Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

IFN-alpha prevents the growth of preneoplastic lesions and inhibits the development of hepatocellular carcinoma in the rat

中治，美有紀

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2004-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2962
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002962

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 112 】

氏　　名・（本　籍）	中治　美有紀	（　兵庫県　）
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学　位　記　番　号	博い第１５７２号	
学位授与の　要　件	学位規則第４条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成１６年３月３１日	

【 学位論文題目 】

IFN-alpha prevents the growth of preneoplastic lesions and inhibits the development of hepatocellular carcinoma in the rat
（ラット肝発癌モデルにおけるインターフェロンの発癌抑制作用）

審　査　委　員

主 査　教　授　前田　　盛
教　授　横野　浩一
教　授　堀田　　博

背景と目的

C 型肝炎感染者からの発癌予防として最も有効な治療法は、ウイルス排除を目的としたインターフェロン（IFN）治療である。近年行われた大規模な多施設研究である IHIT Study により IFN 治療群は非治療群に比べ発癌のリスクが約半分に低下し、ウイルス駆除者では 1/5 になることが明らかにされた。また、臨床的に IFN 投与は、たとえウイルス排除に有効でなくとも発癌リスクの低下や、肝癌切除後投与による術後の再発抑制をもたらすことが報告され、基礎的にも IFN による肝癌細胞株に対する増殖抑制や、アポトーシス誘導作用が示されており、IFN 自身の発癌抑制作用が示唆されているが、そのメカニズムについては解明されていない。そこで、本研究ではラットの肝発癌モデルを用いて IFN の発癌抑制効果について検討した。

方法

実験的肝発癌モデルとして、広く用いられているラットの Solt and Farber 法（*Am J Pathol*, 1977, 88, 595-618.）を用いた。まず、前癌病変に対する効果を検討するためラットを IFN 投与群、非投与群の 2 群に分け、前癌病変の出現する 4 週目にと殺した。次に癌の発生に対する効果の検討のため IFN 非投与群、IFN 初期投与群、IFN 継続投与群の 3 群に分け、癌の発生する 40 週目に Sacrifice した。前癌病変、癌病変について、発生個数と体積を各群で比較し、前癌病変における細胞周期関連遺伝子 p53、p21、PCNA の発現を免疫染色の陽性率で比較した。さらに p53、p21、Cyclin D1、Cyclin E については RT-PCR によって定量的にも評価した。また、前癌病変と癌病変における IFN 受容体の発現についても免疫組織学的評価を行った。結果は（平均±偏差）で表記し、統計学的解析には T 検定を用い、$p<0.05$ を統計学的有意とした。

結果

① 前癌病変はマーカーである Glutathione-S transferase placenta (GST-P)を用いて検出した。単位体積あたりの前癌病変の個数は IFN 投与群 250.083±136.984 個/cm^3、非投与群 425.352±131.583 個/cm^3 と、IFN 投与群で有意に低かった。また IFN 投与群の前癌病変の体積の平均値は非投与群に比べて統計学的有意差はないものの小さい傾向があった。

② 免疫染色の結果、p53 の発現は正常肝細胞に見られ、前癌病変では検出されなかった。また、前癌病変における増殖細胞マーカーPCNA の発現は IFN 投与群で有意に減少し、増殖抑制因子である p21 の発現は IFN 投与群で増加していた。(PCNA 陽性率、IFN 投与群 28.741±4.486%、非投与群 35.861±3.726%；p21 陽性率、IFN 投与群 31.804±6.327%、非投与群 23.418±8.362%)

③ RT-PCR の結果から IFN 投与、非投与群で前癌病変における p53 の発現に有意差はみられなかったが、p53 の下流で働く細胞周期抑制遺伝子 p21 については IFN 投与群の前癌病変で非投与群に比べて有意に増加し、p21 によって抑制される細胞周期促進因子である Cyclin D1,Cyclin E は減少している傾向がみられた。

④ 癌の発生する 40 週での検討では、ラット 1 匹あたりの癌発生個数が IFN 継続投与群（3.000±1.633 個）で非投与群（6.750±2.217 個）に比べて有意に減少しており、IFN 初期投与群（4.000±1.633 個）でも非投与群に比べ有意差はないものの減少していた。また、それぞれの癌の平均体積にも同様の有意差がみられ、IFN 非投与群では 48.1%、初期投与群で 37.5%に中分化以上の癌がみられたのに対し、IFN 継続投与群ではすべて高分化癌であった。

