

氏名(本籍) 佐野哲朗(山梨県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位授与番号 乙第1409号
 学位授与日付 平成18年4月19日
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
 学位論文題目 Prevention of Rat Hepatocarcinogenesis by Acyclic Retinoid is Accompanied by Reduction in Emergence of Both TGF- α Expressing Oval-Like Cells and Activated Hepatic Stellate Cells
 審査委員 (主査) 教授 森脇久隆
 (副査) 教授 森秀樹 教授 安達洋祐

論文内容の要旨

本邦における平成14年度の肝及び肝内胆管の悪性新生物による死亡者数は34,637人であり、悪性新生物の中でも死亡者数で第3位に数えられる。さらに、わが国で発生する原発性肝細胞がんの90%以上はB型又はC型肝炎ウイルスの持続感染が主な原因で生じると言われており、肝細胞がんの発生数及び死亡者数は年々増加している。

本邦における肝細胞がん症例の15.5%がHBs抗原陽性、71.8%がHCV抗体陽性であるとされている。特にC型肝炎ウイルス陽性肝細胞がんは、初発肝細胞がん治療後1年目までで24%、3年目までで76%、5年目までで92%の再発が認められ、B型肝炎細胞がんに比べて、極めて予後不良の疾患である。そのため、C型肝炎ウイルス陽性肝細胞がんの早期発見、早期治療とともに今後重要な課題として、再発の防止が挙げられる。一方、肝炎ウイルス感染による肝細胞がんの発症及び再発を防ぐ方法として、インターフェロン等の抗ウイルス治療で有効例が報告されているが、現在までに肝細胞がんの再発を防ぐことを目的とした治療法は確立されていない。

こうした背景の中、肝細胞がん治療後の再発を遅延ないし防止する方法として、レチノイドを用いた化学予防(chemoprevention)の考え方が提唱されている。武藤らによって1980年に見いだされた(2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoic acid (acyclic retinoid, NIK-333)は、細胞内レチノイン酸結合蛋白と親和性を有するレチノイド様作用を持つ合成ポリプレニン酸で、本化合物の600mg/日を肝細胞がん治療後の患者に1年間経口投与したところ、本化合物が高い安全性を持ち、肝細胞がんの再発を抑制するとともに患者の生存率を高めたと報告している。

Acyclic retinoidはレチノイン酸レセプター(RAR)及びレチノイドXレセプター(RXR)を介する転写制御作用を有している。また、acyclic retinoidは高分化型のヒト肝がん由来細胞であるHuH-7にall-trans-RA及び9-cis-RAには認められないアポトーシスを誘導し、3'-MeDAB及びDENによるラット肝発がんも有意に抑制した。現在までに肝発がんの機構として、肝炎が持続し、肝細胞壊死・肝細胞増殖を繰り返すことにより突然変異が起これ、その細胞がアポトーシスにより排除されず増殖することにより発症する可能性などが考えられている。これに対しacyclic retinoidは①肝臓内の前がん細胞或いは非顕性がん細胞をアポトーシス誘導作用により取り除く、②分化誘導作用により抗腫瘍効果と発がん抑制効果を示す、といった作用機序に基づいて肝細胞がん発生を抑制するものと推察されている。

Acyclic retinoidが3'-MeDAB誘発ラット肝細胞癌の発生を抑制することは、既に森脇らによって報告されているが、我々は今回、同様にacyclic retinoidが3'-MeDAB誘発のラット肝細胞腫瘍の発生を抑制するだけでなく、胆管線維症の発生を抑制することを見出した。また、肝発癌抑制メカニズムに関連すると考えられる作用として、acyclic retinoidがoval cell数、TGF- α の発現、肝線維化、星細胞活性化および腫瘍細胞増殖活性を低下させることを確認した。

