マーカー抗 HHMIgG の発見

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

本研究プロジェクトで作製された抗 Liv2 抗体と MAP キナーゼ関連分子特異抗体が、2002 年 7 月より (株) 生物医学研究所から発売されている。

厚生労働省科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
「末期肝硬変に対する治療に関する研究」
平成 16 年度分担研究報告書

肝硬変の線維化に対する新たな治療戦略の検索：

肝線維化における酸化ストレスと局所アンギオテンシン・Rho kinase の関与

分担研究者：齋藤英胤

慶應義塾大学内科講師 消化器内科

研究要旨：肝線維化やその原因と考えられる脂肪化における酸化ストレス・レニンアンギオテンシン系の関与を明らかにすることを目的とした。急性肝障害における酸化ストレスの関与をラット四塩化炭素(carbon tetrachloride; 以下 CCl₄)急性肝障害モデルにて検討し、肝線維化・脂肪化のモデルとしてコリン欠乏食ラットを用い、アンギオテンシン系、Rho/Rho kinase 系における酸化ストレスの関与を検討した。その結果、fatty degeneration, necrosis, apoptosis といったいずれの組織学的側面においても酸化ストレスの関与があり、ラジカル消去薬にて組織学的変化が抑制された。その際、炎症にともなうサイトカインの産生がみられ、組織障害の増幅、あるいは線維化亢進を引き起こすことが考えられた。また慢性肝障害における肝線維化、脂肪化に局所アンギオテンシン系の関与が認められ、アンギオテンシンシグナルの下流に Rho シグナルが位置すると考えられた。これら種々因子の阻害薬により組織酸化ストレスが有意に低下し、アンギオテンシン系の組織傷害過程に酸化ストレスが働いていることが示唆された。肝線維化には酸化ストレスを含めた種々の因子が形成する悪性回路が存在していて、治療にはその回路のどこかを断ち切ることが重要と思われた。

研究協力者：多田慎一郎、中本伸宏、北村公美
慶應義塾大学消化器内科

A. 研究目的

肝硬変は慢性肝疾患の最終的な変化であるが、可逆性や肝機能不全を決定するのは組織に蓄積した線維化の程度と考えられる。そのため線維化の阻止、あるいは可能なら蓄積した線維の溶解が望まれる。

薬剤性肝障害、アルコール性肝障害、虚血再還流惹起肝障害をはじめとする種々の肝障害に酸化ストレスやフリーラジカルが

関与することが知られおり、ラジカル生成の抑制が肝疾患の治療において重要である。ビタミン E をはじめとする様々な抗酸化物質による肝障害抑制効果が報告されているが、現時点で臨床的に有用な薬物はほとんどない。近年脳梗塞の治療にフリーラジカル消去剤であるエダラボンの有効性が報告され既に臨床の場において広く使われているが、本薬剤の肝障害に対する効果は不明である。

一方、酸化ストレスと肝脂肪化・線維化との関係は深いとされるが、その詳細な機序は不明である。われわれは肝線維化に局所アンギオテンシンが重要な役割を果たしていることを動物モデルにおいて示したが

1)、このことは酸化ストレスとの関連において肝線維化の機序をさらに複雑にしている。さらに近年、心や腎など他臓器における線維化、リモデリングにおいて Rho/Rho kinase の関与が報告されており²⁾、肝線維化においても伊東細胞の形態変化に関わる重要な経路と思われる。

以上より、肝障害における酸化ストレスの関与を明らかにする目的で、急性肝障害における酸化ストレスの関与をラット四塩化炭素(carbon tetrachloride; 以下 CCl₄)急性肝障害モデルにて検討し、肝線維化・脂肪化のモデルとしてコリン欠乏食ラットを用い、アンギオテンシン系、Rho/Rho kinase 系における酸化ストレスの関与を検討した。

B. 研究方法

B-1. 動物モデル

急性肝障害モデルとしてウィスタ系雄性ラット(200-220g)を用い、慶應義塾大学医学部動物実験委員会の規定に従い実験を施行した。オリーブオイル単独腹腔内投与群(コントロール群)、CCl₄ (1ml/kg)腹腔内投与群、CCl₄ 投与直後、3 時間後にエダラボン(3mg/kg)を尾静脈より静脈内併用投与する群の計 3 群を作成した。CCl₄ 投与 6, 12 時間後に尾静脈より血液を採取し、24, 48 時間後にエーテル麻酔下にラットを屠殺し肝臓の摘出、血液の採取を行った。

慢性肝障害モデルとしてはコリン欠乏食モデル(choline-deficient L-amino acid [CDAA] defined diet) 12 週間投与を用い³⁾、アンギオテンシン系・Rho kinase 系の関与を検討するために AT1 受容体阻害薬 candesartan (Takeda Pharmaceutical Co. Osaka)を 1 mg/kg、あるいは Y276321996 (Mitsubishi Welpharma Co. Osaka)を 1 mg/kg 毎日胃管から投与した。対照として choline-supplemented L-amino acid [CSAA] diet を用いた。

B-2. 評価項目

(1) 血清学的検討として total bilirubin(以下 TB), alanine aminotransferase(以下 ALT), lactate dehydrogenase(以下 LDH) 値を測定した。

(2) 組織学的検討として、HE 染色、oil red O 染色を行い、アポトーシスの検出として TUNEL 染色を施行した。光学顕微鏡下で無作為に選んだ 5 区域につき 500 肝細胞中の TUNEL 陽性細胞数を測定しその平均を apoptotic index とし定量化した。

(3) 脂質過酸化の評価として肝組織中の malondialdehyde(以下 MDA)の定量、4-hydroxynonenal (以下 4-HNE)モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を、DNA 酸化傷害の評価として 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (以下 8-OHdG) モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行った。免疫組織染色は、4 μm パラフィン切片を作成し、2 次抗体に biotinylated rabbit anti-mouse IgG 抗体を用いて avidin-biotin-peroxidase complex 法で行い、その発現強度、部位を検討した。8-OHdG 陽性細胞数は apoptosis 陽性細胞数と同様に 8-OHdG index とし定量化した。

(4) 炎症性サイトカインの評価として、ELISA 法による投与 6, 12, 24 時間後の血清中 TNF-α, IL-6, IL-10 量、RT-PCR 法による 24 時間後の肝組織内 TNF-α, IL-4, IL-6, IL-10 mRNA の発現を検討した。mRNA の発現量は GAPDH mRNA 発現量との比により半定量した。

(5)慢性肝障害モデルでは上記の検討に加え、組織の線維化を評価するため elastica van Gieson (EVG)染色、伊東細胞の活性化を評価するため平滑筋の染色(α-SMA)、線維化に関与するサイトカイン TGF-βの mRNA 発現を検討した。