⑤ IFN 受容体の発現を免疫染色で検討した結果、前癌病変では周辺の正常肝細胞と比較して発現が増加していたが、癌では正常肝細胞にくらべ発現は減少していた。

考察

現在までの報告でヒトでは IFN の肝発癌抑制効果に関与する因子として「抗ウイルス効果」「抗炎症作用」「線維化抑制作用」などが知られているが、ヒトと同じような肝炎ウイルスをもった動物モデルはまだ確立されておらず、また IFN の直接の肝癌抑制効果を検討するためにも、ウイルス、炎症、線維化等の要素を含まないモデルを用いて IFN の発癌抑制作用を検討した。動物を用いた肝化学発癌モデルでは発癌剤で initiate された肝細胞（Altered Target Cell）がセレクションのステップを経て変異肝細胞集団（focal new cell population=preneoplastic foci)を形成する。この細胞集団の一部は新しい形質を獲得しながら多段階的に発癌の経路をたどるが（promotion）一方、大半の変異肝細胞集団は分化やリモデリングにより発癌ステップからはずれる。このような肝化学発癌剤による基礎的な研究はヒトの肝発癌のメカニズム、予防治療の可能性の検討に重要であると考えられている。

今回用いたラットの肝発癌モデルでは、発癌剤である diethylnitrosamine (DEN)を投与すると、p53 の発現が低下した異型細胞が生じ、それが clonal に増殖することによって前癌病変が形成される。この前癌病変は p53 の発現が低下しているため増殖能が高く、癌化につながる。

ヒトでも肝炎ウイルスの関与により、壊死、再生が繰り返される中で遺伝子異常が蓄積し、前癌状態をへて癌化すると考えられている。実際に、HBx

抗原がp53の働きを抑制するという報告や、HCV core蛋白がp53のプロモーター活性を抑制し、p21の抑制にも関与しているといった報告がみられる。本研究ではこのp53の発現が低下した前癌状態の細胞に対し、IFNが増殖抑制に働き、癌の発生を抑えるという結果が得られた。

p21はp53の下流で細胞増殖抑制に働く代表的な遺伝子で、p53を経て誘導される経路とp53非依存性に誘導される経路が知られている。p53非依存性の経路としては、transforming growth factor (TGF)-β、酸化ストレス、c-jun、放射線、interferon regulatory factor 1 (IRF-1)などによるものが報告されており、今回IFN投与により前癌病変においてp53の発現には変化がなく、p21の発現が非投与群に比べて有意に増加していたのは、IRF-1を介した経路が関与していると考えられた。

また、前癌病変ではIFN受容体の発現が周辺の正常細胞に比べて増加しており、癌部では低下していたことから、IFNの発癌抑制作用は癌化の初期の段階でより強く働くものと考えられる。

以上より、IFNを発癌の前段階、または初期の段階から投与することで肝癌の発生と進行を抑制する効果があることが示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1582号	氏名	中谷美有紀
論文題目	**IFN-alpha prevents the growth of preneoplastic lesions and inhibits the development of hepatocellular carcinoma in the rat.** ラット肝発癌モデルにおけるインターフェロンの発癌抑制作用		
審査委員	主査 前田 益 副査 横野浩一 副査 堀田 博		
審査終了日	平成16年2月25日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

C 型肝炎感染者からの発癌予防として最も有効な治療法は、ウイルス排除を目的としたインターフェロン（IFN）治療である。近年行われた大規模な多施設研究である IHIT Study により IFN 治療群は非治療群に比べ発癌のリスクが約半分に低下し、ウイルス駆除者では 1/5 になることが明らかにされた。また、臨床的に IFN 投与は、たとえウイルス排除に有効でなくとも発癌リスクの低下や、肝癌切除後投与による術後の再発抑制をもたらすことが報告され、基礎的にも IFN による肝癌細胞株に対する増殖抑制や、アポトーシス誘導作用が示されており、IFN 自身の発癌抑制作用が示唆されているが、そのメカニズムについては解明されていない。そこで、本研究者はラットの肝発癌モデルを用いて IFN の発癌抑制効果について検討した。