方法 1) 動物 6週齢のFischer系雄性ラットを160匹用い、1群10匹に群分けした。肝発癌モデルの作製は森脇らの報告に準じて行った。すなわち、ラットに3'-MeDABを固型飼料中0.06%含有するように調製した飼料を4週間投与し、3'-MeDAB投与による肝の初期変化に対するacyclic retinoidの影響を検討した。Acyclic retinoid(10, 40, 80 mg/kg)またはvehicle(大豆油)を3'-MeDABと平行して、4週間、胃ゾンデを用いて0.5mL/100g B.W.で強制経口投与した。全てのラットは剖検時にペントバルビタールナトリウム40mg/kg B.W.の腹腔内投与による麻酔下で開腹し、腹部大動脈から脱血し、続いて肝臓を摘出して重量を測定した後、10%中性緩衝ホルマリン固定後パラフィン包埋を行った。2) 病理組織学的評価 全動物の肝臓について、HE(Hematoxylin-Eosin)染色および抗TGF- α 抗体を用いた免疫組織染色を施し、光学顕微鏡的観察を行った。加えて、肝線維化および星細胞活性化に対する影響を確認するために、シリウスレッド染色および α -SMA(α -smooth muscle actin)染色を実施した。Oval cell数についてはHE染色標本観察下に計測し、肝線維化および星細胞活性化についてはそれぞれシリウスレッド染色および α -SMA染色で陽性に染まる領域をvideo image processor(IPAP; Sumika Technos Co., Osaka)を用いて計測した。3) 統計処理 得られたデータのvehicle群とacyclic retinoid 10, 40, 80mg/kg群の比較については、体重、肝重量、oval cell数、肝線維化および星細胞活性化の解析はBartlettの検定を行い、等分散を示す場合は一元配置の分散分析を、等分散を示さない場合はKruskal-Wallisの検定を行った。各々の検定で群間に差が認められた場合、Dunnnettの多重比較検定を行い有意差の有無(有意水準は5%で表す)を検討した。

結果 病理組織学的評価 (1) oval cell数に対する影響 acyclic retinoidのoval cell数に対する影響をHE染色により検討した。その結果、acyclic retinoid 10, 40, 80mg/kg群ではvehicle群に比し用量依存的にoval cellの減少が認められ、

acyclic retinoid 40, 80mg/kg群は有意な効果であった。(2) 肝線維化に対する影響 acyclic retinoidの肝線維化に対する影響をシリウスレッド染色により検討した。その結果, acyclic retinoid 10, 40, 80mg/kg群において肝線維化の有意な抑制効果が見られた。(3) 星細胞活性化に対する影響 acyclic retinoidの星細胞活性化に対する影響を α -SMA染色により検討した。その結果, acyclic retinoid 10, 40, 80mg/kg群では星細胞活性化の抑制が認められ, acyclic retinoid 40 mg/kg群はvehicle群に比して有意な効果であった。(4) TGF- α 発現に対する影響 肝組織中のTGF- α 発現の程度を免疫組織染色により検討した。その結果, vehicle群に多数存在するoval cell中に強い陽性所見が認められ, acyclic retinoid 10, 40, 80mg/kg群ではvehicle群に比し用量依存的にTGF- α 陽性のoval cellの減少が認められた。

考察 Acyclic retinoidが3'-MeDAB誘発ラット肝細胞癌の発生を抑制することは、既に森脇らによって報告されているが、我々は今回、同様にacyclic retinoidが3'-MeDAB誘発のラット肝細胞腫瘍の発生を抑制するだけでなく、胆管線維症を抑制することを見出した。また、肝発癌抑制メカニズムに関連すると考えられる作用として、acyclic retinoidがoval cell数、TGF- α の発現、肝線維化、星細胞活性化および腫瘍細胞増殖活性を低下させることを確認した。

Oval cellは肝癌の前駆細胞の一つであると考えられていることから、acyclic retinoidが肝癌の前駆細胞の数を減少させる作用を有している可能性が考えられた。また、増殖性のoval cellは、増殖因子の一つであるTGF- α を発現していることが確認されており、TGF- α は肝発癌のプロモーション/プログレッション段階で重要な役割を担っているとされることから、acyclic retinoidがoval cell数を減少させることにより肝組織中TGF- α の発現レベルを下げ、結果的に肝細胞の癌化を抑制する可能性が考えられる。