C. 研究結果

C-1. 急性肝障害モデル

(1) CCl₄ 投与後に認められた血清 TB, ALT, LDH の上昇はいずれもエダラボンの投与により有意に抑制された(24 時間後: TB, 0.9±0.2 vs. 0.3±0.1 mg/dl; ALT, 1630.6±271.4 vs. 119.4±42.9 IU/l; LDH, 5068.0±1322.2 vs. 369.7±108.9 IU/l)。(2) CCl₄ 単独投与群では、24 時間後に中心静脈周囲に炎症性細胞浸潤を伴った中程度の壊死性変化、中心静脈周囲から肝小葉中間体にかけて肝細胞の空胞化、脂肪化を認めしたが、エダラボン併用群では障害の程度は

有意に軽度であった(図 1)。TUNEL 陽性細胞は単独投与群で 24 時間後に中心静脈周囲から肝小葉中間体にかけて認められ、48 時間後にはさらに増加した。一方エダラボン併用により、24, 48 時間後共にその数は減少し、apoptotic index も両群間で有意差を認めた。

(3) 脂質過酸化の指標は肝組織中 MDA 量、4-HNE 免疫染色陽性細胞数いずれも単独群に比べエダラボン併用群で軽度であった。一方 8-OHdG は、24 時間後では両群共に有意な染色が認められなかったが、48 時間後に単独群で核染色される肝細胞が認められ、

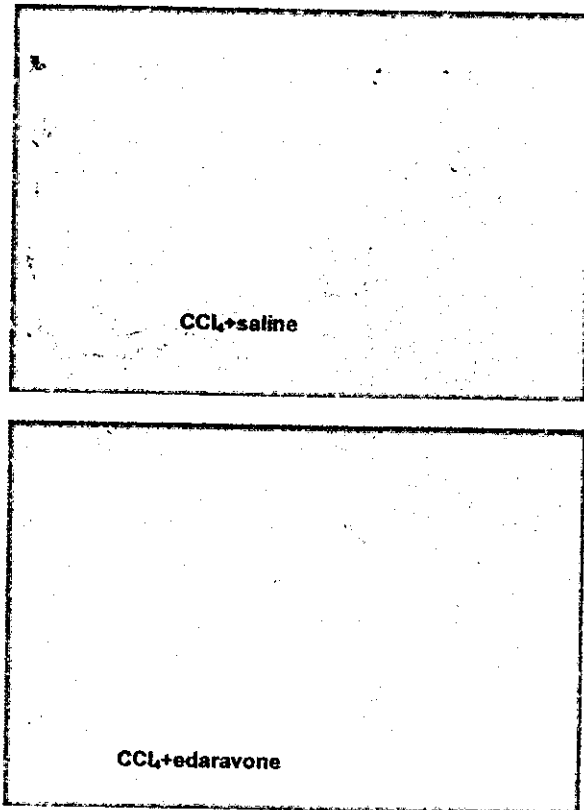


図 1: 四塩化炭素投与 24 時間目の肝組織 (HE 染色、原図 40 倍)。四塩化炭素投与群では主に zone 2 に小滴性の脂肪沈着と zone 3 に壊死と炎症細胞浸潤を認めた。Edaravone 投与群では脂肪沈着と炎症の有意な抑制がみられた。

エダラボン併用群ではその数は有意に減少した。8-OHdG index は 48 時間後に単独群で 4.34 ± 0.51 、エダラボン併用群で 0.12 ± 0.12 であり両群間に有意差を認めた。(4) 血清 IL-6, TNF- α , IL-10 は CCl₄ 投与後それぞれ 6, 12, 24 時間後をピークに上昇しエダラボンの併用により有意に低下した。また CCl₄ 投与により 24 時間後の肝組

織中 TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 mRNA の発現が亢進し、エダラボン併用群では有意に抑制された。

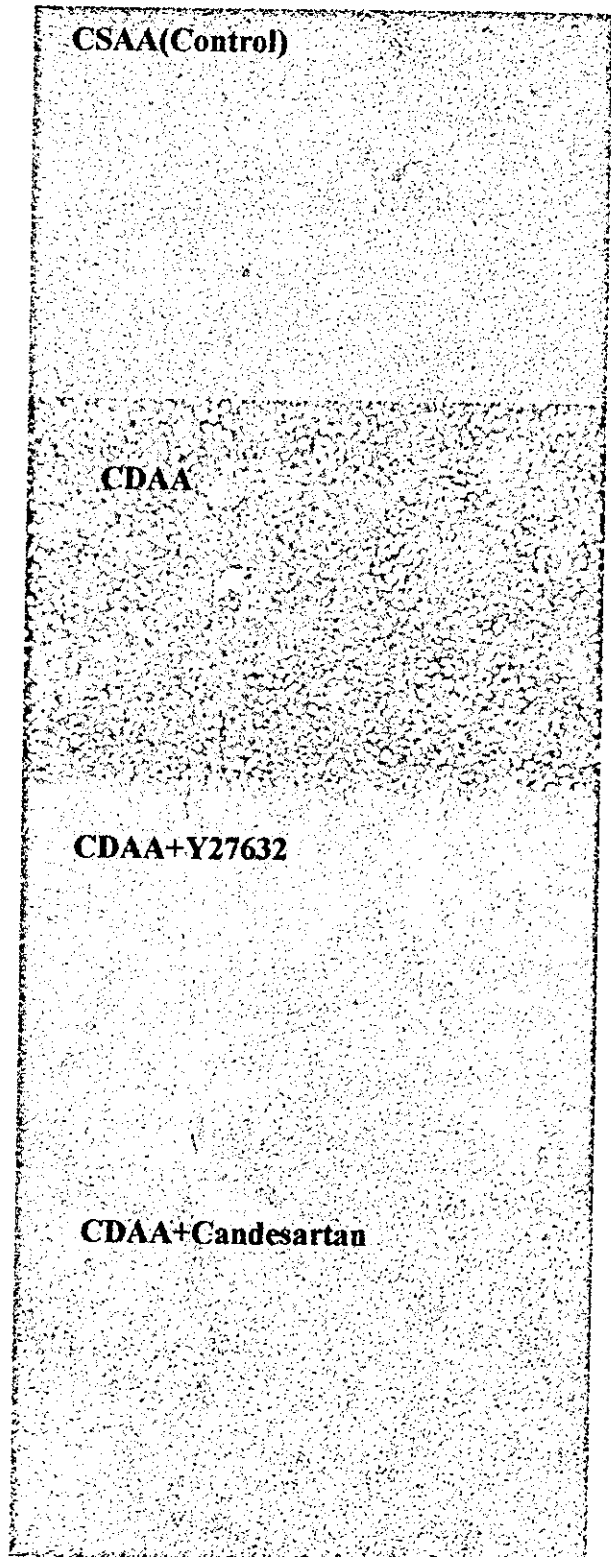


図 2: CDAA 投与による組織変化と candesartan, Y27632 による抑制。CDAA 投与群では著明な脂肪沈着と線維化(一部架橋性)を認めた。Candesartan および Y27632 併用によりこれらの変化が有意に抑制された。

