



Anti-tumor effect of pegylated interferon in the rathepatocarcinogenesis model

三木, 章

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4331

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004331>

※ 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。



氏 名	三木 章
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1931 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Anti-tumor effect of pegylated interferon in the rathepatocarcinogenesis model(ラット肝発ガンにおけるペグインターフェロンの抗腫瘍効果)

審 査 委 員

主 査	教 授	具 英 成
	教 授	西尾 久英
	教 授	南 博信

背景

「肝細胞癌は、慢性肝疾患に前癌病変である異型性結節を経て形成される」というSalt and Farberモデルは1977年に報告された肝発癌モデルであり、発癌に際して肝炎ウイルスや炎症、線維化や他の環境因子を介さないモデルとして知られている。ラットに発癌剤であるジエチルニトロソアミン(DEN)を与え、前癌細胞を誘導し、正常肝細胞の増殖を抑制する2-アセチルアミノフルオレイン(2-AAF)を投与下に部分肝切除で増殖刺激を与えることにより、前癌細胞のクローン性進展をもたらしている。DEN投与後4週目で観察されるFociと呼ばれる結節は前癌病変と考えられており、DEN投与後40週で癌が完成するとされている。前癌病変を経て発癌をきたすこのモデルはヒトの肝発癌過程と似ていることから、前癌病変に対する治療薬の効果はヒト肝細胞癌の治療における可能性を試しているといえる。

IFN- α は、免疫を介して抗ウイルス効果や抗増殖効果をもたらす多彩な働きを持つサイトカインであり、ヒト血液、固形腫瘍の治療に広く使用されている。また近年、ペグインターフェロン(PEG-IFN)は、組み替えヒトIFN- α の変法形として開発され、持続的な吸収で半減期を延長し、患者コンプライアンスと毒性を改善したために、慢性ウイルス肝炎治療の中心となった。PEG-IFNも強い抗腫瘍効果を持ち、様々な癌の予防に使用されている。肝発癌におけるPEG-IFNの抗腫瘍効果を調べるために我々は前癌病変と肝癌の発生個数を調べ、IFNとPEG-IFNで比較した。

すでに我々はこのモデルを用いてIFN- α の肝発癌抑制効果を報告している(Carcinogenesis 25:389:2004)。IFNはアポトーシスの誘導や細胞周期関連蛋白の誘導などにより増殖抑制効果を示すことが明らかにされていることから、PEG-IFNによる発癌抑制の機序を解明するため、アポトーシス関連因子を検討した。また肝細胞癌の発癌過程には、多くの増殖・再生シグナル、また酸化ストレスなどが関与していることから、今回のモデルにおいてもそれらのマーカーを検討した。

方法

雄のFisher344ラットを用いてDENを腹腔内に投与し、2週間後から2-AAFを経口投与した。2-AAFの投与開始1週目に部分肝切除を行い、前癌病変と肝細胞癌の評価を行った。

IFN治療群は0.5MU/kgを3回/週、PEG-IFN治療群は10 μ g/kgを1回/週、DEN投与日より皮下投与し、前癌病変と肝細胞癌の個数と大きさをコントロール群、IFN群、PEG-IFN群で比較検討した。

アポトーシス関連因子としてp53とFas-L、増殖マーカーとしてPCNA、酸化ストレス関連因子として8-OHdGとチオレドキシン (TRX)、再生の関連因子

としてNotch-1を免疫染色とRT-PCRにて検討した。

4週目における肝組織では全肝より、40週目では肉眼的に癌のない非癌部組織からRNAを抽出しRT-PCRを行った。

結果

40週における肝重量と血液生化学検査:

肝重量と体重の比は3群間に違いは認めなかった。血清ALT値はコントロール群(119.5 ± 89.8 IU/l)、IFN群(48.2 ± 23.0 IU/l)、PEG-IFN群(50.0 ± 10.6 IU/l)でIFN群とPEG-IFN群においてコントロール群に比べ有意に低下していた($p < 0.05$)。

前癌病変の評価:

腫瘍や前癌病変のマーカーであるGlutathione S-transferase(GST-P)を用いて前癌病変を染色し評価を行った。病変の大きさは3群間において有意差は認めなかったが、個数はIFN群、PEG-IFN群でコントロール群に比べ有意に低下していた。

肝細胞癌の評価:

