

氏 名	横 濱 桂 介
(ふりがな)	(よこはま けいすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 29 年 1 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Rosuvastatin as a potential preventive drug for the development of hepatocellular carcinoma associated with non-alcoholic fatty liver disease in mice (NAFLD 由来の肝細胞癌モデルマウスにおいて、 ロスバスタチンはその発癌を抑制する可能性があ る)
論文審査委員	(主) 教授 廣 瀬 善 信 教授 田 中 慶 太 朗 教授 高 井 真 司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

原発性肝癌は世界で5番目に多い癌種で、その死亡率は3番目であり、肝細胞癌(HCC)は原発性肝癌の約85%を占め増加傾向にある。非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)はHCCのリスクファクターの1つであり、その組織学的な変化は、単純性脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変、肝不全、そしてHCCと多岐にわたる。NAFLDはメタボリックシンドロームの1つの表現型とされ、それゆえに高脂血症もHCCのリスクファクターとしてみなされている。スタチン製剤は広く臨床使用されている高脂血症治療薬であり、3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A(HMG-CoA)還元酵素阻害作用以外に

も抗酸化作用、抗炎症作用、血管内皮細胞の NO 合成酵素活性化作用が報告されている。その中でロスバスタチン(Ros)は、HMG-CoA 還元酵素阻害作用が他のスタチン系薬剤と比べ強い可能性や、肝臓への取り込みがより選択的で効果的であることがラットで示されており、さらに虚血に対する細胞保護作用も報告されている。そこで今回我々は、NAFLD を基礎疾患とした肝腫瘍発生に対する Ros の抑制効果の有無について、NAFLD-HCC 発症モデルを用いた実験的検討を行った。

《方法》

本研究では、NASH-HCC の発症モデルである STAM マウスを使用した。5 週齢の STAM マウス 16 匹を、高脂肪飼料を与える群(HFD 群：n=8)と、高脂肪飼料に Ros を添加(0.00125%)する群(Ros 群：n=8)とに分け、15 週間にわたり飼料を経口的に与え、体重を週 1 回測定した。15 週間経過後(20 週齢)に犠牲死させて肝臓を摘出し、肉眼的および組織学的検討を行った。また、血液検体は心臓採血によって採取し、遠心分離した後に-80℃で保存し、測定時に解凍して各種パラメーターを検討した。

《結果》

実験終了時の体重における肝重量の比は、2 群間で有意差を認めなかった。肝臓の肉眼所見では、HFD 群のマウス 8 匹中 7 匹において、その肝表面に多数の肝腫瘍を認めたが、Ros 群のマウスの肝臓には腫瘍を認めなかった。組織学的には背景肝において、HFD 群と比べると Ros 群の脂肪沈着は軽度であり、HFD 群では大型の脂肪滴がみられるが、Ros 群ではみられなかった。生化学的な検討として、血清中の aspartate amino-transferase(AST)、alanine amino-transferase(ALT)、total cholesterol(T-CHO)、triglyceride(TG)、free fatty acid(FFA)、肝臓中の TG 含有量を測定したところ、Ros 群においていずれも有意に低値であった。さらに、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6(IL-6)、interferon- γ (IFN- γ) の肝臓内での遺伝子発現を reverse transcription-quantitative PCR(RT-qPCR)を行い検討し

たところ、Ros 群においていずれも有意に抑制されていた。また、肝臓の脂質合成の転写活性化因子である sterol regulatory element binding protein-1c(SREBP-1c)や、肝臓の脂質合成や脂肪酸酸化の主要な調節因子である AMP-activated protein kinase(AMPK) α 1、fatty acid synthase(FAS)は Ros 群において有意に抑制され、転写によってペルオキシソームやミクロソーム、ミトコンドリア酸化を誘導する核内受容体のサブファミリーの 1 つである peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) α の発現は Ros 群において有意に亢進していた。さらに、肝星細胞由来の線維化関連因子である tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1(TIMP-1)や matrix metalloproteinase-13(MMP-13)、1 型コラーゲン α 1 の肝臓での遺伝子発現や、抗酸化因子である glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit(Gclc)、glutathione S-transferase(GST)の肝臓での遺伝子発現も検討したが、それらは 2 群間に有意差を認めなかった。しかしながら、血管新生関連因子の受容体である epidermal growth factor(EGF)、vascular endothelial growth factor(VEGF)、platelet-derived growth factor(PDGF)の肝臓での遺伝子発現が、Ros 群において有意に抑制されていた。