C-2. 慢性肝障害モデル

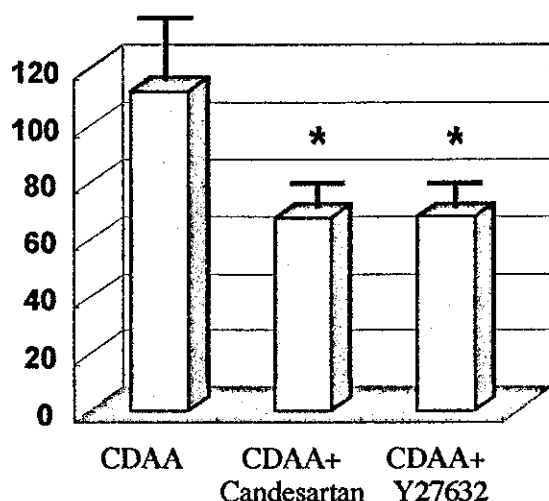
(1) 肝重量、血清 ALT 値、ヒアルロン酸値とも CDAA 投与群で有意に高く、candesartan, Y27632 併用群で有意に抑制された。

(2) CDAA 投与群では、投与 12 週後には肝全体に脂肪化と線維化を認め、一部 bridging fibrosis を認めた。また α -SMA 陽性細胞の増加がみられた。これらの変化は CSAA 投与群では認められなかった。

Candesartan, Y27632 併用群では障害の程度は有意に軽度で、脂肪滴を中心静脈周囲にわずかに認める程度に抑制された(図 2)。

(3) 脂質過酸化の指標である 4-HNE 免疫染色陽性細胞は CDAA 投与群で中心静脈周囲に強く観察されたが、candesartan, Y27632 併用群で有意に抑制された。また 8-OHdG も同様に CDAA 投与群で中心静脈周囲に多く観察され、candesartan, Y27632 併用群で有意に抑制された(図 3)。

(4) 分離伊東細胞における TGF- β mRNA の発現はアンジオテンシンおよび TGF- β 投与により亢進したが、この変化は candesartan, Y27632 の投与により有意に抑制された。



D. 考察

急性肝障害モデル実験において用いたエダラボンの濃度は現在臨床で使用されている 3 mg/kg であり、 CCl_4 惹起急性肝障害に対し臨床量のエダラボンが有効であることが確認された。 CCl_4 は肝ミクロソーム中のチトクローム P450 により代謝され、ト

リクロロメチルラジカル($\text{CCl}_3\cdot$)、トリクロロメチルペルオキシラジカル($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$)やヒドロキシルラジカル($\text{OH}\cdot$)などのラジカルが産生される。これらのラジカルが細胞膜脂質二重層の脂質から水素を引き抜くことにより、脂質過酸化反応が進行し細胞膜障害が生じる⁴⁾。過去の報告よりエダラボンのペルオキシラジカルやヒドロキシルラジカル消去作用が知られており、 CCl_4 惹起急性肝障害に対する抑制機序の 1 つと考えられる。一連のラジカル産生、脂質過酸化の過程で MDA, 4-HNE といったアルデヒドが最終産物として生成され、また核酸の酸化傷害の指標として DNA 塩基と $\text{OH}\cdot$ との反応生成物である 8-OHdG が知られており、老化、肝硬変、発癌などのメカニズムとしても注目されている。脂質過酸化は CCl_4 投与 24 時間後に、DNA 酸化傷害は 48 時間後をピークに認められ、いずれもエダラボンにより有意に抑制されラジカル消去による効果が示唆された。

エダラボン投与群においては、fatty degeneration, necrosis, apoptosis といったいずれの組織学的側面においてもその効果が確認された^{5, 6)}。 CCl_4 投与直後の炎症性細胞やクッパー細胞の増加と TNF- α , IL-6 などの炎症性サイトカインの産生亢進が、 CCl_4 惹起急性肝障害の機序の一つとして知られている⁷⁾。一方で近年様々な急性、慢性肝障害モデルにおいて、IL-4, IL-10 といった抗炎症性サイトカインの産生が亢進し Th1 サイトカインの抑制を介して肝障害の軽減が認められることが報告されており、サイトカイン産生の側面からの検討も行った。エダラボン投与により、炎症性、抗炎症性サイトカインともに肝組織中 mRNA、血清蛋白レベルいずれにおいても CCl_4 単独投与群と比較し有意な抑制効果が認められた。抗炎症性サイトカインの減少がエダラボンの直接的な効果によるものか、肝障害の軽減による二次的なものであるかについての評価は難しいが、炎症性サイトカインカスケードを介した肝障害の進展におけるエダラボンの抑制効果が示唆された。

コリン欠乏食投与は脂肪化と線維化を惹起し、最終的に肝細胞癌を生ずるモデルであり近年 NASH 類似のモデルとしても注目されている。われわれは慢性 CCl_4 投与モデ

ルにおいてアンジオテンシン変換酵素阻害薬の併用が肝線維化、脂肪化を抑制することを報告したが⁷⁾、コリン欠乏食モデルにおいても線維化、脂肪化に局所アンジオテンシン系の関与が認められた。また Rho kinase 阻害によっても同様に線維化、脂肪化が抑制されたことは、アンジオテンシンのシグナルの下流に Rho の関与が考えられた。これらの阻害薬により組織の酸化ストレスが有意に低下していたことは、アンジオテンシン系の組織傷害過程に活性酸素が働いていることを示している。またアンジオテンシンの産生源は肝細胞でも内皮細胞でもクッパー細胞でも、あるいは伊東細胞でもおかしくないと思われる。今回は示していないが、ガドリニウム投与によりクッパー細胞を阻害すると組織の改善がみられることは確認している。

われわれは酸化ストレスがミトコンドリア障害を介し肝細胞の壊死、アポトーシスを惹起することを既に報告してきたが^{8, 9)}、さらにその刺激により組織局所のアンジオテンシンやその他のサイトカインが産生され、伊東細胞の活性化が生ずることも考えられる。すなわちここには種々の因子が存在するが、酸化ストレスを含めそれらが悪性回路のような回転経路を形成していて、治療にはその回路のどこかを断ち切ることが重要と考えられる。エダラボン投与などによるラジカル消去は急性肝傷害の保護効果のみならず薬剤性肝障害、アルコール性肝障害などラジカルの関与した急性肝障害、さらに肝硬変、肝癌などへの治療応用も期待される。