肝細胞癌の個数と体積について検討すると個数はコントロール群(6.8 ± 2.2 個/個体)、IFN群(3.0 ± 1.6 個/個体)、PEG-IFN群(3.3 ± 1.5 個/個体)で、体積はコントロール群(28.0 ± 4.0 mm³)、IFN群(18.0 ± 5.0 mm³)、PEG-IFN群(19.0 ± 2.3 mm³)で肝細胞癌の個数、体積ともにIFN群、PEG-IFN群ではコントロール群に比べ有意に低下していた($p < 0.05$)。

免疫染色とRT-PCR:

免疫染色では4週における前癌病変でPCNA、Notch-1、p53、8-OHdG、TRXの発現が周囲肝に比べ亢進していた。一方Fas-Lは前癌病変で発現が低下していた。RT-PCRでは3群間にp53、Fas-L、Notch-1、TRXにおいて有意差は認めなかった。

40週においてはPCNAとNotch-1の発現は肝細胞癌において亢進していた。他方Fas-Lは周囲肝に比べ肝細胞癌において低下していた。またp53は肝細胞癌の核に発現していた。IFNとPEG-IFNの効果を調べるため腫瘍でない肝組織を用いてNotch-1、Notch-1のリガンドであるHes-1を正常肝と比較するとコントロール群において高く、IFN群とPEG-IFN群において低下していた。逆にFas-Lの発現はIFN群、PEG-IFN群において上昇していた。

考察

本研究においてPCNA、Notch-1は前癌病変に比較的強い発現が認められた。これは4週における結節がNotchシグナルの活性化によって形成されたものであることを示し、増殖能の高い前癌病変であることを強く示唆する所見と考えられる。

Notch-1は肝細胞癌組織にも強く発現しており、これはNotch-1シグナルが肝再生とともに発癌にも強く関係していることを示している。しかしながら、Notchシグナルは肝癌細胞に対して増殖抑制に働き、増殖停止やアポトーシスと関連しているとも報告されており、Notch-1は発癌が完成した後の増殖抑制因子として働いていた可能性もある。

酸化ストレスはアルコール、ウイルス感染、虚血再還流や毒素への暴露により誘導され、肝細胞障害の原因となり肝細胞癌のリスクを上昇させる。ROSによる修復原基である8-OHdGとストレスによるチオール含有蛋白であるチオレドキシン(TRX)は主な酸化ストレスマーカーであり、この2つについて発癌、IFNとの関連について検討すると、TRX、8-OHdGは前癌病変に強い発現を認めたことから、前癌病変における酸化ストレスの誘導が肝発癌と関連していることが示された。さらに以前の報告でも示されているように、肝細胞癌の発生に炎症は必ずしも必要でないと考えられた。

今回の研究におけるPEG-IFNの抗腫瘍効果は従来型のIFNとほぼ同等であった。最近ではPEG-IFNが肝細胞癌に対しても抗腫瘍効果を持つとする報告もあり、今回の結果はこの報告を支持するものであるが、コンプライアンスの面からPEG-IFNが発癌抑制にも有効であると改めて確認できた。

IFNは細胞周期停止やアポトーシス誘導といった細胞の増殖抑制効果がある。興味深いことにFas-Lの発現は40週においてIFN群とPEG-IFN群で亢進し、p53の発現は3群間で差を認めなかった。免疫染色において、Fas-Lは40週における非腫瘍部と4週における前癌病変の周囲組織に強く発現していた。これは本モデルにおけるIFNによるアポトーシスはp53よりFas-Lを介する経路が強く関与していることを示している。

結論としてDEN誘発肝発癌モデルでは、前癌病変におけるNotch-1シグナルの活性化と酸化ストレスの蓄積が肝細胞癌の進展に関連しており、IFN、PEG-IFNによる発癌抑制効果はほぼ同等であった。その抑制効果はIFN及びPEG-IFNが周囲肝細胞にFas関連のアポトーシスを誘導することよると考えられた。

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 1932 号	氏 名	三木 章
論文題目 Title of Dissertation	Anti-tumor effect of pegylated interferon in the rat hepatocarcinogenesis model ラット肝発ガンモデルにおけるペグインターフェロンの抗腫瘍効果		
審査委員 Examiner	主 査 具 英成 Chief Examiner 副 査 西尾久英 Vice-examiner 副 査 南 博信 Vice-examiner		
審査終了日	平成 20 年 2 月 20 日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