実験的肝発癌モデルとして、広く用いられているラット Solt and Farber 法を用いた。まず、前癌病変に対する効果を検討するためラットを IFN 投与群、非投与群の 2 群に分け、前癌病変の出現する 4 週目に屠殺した。次に癌の発生に対する効果の検討のため IFN 非投与群、IFN 初期投与群、IFN 継続投与群の 3 群に分け、癌の発生する 40 週目に屠殺した。前癌病変、癌病変について、発生個数と体積を各群で比較し、前癌病変における細胞周期関連遺伝子 p53、p21、PCNA の発現を免疫染色の陽性率で比較した。さらに p53、p21、Cyclin D1、Cyclin E については RT-PCR によって定量的にも評価した。また、前癌病変と癌病変における IFN 受容体の発現についても免疫組織学的評価を行った。

前癌病変を Glutathione-S transferase placenta (GST-P)を用いて検出したところ単位体積あたりの前癌病変の個数は IFN 投与群で有意に低かった($p<0.05$)。また IFN 投与群の前癌病変の体積の平均値は非投与群に比べて統計学的有意差はないものの小さい傾向があった。免疫染色の結果、p53 の発現は正常肝細胞に見られ、前癌病変では検出されなかった。また、前癌病変における増殖細胞マーカーPCNA の発現は IFN 投与群で有意に減少し($p<0.01$)、増殖抑制因子である p21 の発現は IFN 投与群で増加していた($p<0.05$)。RT-PCR の結果から IFN 投与、非投与群で前癌病変における p53 の発現に有意差はみられなかったが、p53 の下流で働く細胞周期抑制遺伝子 p21 は IFN 投与群の前癌病変で非投与群に比べて有意に増加し($p<0.05$)、p21 によって抑制される細胞周期促進因子である Cyclin D1,Cyclin E は減少する傾向がみられた。

癌の発生する 40 週での検討では、ラット 1 匹あたりの癌発生個数が IFN 継続投与群で非投与群に比べて有意に減少しており($p<0.05$)、IFN 初期投与群でも非投与群に比べ有意差はないものの減少していた。また、それぞれの癌の平均体積にも同様の有意差がみられ、IFN 非投与群では 48.1%、初期投与群で 37.5%に中分化以上の癌がみられたのに対し、IFN 継続投与群ではすべて高分化癌であった。また、IFN 受容体の発現を免疫染色で検討した結果、前癌病変では周辺の正常肝細胞と比較して発現が増加していたが、癌では正常肝細胞にくらべ発現は減少していた。

本研究の重要な点は、IFN の直接の肝癌抑制効果を検討するため、ウイルス、炎症、線維化等の要素を含まないモデルを用いて IFN の発癌抑制作用を検討したことにある。本肝発癌モデルでは、発癌剤である diethylnitrosamine (DEN)を投与すると、p53 の発現が低下した異型細胞が生じ、それが clonal に増殖することによって前癌病変が形成され、この前癌病変では p53 発現が低下しているため増殖能が高く、癌化につながるものとみなされた。本研究では p53 の発現が低下した前癌状態の細胞に対し、IFN が増殖抑制に働き、癌の発生を抑えるという結果が得られた。p21 は p53 の下流で細胞増殖抑制に働く代表的な遺伝子で、p53 を経て誘導される経路と p53 非依存性に誘導される経路が知られている。p53 非依存性の経路としては、transforming growth factor (TGF)-β、酸化ストレス、c-jun、放射線、interferon regulatory factor 1 (IRF-1)などが報告されており、本研究で IFN 投与により前癌病変において p53 の発現には変化がなく、p21 の発現が非投与群に比べて有意に増加していたのは、IRF-1 を介した経路が関与していると推測された。また、前癌病変では IFN 受容体の発現が周辺の正常細胞に比べて増加しており、癌部で

は低下していたことから、IFN の発癌抑制作用は癌化の初期の段階でより強く働くものと考えられた。

以上、本研究はラット実験系を用い IFN を発癌の前段階、または初期の段階から投与することで肝癌の発生と進行を抑制する効果があることを明らかにしたものであるが、従来殆ど行われていない in vivo での IFN の肝発癌抑制効果の可能性を示唆する新しい知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。