E. 結論

慢性肝障害における肝線維化、脂肪化に局所アンジオテンシン系の関与が認められ、アンジオテンシンシグナルの下流に Rho シグナルが位置すると考えられた。これら種々因子の阻害薬により組織酸化ストレスが有意に低下し、アンジオテンシン系の組織傷害過程に酸化ストレスが働いていることが示唆された。肝線維化には酸化ストレスを含めた種々の因子が形成する悪性回路が存在していて、治療にはその回路のどこかを断ち切ることが重要と思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

口頭およびポスター発表

1. Kitamura K, Tada S, Nakamoto N, Holrikawa H, Kurita S, Ishii H, **Saito H**, Hibi T. Rho/rho-kinase is a key enzyme system involved in the Ang-II signaling pathway of liver fibrosis. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 11/01/04, Boston, USA (Hepatology 40(4), 536A-536A, 2004)
2. **Saito H**, Tada S, Nakamoto N, Ishii H, Hibi T. Usefulness of hepatic elastometry for staging liver histology. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 11/01/04, Boston, USA (Hepatology 40(4), 677A-677A, 2004)
3. B 型肝硬変に対するラミブジン治療の検討. 北村公美、**齋藤英胤**、中本伸宏、多田慎一郎、堀川ひとみ、齋藤義正、加藤真三、永田博司、日比紀文、石井裕正. 第 101 回日本内科学会講演会 4/08/04、東京
4. 肝線維化におけるレニン-アンジオテンシン系に対する Rho/Rho kinase 系の関与. 北村公美、多田慎一郎、戸田京子、常松令、熊谷直樹、中本伸宏、堀川ひとみ、齋藤義正、**齋藤英胤**、石井裕正. 第 90 回日本消化器病学会総会 4/23/04、仙台
5. C 型肝炎・肝がん撲滅へ向けて～C 型肝炎ウイルスの管理. **齋藤英胤**. 市民公開医療講演会 06/20/04、東京
6. 原発性硬化性胆管炎の臨床的検討と新たな治療法の可能性. 多田慎一郎、**齋藤英胤**、日比紀文. (パネルディスカッション: 自己免疫性肝疾患の長期経過と治療による修飾) 第 8 回日本肝臓学会大会

(DDW-Japan 2003 FUKUOKA)
10/21-22/04, 福岡

7. 肝線維化・脂肪化におけるラジカル産生とレニンアンジオテンシン系・Rho kinase の関与. 齋藤英胤, 多田慎一郎, 中本伸宏, 北村公美, 日比紀文. 第 1 回酸化ストレスと肝研究会 11/13-14/04, 福岡
8. C 型慢性肝炎と免疫. 齋藤英胤. 特別講演. 高松 C 型慢性肝炎治療研究会 01/12/05 高松
9. ウイルス性肝疾患治療の最前線. 齋藤英胤. 小金井地区肝友会医療講演会 02/13/05 西国分寺
10. 慢性肝疾患の長期フォローアップ. 齋藤英胤. 第 12 回多摩慶應内科医会 03/12/05 立川
11. レニン-アンジオテンシン系、Rho/Rho-kinase 系抑制による肝線維化治療の可能性. 多田慎一郎, 齋藤英胤, 日比紀文. シンポジウム「肝線維化抑制の治療へのニューアプローチ」第 91 回日本消化器病学会総会 04/14-16/05 東京

論文発表

1. Kaneko, **H. Saito**, Y. Saito, K. Wakabayashi, N. Nakamoto, S. Tada, H. Suzuki, S. Tsunematsu, N. Kumagai, H. Ishii. Down-regulation of matrix-invasive potential of human liver cancer cells by type I Interferon and a histone deacetylase inhibitor sodium butyrate. *Int. J. Oncol.* 24(4), 837-845, 2004.
2. Y. Yamagishi, Y. Horie, M. Kajihara, M. Konishi, H. Ebinuma, **H. Saito**, S. Kato, A. Yokoyama, K. Maruyama, H. Ishii. Hepatocellular carcinoma in heavy drinkers with negative markers for viral hepatitis. *Hepatol. Res.* 28(4), 177-183, 2004.
3. N. Kumagai, N. Takahashi, M. Kinoshita, S. Tsunematsu, K. Tsuchimoto, **H. Saito**, H. Ishii. Polymorphisms of NS5B protein relates to early clearance of hepatitis C virus by interferon plus ribavirin: a pilot study. *J. Viral Hepat.* 11(3), 225-235, 2004.
4. **H. Saito**, S. Tada, N. Nakamoto, K. Kitamura, H. Horikawa, S. Kurita, Y. Saito, H. Iwai, H. Ishii. Efficacy of non-invasive elastometry on staging of hepatic fibrosis. *Hepatol. Res.* 29(2), 97-103, 2004.
5. **H. Saito**. Interferon therapy for chronic hepatitis B. *Jpn. Med. Assoc. J. (JMAJ)* 47(5), 247-252, 2004.
6. H. Ebinuma, **H. Saito**, S. Tada, T. Masuda, T. Kamiya, J. Nishida, M. Yoshioka, H. Ishii, KEIO Interferon- β Study Group. Additive therapeutic effects of the liver extract preparation mixture aderavin-9 on interferon- β treatment of chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 51(58), 1109-1114, 2004.
7. M. Adachi, H. Higuchi, S. Miura, T. Azuma, S. Inokuchi, **H. Saito**, S. Kato, H. Ishii. Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287(3), G695-705, 2004.
8. F. Kaneko, H. Suzuki, N. Hasegawa, K. Kuribayashi, **H. Saito**, S. Otani, H. Nakamizo, K. Kawata, M. Miyairi, K. Ishii, H. Ishii. High prevalence rate of helicobacter pylori resistance to clarithromycin during long-term multiple antibiotic therapy for chronic respiratory disease caused by non-tuberculous mycobacteria. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 62-67, 2004.