臨床においてもoval cellは慢性肝炎もしくは肝硬変の患者において増殖が見られ、肝病変が重篤になる程にその数が増えることが確認されている。Oval cellの増殖は進行性肝疾患、特に肝硬変が存在する場合の肝発癌のリスク亢進と関連しているとされる。実験的にも、今回使用した3'-MeDABを含めて種々の化学発癌物質が小型のductal-like epithelial cell, いわゆるoval cellの広範な増殖を引き起こすことが知られており、また、肝癌細胞のフェノタイプがoval cellと類似しているとの報告もあることから、oval cellを発生源とする肝発癌の可能性が指摘されている。

一方で、化学発癌剤投与によるoval cell増殖の誘発後に、ラット肝臓でいくつかの増殖因子の発現が亢進することが知られているが、これらの正確な役割は明確になっていない。しかしながら、増殖性oval cell内で発現していることが確認されている増殖因子の一つとしてTGF- α があり、TGF- α は肝発癌において重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。Oval cellとTGF- α との関連についての研究報告は多く、TGF- α はoval cellの細胞分裂促進物質 (mitogen) であり、oval cell自身あるいは周囲肝組織で産生されたTGF- α がそのレセプターである上皮増殖因子レセプター (epidermal growth factor receptor ; EGFR) を介してoval cellの増殖を刺激する (autocrine and paracrine stimulation)。また、ヒトにおけるウイルス性慢性肝炎で著明に認められるoval cellは、肝炎ウイルス感染の標的細胞であると同時にTGF- α の発現亢進を伴うことが確認されており、肝炎ウイルスが発癌の初期段階に作用 (イニシエーション) し、TGF- α がその後のプロモーターとして関与することにより、oval cell自身が肝癌の発生源となっている可能性が示唆されている。このように、oval cellにおけるウイルスの存在とTGF- α 発現の相互作用が、oval cellを癌化に導くための重要な因子であると考えられる。

肝組織中の線維化および星細胞活性化を抑制することは、高癌化状態と認識されている肝硬変の悪化を防止し、肝発癌抑制に繋がるかもしれない現象として興味深い。今回の実験で、acyclic retinoidが肝線維化と星細胞活性化の両方を抑制したことから、acyclic retinoidはこのような肝発癌物質による好発癌環境 (線維化) の構築を阻害した可能性があり、そのことが3'-MeDAB誘発肝発癌の抑制に繋がったことが推測される。

本検討において、acyclic retinoidは腫瘍部および非腫瘍部における細胞増殖活性を低下させた。細胞増殖活性は発癌促進の強さと深い関係があることが指摘されていることから、活性の低下は発癌リスクを低減させていることを意味する。

以上のように、acyclic retinoidは3'-MeDABによるラット肝発癌を抑制した。同時に、肝癌の前駆細胞の一つと考えられているoval cell数、TGF- α の発現を抑制した。さらに、慢性肝炎の病態悪化の主原因と考えられている肝線維化および星細胞活性化をacyclic retinoidは抑制したことから、高癌化状態と認識されている肝硬変への進展をacyclic retinoidが阻止する可能性が示唆された。

Acyclic retinoid はin vitroにおいて肝癌細胞のアポトーシス誘導と分化誘導が証明されている。臨床においてもacyclic retinoidは肝癌の再発を有意に抑制することが既に確認されている。このように、acyclic retinoidは肝発癌抑制に結びつくと考えられる複数の作用を有している非常にユニークな薬剤であり、また、他のレチノイドに比べて安全性も高く、有望な肝癌発症 (再発) の抑制薬になり得る。

論文審査の結果の要旨

申請者 佐野哲朗はラット3'-MeDAB肝発癌モデルを用いて、非環式レチノイドが肝癌の発生を予防し、TGF- α 陽性oval cellの出現、肝星細胞の活性化、肝線維化を何れも抑制することを明らかにした。この知見はレチノイドによる肝発癌抑制の機序を理解するうえで重要な意義を有し、消化器病学、肝臓学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

〔主論文公表誌〕

Prevention of Rat Hepatocarcinogenesis by Aacyclic Retinoid is Accompanied by Reduction in Emergence of Both TGF- α Expressing Oval-Like Cells and Activated Hepatic Stellate Cells
Nutr Cancer. 51, 197-206 (2005).