要旨

「肝細胞癌は、慢性肝疾患に前癌病変である異型性結節を経て形成される」という Salt and Farber モデルは 1977 年に報告された肝発癌モデルであり、発癌に際して肝炎ウイルスや炎症、線維化や他の環境因子を介さないモデルとして知られている。これは、発癌剤であるジエチルニトロソアミン(DEN)でイニシエーションを与え、ラットに前癌細胞を誘導し、部分肝切除で増殖刺激を与えながら、正常肝細胞の増殖を抑制する 2-アセチルアミノフルオレイン(2-AAF)を投与することにより、前癌細胞のクローン性進展をもたらしている。DEN 投与後 4 週目で観察される Foci と呼ばれる結節は前癌病変と考えられており、DEN 投与後 40 週で癌が完成するとされている。前癌病変を経て発癌をきたすこのモデルはヒトの肝発癌過程と似ていることから、前癌病変に対する治療薬の効果はヒト肝細胞癌の治療における可能性を試しているといえる。

IFN- α は、免疫を介して抗ウイルス効果や抗増殖効果をもたらす、多彩な働きを持つサイトカインであり、ヒト血液、固形腫瘍の治療に広く使用されている。また近年、ペグインターフェロン(PEG-IFN)は、組み替えヒト IFN- α の変法形として開発され、持続的な吸収で半減期を延長し、患者コンプライアンスと毒性を改善したために、慢性ウイルス肝炎治療の中心となった。PEG-IFN も強い抗腫瘍効果を持ち、様々な癌の予防に使用されている。肝発癌における PEG-IFN の抗腫瘍効果を調べるために我々は前癌病変と肝癌の発生個数を調べ、IFN と PEG-IFN で比較した。IFN はアポトーシスの誘導や細胞周期関連蛋白の誘導などにより増殖抑制効果を示すことが明らかにされていることから、PEG-IFN による発癌抑制の機序を解明するため、アポトーシス関連因子を検討した。また肝細胞癌の発癌過程には、多くの増殖・再生シグナル、また酸化ストレスなどが関与していることから、今回のモデルにおいてもそれらのマーカーを検討した。雄の Fisher344 ラットを用いて DEN を腹腔内に投与し、2 週間後から 2-AAF を経口投与した。2-AAF の投与開始 1 週目に部分肝切除を行い、前癌病変と肝細胞癌の評価を行った。

IFN 治療群は 0.5MU/kg を 3 回/週、PEG-IFN 治療群は 10 μ g/kg を 1 回/週、DEN 投与日より皮下投与し、前癌病変と肝細胞癌の個数と大きさをコントロール群、IFN 群、PEG-IFN 群で比較検討した。40 週においては PCNA と Notch-1 の発現は肝細胞癌において亢進していた。他方 Fas-L は周囲肝に比べ肝細胞癌において低下していた。また p53 は肝細胞癌の核に発現していた。IFN と PEG-IFN の効果

を調べるため腫瘍でない肝組織を用いて Notch-1、Notch-1 のリガンドである Hes-1 を正常肝と比較するとコントロール群において高く、IFN 群と PEG-IFN 群において低下していた。逆に Fas-L の発現は IFN 群、PEG-IFN 群において上昇していた。

酸化ストレスはアルコール、ウイルス感染、虚血再還流や毒素への暴露により誘導され、肝細胞障害の原因となり肝細胞癌のリスクを上昇させる。TRX、8-OHdG は前癌病変に強い発現を認めたことから、前癌病変における酸化ストレスの誘導が肝発癌に関連していることが示された。さらに以前の報告でも示されているように、肝細胞癌の発生に炎症は必ずしも必要でないと考えられた。今回の研究における PEG-IFN の抗腫瘍効果は従来型の IFN とほぼ同等であった。最近では PEG-IFN が肝細胞癌に対しても抗腫瘍効果を持つとする報告もあり、今回の結果はこの報告を支持するものであるが、コンプライアンスの面から PEG-IFN が発癌抑制にも有効であると改めて確認できた。

IFN は細胞周期停止やアポトーシス誘導といった細胞の増殖抑制効果がある。興味深いことに Fas-L の発現は 40 週において IFN 群と PEG-IFN 群で亢進し、p53 の発現は 3 群間で差を認めなかった。免疫染色において、Fas-L は 40 週における非腫瘍部と 4 週における前癌病変の周囲組織に強く発現していた。これは本モデルにおける IFN によるアポトーシスは p53 より Fas-L を介する経路が強く関与していることを示している。本研究は、PEG-IFN の肝発癌抑制効果を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった INF の肝発癌抑制効果と Fas 関連アポトーシスとの関係について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。