9. **H. Saito**, H. Ishii. Recent understanding of immunological aspects in alcoholic hepatitis. *Hepatol. Res.* 30, 193-198, 2004.
10. K. Wakabayashi, **H. Saito**, F. Kaneko, S. Tada, N. Nakamoto, T. Hibi. Gene expression associated with the reduction of malignant phenotype in a human liver cancer cell line HCC-T following stimulation with a histone deacetylase inhibitor. *Int. J. Oncol.* 26(1), 233-239, 2005.
11. M. Takahashi, **H. Saito**, Higashimoto M, Atsukawa K, Ishii H. Benefit of hepatitis C virus core antigen assay in prediction of therapeutic response to interferon and ribavirin combination therapy. *J. Clin. Microbiol.* 43(1), 186-191, 2005.
12. **齋藤英胤**. B型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス薬療法に期待が集まる. アメリカ肝臓病学会第54回年次総会リポート. *Hepatoday* 5, 3-5, 2004
13. 多田慎一郎, **齋藤英胤**. 肝線維化の定量におけるエラストメトリーの有用性. *医学のあゆみ* 208(8), 692-693, 2004.
14. **齋藤英胤**. 最近の NASH に対する臨床試験. *医学のあゆみ* 209(6), 381-382, 2004.
15. 北村公美, 多田慎一郎, **齋藤英胤**, 石井裕正. ペグインターフェロン α -2a. *日本病院薬剤師会雑誌* 40(6), 737-742, 2004.
16. **齋藤英胤**, 多田慎一郎, 岩男 泰, 石井裕正, 日比紀文. 原発性硬化性胆管炎の診断—当科の症例を中心に—. *消化器科* 39(1), 103-107, 2004.
17. **齋藤英胤**, 多田慎一郎, 岩井宏方, 石井裕正, 森實敏夫, 日比紀文. 高齢者に対する低侵襲性診断: 肝線維化のエラストメーターによる測定. *日本高齢消化器医学会誌* 6(2), 54-57, 2004.
- 本文中文献
- 1) Ohishi T, **Saito H**, Tasaka K, et al: Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatol Res* 21: 147-158, 2001
 - 2) Chitale K, Weber D, Webb RC: RhoA/Rho kinase, vascular changes, and hypertension. *Curr Hypertens Res* 3: 139-144, 2001
 - 3) Sakaida I, Matsumura Y, Kubota M, et al: The prolyl 4-hydroxylase inhibitor HOE 077 prevents activation of Ito cells, reducing procollagen gene expression in rat liver fibrosis induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Hepatology* 23: 755-763, 1996
 - 4) Brattin WJ, Glende EAJr, Recknagel RO: Pathological mechanism in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1: 27-38, 1985
 - 5) Tada S, Nakamoto N, **Saito H**, et al: Clinical usefulness of edaravone for acute liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 851-857, 2003
 - 6) Nakamoto N, Tada S, **Saito H**, et al: A free radical scavenger, edaravone, attenuates steatosis and cell death via reducing inflammatory cytokine production in rat acute liver injury. *Free Radical Res* 37: 849-859, 2003

- 7) Salazar-Montes A, Delgado-Rizo V, Aemendariz-Borunda J: Differential gene expression of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute and chronic liver injury. *Hepatol Res* 16: 181-194, 2000
- 8) Kurose I, Higuchi H, **Saito H**, et al: Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 25: 368-378, 1997
- 9) Adachi M, Higuchi H, **Saito H**, et al: Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G695-705, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

肝硬変進展過程における G1 期関連細胞周期分子の発現変化

研究分担者：栗山 茂樹
香川大学医学部教授

研究要旨：肝硬変は、すべての慢性肝疾患の終末像であり、非可逆的な変化と考えられており、極めて予後不良の病態である。肝硬変における線維の増殖は、肝実質の欠落によって生じた組織間隙を補填するためであり、肝の慢性炎症に伴う肝細胞の再生能低下が第一の原因と考えられる。しかし、この肝細胞の再生能低下の機序に関しては、現在までほとんど詳細な検討がなされていない。そこで、今年度の研究において、肝硬変モデルラットを作製し、肝硬変進展過程における肝細胞の増殖能変化、さらに細胞増殖に重要な役割を演じている G1 期関連細胞周期分子の発現変化を経時的に検討したところ、肝の慢性炎症に伴う肝細胞の増殖能低下機序として、肝内における cyclin D1 の発現低下と p15 および p16 の発現上昇が重要な役割を演じていることが示された。したがって、肝内におけるこれらの分子の発現調節を行うことにより、慢性肝疾患から肝硬変への進展を制御しえる可能性が示唆された。

J. 研究目的

肝硬変は、ウイルス性肝炎、アルコール性肝障害、自己免疫性肝炎、ヘモクロマトーシスなどの代謝性疾患、胆汁うっ滞性疾患、うっ血性心不全など、種々の慢性肝疾患から発生し、一つの独立した疾患というよりも、種々の原因によって生じた肝障害が治癒せず、慢性の経過を辿って進行した終末像である。肝硬変は一般的に非可逆的と考えられており、依然として予後不良な病態であり、肝硬変患者の 3 年生存率は 16%、5 年生存率はわずか 8%との報告もなされている。肝硬変とは、元来病理学的な概念であり、肝実質の慢性的な炎症により肝細胞が破壊され、その組織欠落を充填するために線維が肝内に増殖し、偽小葉形成に至った状態を指す。肝の持続的炎症による肝細胞数の低下、さらに肝類洞の毛細血管化現象による肝細胞の機能低下により、種々の臨床的症状が出現する。肝硬変の成因としては、肝の慢性炎症に伴い tumor growth factor- β (TGF- β) などのサイトカインが肝内において産生され、それらのサイトカインによって活性化された肝星細胞が線維を産

生することによって、肝線維化が進行すると考えられている。しかし、肝内に線維が増殖するのは、肝実質の欠落によって生じた組織間隙を補填するためであり、肝の慢性炎症に伴う肝細胞の再生能低下が第一の原因と考えられる。しかし、この肝細胞の再生能低下の機序に関しては、現在までほとんど詳細な検討がなされていない。そこで、今年度の研究において、肝硬変モデルラットを作製し、肝硬変進展過程における肝細胞の増殖能変化、さらに細胞増殖に重要な役割を演じている G1 期関連細胞周期分子の発現変化を経時的に検討した。

B. 研究方法

6 週齢の SD ラットに、phosphate-buffered saline で 1% に溶解した dimethylnitrosamine (DMN) をラット体重 1 kg あたり 1 ml を連日 3 日間腹腔内投与し、次の 4 日間は休薬する投与プロトコルを繰り返す。肝硬変モデルラットを作製した。DMN 投与開始 2、4、6 週後にラットを犠牲させ、肝を摘出した。肝組織の一部をホルマリン固定した後、HE 染色およびアザン・マロリー染色を

行い、DMN 投与による肝の炎症ならびに肝線維の増生を組織学的に検討した。また、DMN 投与肝において増殖期にある肝細胞を検出するために、抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)抗体を用いて免疫組織染色を行った。さらに、肝硬変進展過程における G1 期関連細胞周期分子の発現変化を検討するために、DMN 投与ラット肝より total RNA を抽出し、real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いて、G1 期関連細胞周期分子である cyclin D1、cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4)、Cdk6、さらに Cdk inhibitor である p15、p16、p18 の mRNA 発現を定量的に評価した。