《考察》

今回の実験で、Ros の投与は STAM マウスの肝腫瘍発生を抑制することが示唆され、この抑制作用のメカニズムとして、抗炎症作用や脂質代謝関連遺伝子の抑制を介したものでなく、腫瘍血管新生の抑制をも介した結果である可能性が示唆された。これまでに Ros の抗炎症作用が冠動脈疾患において報告されており、NASH の発症、進展には炎症が関連していることから、今回の Ros の抗炎症作用の関与を示唆する結果はこれまでの知見と合致すると考えられる。また、脂質代謝に関わる PPAR- α の発現は Ros 群において有意に亢進していたが、脂質合成関連遺伝子 SREBP-1c および脂質酸化関連遺伝子 AMPK α 1 の肝内発現は Ros 群において有意に抑制されていた。これらの結果は、Ros 投与が脂質代謝抑制のみならず、脂質過剰が重要な役割を果たす NAFLD を背景とする発癌に抑制的に作用した可能性に矛盾しない。さらに、進行 HCC に対する唯一の経口薬であるソラフェニブ

が腫瘍の血管新生を抑制するという知見に基づいて、我々は血管新生関連についても検討したところ、血管新生関連因子受容体である EGF、VEGF、PDGF の遺伝子発現は、Ros 群において約 50%まで抑制されていた。この結果は、Ros が NASH 関連の HCC に対して腫瘍血管新生の抑制をも介した抗腫瘍効果を有している可能性を示唆する。しかし、線維化関連遺伝子の発現については、Ros は TGF- β 1 を抑制していたが、その他の肝星細胞由来の遺伝子発現には効果を示さなかった。また、高脂血症薬である eicosapentaenoic acid(EPA)が抗酸化関連遺伝子の発現を誘導し、活性酸素の産生を阻害することがこれまでに報告されているため、同じ高脂血症薬である Ros についても抗酸化作用を有するかどうかを検討したところ、抗酸化関連遺伝子である Gclc、GST の肝臓での発現に 2 群間の有意差を認めなかった。したがって、我々の実験系において Ros は有意な抗酸化作用を有していない可能性が示唆された。

《結論》

Ros はすでに多くの高脂血症患者に使われており、今回の検討で我々は、Ros が NASH とその最終段階である HCC の化学予防剤となる可能性を示した。

論文審査結果の要旨

原発性肝癌は世界で 5 番目に多い癌種で、その死亡率は 3 番目であり、HCC は原発性肝癌の約 85%を占め増加傾向にある。NAFLD は HCC のリスクファクターの 1 つであり、メタボリックシンドロームの 1 つの表現型とされ、それゆえに高脂血症も HCC のリスクファクターとみなされている。スタチン製剤は高脂血症治療薬であり、HMG-CoA 還元酵素阻害作用以外にも抗酸化作用、抗炎症作用、血管内皮細胞の NO 合成酵素活性化作用が報告されている。は、HMG-CoA 還元酵素阻害作用が他のスタチン系薬剤と比べ強いことや、肝臓への取り込みがより選択的で効果的であることが示されているため、申請者は NASH-HCC の発症モデルである STAM マウスを用いて、NAFLD を基礎疾患とした HCC の発現に関する Ros の抑制効果の有無について検討を行った。

本研究では 5 週齢の STAM マウス 16 匹を、高脂肪飼料を与える群(HFD 群：n=8)と、高脂肪飼料に Ros を添加(0.00125%)した飼料を与える群(Ros 群：n=8)に分け、15 週間にわたり飼料を経口的に与えた。15 週間経過後(20 週齢)に犠牲死させ、肝臓および血液検体を採取し、各種パラメーターを測定した。

その結果、肝臓の肉眼所見では、HFD 群のマウス 8 匹中 7 匹においてその肝表面に多数の肝腫瘍を認めたが、Ros 群のマウスには腫瘍を認めなかった。生化学的な検討では、血清 AST、ALT、T-CHO、TG、FFA 値及び肝臓中の TG 含有量は Ros 群において有意に低値であり、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ や、脂質代謝関連遺伝子である SREBP-1c、AMPK α 1、FAS の肝内発現は Ros 群において有意に抑制されていた。PPAR α の発現は Ros 群において有意に亢進しており、組織学的にも Ros 群の脂肪沈着は軽度であった。また、TGF- β 1 以外の肝星細胞由来の線維化関連遺伝子や、抗酸化遺伝子の発現において、Ros 投与により有意差は認めなかったが、EGF、VEGF、PDGF 等の血管新生関連遺伝子の肝臓での発現が Ros 群において有意に抑制されていた。

申請者は本研究において、スタチン系の高脂血症治療薬として臨床応用されている Ros の投与が、NAFLD を背景とする肝発癌モデルにおいて、腫瘍形成に対する抑制効果を有する可能性を示した。その抑制効果は、Ros が持つとされる抗炎症作用や脂質代謝関連遺

伝子の抑制を介するだけでなく、Ros が関与するとの知見に乏しい腫瘍血管新生の抑制を介する可能性も示唆された。本研究成果は、スタチン製剤のがん予防、血管新生阻害を含む新たな作用効果および治療応用の可能性を示すと同時に、今後の肝発癌および予防研究における重要な基礎的データを提供するものと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

International journal of molecular medicine 38(5): 1499-1506, 2016