なお、本研究における動物実験のプロトコールは、研究施設の承認を受けたものであり、ガイドラインを遵守して行われた。

C. 研究結果

1. DMN 投与ラット肝の組織学的検討

DMN 投与を行っていないコントロールラット肝の HE 染色では、肝細胞の変成や炎症細胞の浸潤などは認めなかったが、DMN 投与ラット肝の HE 染色では、肝細胞の膨化変成、肝円策構造の乱れ、炎症細胞の浸潤、さらに壊死巣の形成などの組織学的変化を認めた。また、アザン・マロリー染色では、DMN を 2 週間投与したラット肝には、zone 1 を中心とした細い線維沈着がみられた。DMN 投与を 4 週受けたラット肝では、zone 1 を中心とした線維沈着が増加し、肝小葉内に伸長する線維隔離も認められた。DMN を 6 週間投与したラット肝では、肝内の線維は著明に増加し、線維層の幅も広くなり、偽小葉形成を伴う肝硬変の像を認めた。以上の HE およびアザン・マロリー染色の結果より、ラットに DMN を上記投与プロトコールに従って腹腔内投与すると、持続性の肝細胞障害が惹起され肝内の線維沈着が増加し、DMN 投与 6 週後には肝硬変が完成することが確認された。また、肝予備能の指標である血清アルブミン値は、DMN 投与を行わなかったコントロールラット群では 4.3 ± 0.2 g/dl であったが、DMN を 2 週、4 週、6 週投与したラットでは、それぞれ 4.2 ± 0.1 、 3.7 ± 0.5 、 2.6 ± 0.4 g/dl と DMN の投与期間の延長に伴い、血清アルブミン値の有意な低下を認めた。

2. 抗 PCNA 抗体による肝切片の免疫組織染色

次に、DMN 投与ラット肝硬変モデルの肝硬変進展過程において、肝細胞の増殖能に変化がみられるかを検討するために、DMN 投与ラットの肝切片を抗 PCNA 抗体を用いて免疫組織染色し、PCNA 染色陽性の肝細胞を定量的に評価した。DMN 投与を行っていないコントロール群のラット肝は、炎症も線維沈着もなく、肝細胞は静止期にあると考えられる。これらのラット肝における PCNA 染色陽性の肝細胞は約 2% であり、正常肝における PCNA 染色陽性肝細胞の割合は低値であることが示された。一方、DMN を 2 週間投与したラット肝における PCNA 染色陽性肝細胞の割合は約 15% であり、正常肝と比較して著明な増加を認めた。DMN を 4 週間投与したラット肝における PCNA 染色陽性肝細胞の割合は約 10% に低下した。さらに、DMN を 6 週間投与したラット肝における PCNA 染色陽性肝細胞の割合は約 3% にまで低下し、正常肝における PCNA 染色陽性肝細胞数と比較して有意差を認めなかった。以上の結果より、肝の炎症によって惹起された組織破壊を修復するために、肝細胞は当初著明な再生増殖能を示すが、慢性炎症の持続に伴いその再生能は低下し、肝硬変が完成する時期には肝細胞の増殖能は著明に低下することが示された。

3. 肝硬変進展過程における cyclin D1、Cdk4、Cdk6 の発現変化

DMN が誘導する肝硬変進展過程において、細胞周期を G1 期から S 期へ駆動させる cyclin D1、Cdk4、Cdk6 の肝内における発現が、どのように変動するかを real-time RT-PCR 法を用いて定量的に評価した。DMN 投与を行わなかったコントロール群の正常肝と比較すると、DMN を 2 週間あるいは 4 週間投与したラット肝における cyclin D1 の発現は、それぞれ約 3 倍と約 2.5 倍と有意な増加を示した。しかし、DMN を 6 週間投与したラット肝における cyclin D1 発現は著明に低下し、正常肝における cyclin D1 発現と有意差を認めなかった。一方、DMN が誘導する肝硬変進展過程のラット肝における Cdk4 および Cdk6 発現は、DMN 投与 2 週、4 週、さらに 6 週後の肝において、正常肝と比較して有意な発現変化を認めなかった。

4. 肝硬変進展過程における p15、p16 および p18 の発現変化

次に、DMN が誘導する肝硬変進展過程において、G1 期から S 期への細胞周期の回転を抑制する p15、p16 および p18 の肝内における発現が、どのように変化するかを real-time RT-PCR 法を用いて経時的かつ定量的に評価した。DMN を投与していないコントロール群のラット正常肝と比較すると、DMN を 2 週および 4 週間投与したラット肝における p15 発現はほとんど変化しなかったが、DMN を 6 週間投与したラット肝では正常肝と比較して p15 発現が 5 倍近く増加した。次に、肝硬変進展過程における p16 の肝内発現の変動を検討したところ、p16 発現は DMN 投与期間の延長に伴い経時的に増加した。しかし、DMN を 2 週あるいは 4 週投与したラット肝における p16 発現は、正常肝と比較して有意差を認めるには至らなかったが、DMN を 6 週間投与したラット肝における p16 発現は、正常肝と比較して 9 倍近く増加し有意差を認めた。一方、DMN が誘導する肝硬変進展過程のラット肝における p18 の発現は、DMN 投与 2 週、4 週、さらに 6 週後の肝において、正常肝と比較して有意な変化を認めなかった。

D. 考察

肝硬変は、病因のいかに関わらず、慢性肝障害の終末像であり、肝内に線維が異常集積し、偽小葉が形成された状態を示す。この肝線維化過程において中心的な役割を担っているのが、肝における細胞外マトリックスの主たる産生細胞である肝星細胞である。慢性肝障害による局所の炎症反応によって誘導された TGF- β などのサイトカインによって肝星細胞は活性化され、形態的・機能的に変化を遂げて肝線維化を進行させていく。このような肝星細胞の活性化による肝への線維沈着の拡大が、肝硬変における線維化の機序であるが、肝硬変における肝線維化も、種々の創傷治療過程と同様に、脱落した組織間隙を充填するための線維増生であることに変わりはない。したがって、肝線維化とは、種々の原因によって惹起された肝実質細胞障害の結果、肝細胞による完全再生が誘導されない場合に、その欠落部位の結合組織性修復機序として、線維に

よる癒痕治療が起こった状態である。すなわち、軽度な一過程の肝障害の場合には、肝の線維化を来たさないが、肝障害が長期間にわたって持続した場合には、肝内に線維が異常蓄積し、肝硬変へ進展していくとすることができる。したがって、肝硬変への進展には、肝細胞の再生能が低下することによって生じる組織欠損の存在が不可欠と言える。

肝細胞は極めて再生能力の高い細胞であり、ラットやマウスにおいて 2/3 部分肝切除を行った際には、著明な肝細胞再生が誘導され、約 1 週間程度で肝は元の重量に復することが確認されている。しかし、慢性的な肝障害の持続により、肝細胞の再生能力が限界に達し、欠落組織の補填が不可能となったために、肝細胞に代わって線維による癒痕治療が誘導される。したがって、肝硬変の発生において最も重要な機序としては、肝細胞の再生能力低下を挙げることができる。しかし、肝硬変進展過程における肝細胞の再生能の変化に関する検討はほとんどなされていない。

肝細胞の再生能力を評価するためには、種々の分子の解析が考えられるが、細胞周期関連分子の発現変化が重要な役割を演じていることが予測される。したがって、本研究においては、肝硬変進展過程における G1 期関連細胞周期分子の肝における発現変化を解析した。

PCNA は、DNA に trans-acting に作用する種々のタンパク質のアダプター分子として機能していると考えられており、増殖細胞の指標として用いられる代表的な分子である。PCNA 染色陽性肝細胞は、DMN 投与初期には著明な増加を示したが、肝における慢性炎症の持続に伴い、PCNA 陽性細胞数は経時的に減少し、肝硬変が完成する DMN 投与 6 週においては、炎症を伴わない静止期にある正常肝における PCNA 陽性細胞数と比較して有意差を認めないレベルにまで低下した。したがって、肝の炎症性変化による肝細胞障害に反応し、肝細胞は当初旺盛な増殖反応を示すが、炎症の慢性的な持続に伴い細胞増殖能が疲弊し、肝内の脱落組織間隙を補填することが不可能となり、肝線維化が進展することが示された。

細胞周期関連分子は、細胞増殖に極めて

重要な役割を担っている。特に、G1 期関連細胞周期分子の発現調節が、静止期にある細胞の細胞周期を回転させるために不可欠である。G1 期の細胞周期を回転させ S 期へ誘導するためには、cyclin D1 とその catalytic subunit である Cdk4 および Cdk6 が中心的な役割を演じている。Cyclin D1 は細胞周期の G1 中期から G1 後期に発現し、Cdk4 および Cdk6 と結合することによりそれらを活性化する機能を有している。Cyclin D1/Cdk4 および cyclin D1/Cdk6 複合体は、G1 期から S 期への細胞周期移行の最終調節分子である Rb タンパク質をリン酸化することにより、細胞周期を G1 期から S 期へ進行させることが知られている。DMN によって誘導される肝硬変の進展過程において、cyclin D1 は当初著明な発現上昇を認めたが、慢性炎症の持続に伴い経時的に減少し、DMN 投与 6 週後には、炎症を伴わない静止期にある正常肝と比較して有意差を認めない発現レベルにまで低下した。一方、Cdk4 および Cdk6 の肝における発現は、肝硬変進展過程において有意な変動を示さなかった。Cyclin D1、Cdk4 および Cdk6 による Rb タンパク質のリン酸化能は、cyclin D1/Cdk4 および cyclin D1/Cdk6 複合体の総和として表される。したがって、肝においては Cdk4 および Cdk6 分子が、cyclin D1 分子と比較して過剰に存在していれば、cyclin D1 の増加のみによって cyclin D1/Cdk4 および cyclin D1/Cdk6 活性が上昇すると考えられる。そうであれば、肝の炎症性変化による肝細胞障害に反応し、肝内における cyclin D1 発現が増加し肝細胞の増殖が当初には誘導されたが、炎症の慢性的な持続に伴い cyclin D1 発現が低下したことが、肝細胞の増殖能低下につながり、肝内の脱落組織間隙を補填することが不可能となり、肝線維化が進展すると考えられる。

G1 期関連の細胞周期分子としては、Cdk の inhibitor である p15、p16 および p18 が、G1 期から S 期への細胞周期の回転を抑制する分子として重要な制御を演じている。DMN によって誘導される肝硬変の進展過程において、肝内の p18 は有意な発現変動を示さなかったが、肝内における p15 および p16 発現は、肝硬変の完成時期に一致して著明な発現上昇を認めた。したがって、慢

性炎症の持続に伴い、肝内の p15 および p16 発現が上昇することにより、肝細胞の増殖能が減弱することが、肝線維化を惹起するもう一つの重要な機序であることが示唆された。

E. 結論

肝の慢性炎症による肝細胞の再生能低下により、脱落組織間隙が生ずることが、肝線維化の進展、すなわち肝硬変発生の重要因子である。本研究において、肝の慢性炎症に伴う肝細胞の増殖能低下機序として、肝内における cyclin D1 の発現低下と p15 および p16 の発現上昇が重要な役割を演じている可能性が示された。

F. 利益衝突情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe S, Kurokohchi K, Masaki T, Miyauchi Y, Funaki T, Inoue H, Himoto T, Kita Y, Uchida N, Touge T, Tatsukawa T, Kuriyama S. Enlargement of thermal ablation zone by the combination of ethanol injection and radiofrequency ablation in excised bovine liver. *Int J Oncol* 24: 279-284, 2004.
- 2) Jin Y, Masaki T, Yoshida S, Kita Y, Han F, Uchida N, Yoshiji H, Kitanaka A, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S. Identification of p46 Shc expressed in the nuclei of hepatocytes with high proliferating activity: Study of regenerating rat liver. *Int J Mol Med* 13: 721-728, 2004.
- 3) Kurokohchi K, Masaki T, Miyauchi Y, Funaki T, Yoneyama H, Miyoshi H, Yoshida S, Himoto T, Morishita A, Uchida N, Watanabe S, Kuriyama S. Percutaneous ethanol and lipiodol injection therapy for hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 24: 381-387, 2004.
- 4) Kita Y, Masaki T, Funakoshi F, Yoshida S, Tanaka M, Kurokohchi K, Uchida N, Watanabe S, Matsumoto K, Kuriyama S. Expression of G1 phase-related cell cycle

- molecules in naturally developing hepatocellular carcinoma of Long-Evans Cinnamon rats. *Int J Oncol* 24: 1205-1211, 2004.
- 5) Funakoshi F, Masaki T, Kita Y, Hitomi M, Kurokohchi K, Uchida N, Watanabe S, Yoshiji H, Kuriyama S. Proliferative capability of hepatocytes and expression of G1-related cell cycle molecules in the development of liver cirrhosis in rats. *Int J Mol Med* 13: 779-787, 2004.
 - 6) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Tsujinoue H, Masaki T, Fukui H. Halting the interaction between vascular endothelial growth factor and its receptors attenuates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology* 39: 1517-1524, 2004.
 - 7) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Tsujinoue H, Masaki T, Fukui H. Involvement of the vascular endothelial growth factor receptor-1 in murine hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 41: 97-103, 2004.
 - 8) Tanaka M, Watanabe S, Masaki T, Kurokohchi K, Kinekawa F, Inoue H, Uchida N, Kuriyama S. Fulminant hepatic failure caused by malignant melanoma of unknown primary origin. *J Gastroenterol* 39: 804-806, 2004.
 - 9) Morishita A, Masaki T, Yoshiji H, Nakai S, Ohgi T, Miyauchi Y, Yoshida S, Funaki T, Uchida N, Kita Y, Funakoshi F, Usuki H, Okada S, Izuishi K, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S. Reduced expression of cell cycle regulator p18^{INK4C} in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 40: 677-686, 2004.
 - 10) Tominaga K, Kuriyama S, Yoshiji H, Deguchi A, Kita Y, Funakoshi F, Masaki T, Kurokohchi K, Uchida N, Tsujimoto T, Fukui H. Repeated adenoviral administration into the biliary tract can induce repeated expression of the original gene construct in rat livers without immunosuppressive strategies. *Gut* 53: 1167-1173, 2004.
 - 11) Yoshida S, Masaki T, Han F, Jin YJ, Miyauchi Y, Funaki T, Yoshiji H, Matsumoto K, Uchida N, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S. Enhanced expression of adaptor molecule p46 Shc in nuclei of hepatocellular carcinoma cells: Study of LEC rats. *Int J Oncol* 25: 1089-1096, 2004.
 - 12) Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Fukui H. Angiotensin-I converting enzyme inhibitors as potential anti-angiogenic agents for cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets* 4: 555-567, 2004.
 - 13) Kurokohchi K, Masaki T, Miyauchi Y, Hosomi N, Yoneyama H, Yoshida S, Himoto T, Deguchi A, Nakai S, Inoue H, Watanabe S, Kuriyama S. Efficacy of combination therapies of percutaneous or laparoscopic ethanol-lipiodol injection and radiofrequency ablation. *Int J Oncol* 25: 1737-1743, 2004.
 - 14) Kuriyama S, Yoshiji H, Nakai S, Deguchi A, Uchida N, Kimura Y, Inoue H, Kinekawa F, Ogawa M, Nonomura T, Masaki T, Kurokohchi K, Watanabe S. Adenovirus-mediated gene transfer into rat livers: Comparative study of retrograde intrabiliary and antegrade intraportal administration. *Oncol Rep* 13: 69-74, 2005.
 - 15) Kurokohchi K, Masaki T, Himoto T, Deguchi A, Nakai S, Yoneyama H, Yoshida S, Kimura Y, Inoue H, Kinekawa F, Yoshitake A, Izuishi K, Watanabe S, Kuriyama S. Successful laparoscopic radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma adhered to the mesentery after transcatheter arterial embolization. *Oncol Rep* 13: 65-68, 2005.
 - 16) Kimura Y, Selmi C, Leung PS, Mao TK, Schauer J, Watnik M, Kuriyama S, Nishioka M, Ansari AA, Coppel RL, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME. Genetic polymorphism influencing xenobiotic metabolism and transport in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 41: 55-63, 2005.
2. 学会発表
2-1. 国際学会
Seventh Congress of the Asian Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and

Biology (AFSUMB 2004) 2004.5.17-21,
Utsunomiya, Japan

Application of artificial pleural fluid injection for the treatment of hepatocellular carcinoma located in the hepatic dome or posterior portion of the liver with percutaneous ultrasound guided radiofrequency ablation.

Watanabe S, Kurokohchi K, Masaki T, Kuriyama S.

The 3rd International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis
2004.8.19-20, Sapporo, Japan

1) The clinically used angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, may be utilized as a chemopreventive agent against hepatocellular carcinoma.

Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Fukui H.

2) The clinically used copper-chelating agent, trientine, attenuates liver carcinogenesis via angiogenesis suppression.

Yoshii J, Yoshiji H, Kuriyama S, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Fukui H.

3) Hepatic extracellular matrix remodeling plays an important role in liver carcinogenesis.

Ikenaka Y, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Fukui H.

4) The potent angiogenic factor, vascular endothelial growth factor, and receptor interaction plays a pivotal role in liver carcinogenesis.

Kitade M, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Fukui H.

The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)

55th Annual Meeting and Postgraduate Courses. 2004.10.29-11.2, Boston, Massachusetts, USA

1) Reduced expression of cell cycle regulator p18^{INK4C} in human hepatocellular carcinoma. Morishita A, Masaki T, Nakai S, Ohgi T, Yoshida S, Uchida N, Kita Y, Funakoshi F, Himoto T, Deguchi A, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S.

2) Hepatocellular carcinoma cell cycle: Study of

human and long-evans cinnamon rats.

Masaki T, Morishita A, Yoshida S, Nakai S, Uchida N, Kita Y, Himoto T, Deguchi A, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S.

3) Genetic Variants influencing xenobiotic metabolism in patients with primary biliary cirrhosis.

Kimura Y, Selmi C, Leung PS, Mao TK, Watnik M, Kuriyama S, Nishioka M, Ansari AA, Coppel RL, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME.

4th International Meeting on Hepatocellular Carcinoma: Eastern and Western Experiences. 2004.12.14-16, Hong Kong

1) Expression of ING1 in hepatocellular carcinoma: relationships to tumour differentiation and cyclin E kinase activity. Masaki T, Ohgi T, Nakai S, Morishita A, Yoshida S, Uchida N, Kita Y, Yokoyama F, Nonomura T, Himoto T, Deguchi A, Kimura Y, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S.

2) Expression of annexin I and annexin II in hepatocellular carcinoma: comparative study of hepatocellular carcinoma versus liver cirrhosis, chronic hepatitis and normal liver. Masaki T, Yoshida S, Nakai S, Morishita A, Kita Y, Uchida N, Yokoyama F, Nonomura T, Himoto T, Deguchi A, Kimura Y, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S.

3) Reduced expression of cell cycle regulator p18^{INK4C} in human hepatocellular carcinoma. Masaki T, Morishita A, Nakai S, Yoshida S, Kita Y, Uchida N, Yokoyama F, Nonomura T, Himoto T, Deguchi A, Kimura Y, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S.

4) A novel src-related tyrosine kinase in cancer cells of LEC rats that develop hepatocellular carcinoma.

Masaki T, Yoshida S, Morishita A, Nakai S, Kita Y, Uchida N, Yokoyama F, Nonomura T, Himoto T, Deguchi A, Kimura Y, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S.

5) Reduced C-terminal Src kinase (Csk) activities in hepatocellular carcinoma. comparative study of hepatocellular carcinoma versus liver cirrhosis.

Masaki T, Morishita A, Yoshida S, Nakai S, Kita Y, Uchida N, Yokoyama F, Nonomura T, Himoto T, Deguchi A, Kimura Y,