
肝組織内DNA塩基障害・修復機構よりみた
肝細胞癌発生・再発環境の評価

(課題番号 15591379)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 伊藤 博

(千葉大学大学院医学研究院助教授)

研究組織

研究代表者 : 伊藤 博 (千葉大学大学院医学研究院助教授)

研究分担者 : 宮崎 勝 (千葉大学大学院医学研究院教授)

研究分担者 : 安蒜 聡 (千葉大学医学部附属病院助手)

研究分担者 : 大塚将之 (千葉大学医学部附属病院助手)

研究分担者 : 石倉 浩 (千葉大学大学院医学研究院教授)

交付決定額

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	1,800	0	1,800
平成 16 年度	1,700	0	1,700
総 計	3,500	0	3,500

研究発表

(1) 学会誌等

1. Mitsuhashi N, Shimizu H, Ohtsuka M, Wakabayashi Y, Ito H, Kimura F, Yoshidome H, Kato A, Nukui Y, Miyazaki M: Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 37: 1105-1113, 2003
2. Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome, H, Shimizu Y, Shimamura F, Miyazaki M: Extended hepatic resection and outcomes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepato-biliary Pancreatic Surgery* 10: 259-264, 2003
3. Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Morita Y, Miyazaki M: Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatology* 39: 699-710, 2004
4. Kimura F, Ito h H, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, Ohtsuka M, Shimamura F, Kato A, Nukui Y, Miyazaki M: Circulating heat-shock protein 70 is associated with postoperative infection and organ dysfunction after liver resection. *American Journal of Surgery* 187: 777-784, 2004

(2) 口頭発表

1. 新井周華、伊藤 博、土田智一、清水康仁、木村文夫、清水宏明、外川 明、吉留博之、嶋村文彦、大塚将之、宮崎 勝、石倉 浩：肝細胞癌発生母地における 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)と human 8-oxyguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) の mRNA の発現。第 103 回 日本外科学会定期学術集会 (2003 年 6 月)
2. 新井周華、伊藤 博、土田智一、木村文夫、清水宏明、外川 明、吉留博之、清水善明、大塚将之、宮崎 勝、石倉 浩：酸化ストレスより見た肝切除後の肝細胞癌再発環境の評価 第 58 回 日本消化器外科学会総会 (2003 年 7 月)
3. S.Arai, H.Ito, T.Tuchida, F.Kimura, H.Shimizu, A.Togawa, H.Yoshidome, Y.Shimizu, M.Ohtuka, M.Miyazaki, H.Ishiguro : 8-OHdG expression in liver tissue as a potential marker of hepatocarcinogenesis. 6th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association June, 2004, Washington, DC, USA

<研究目的>

肝細胞癌に対する肝切除術による外科療法は、その根治性からは最も確実な治療法と思われるが、その適応および予後向上を阻む最大の要因は多中心性発癌と残肝再発の問題である。これら肝細胞癌における多中心性発癌や癌再発の評価する指標となるものは未だ確立していない。

肝細胞癌は通常、B型、C型肝炎ウイルス感染及びアルコール、ある種の薬物など外的因子に起因する肝硬変をその発生母地とし、これら外的因子により宿主肝組織に発生する長期間の炎症（慢性肝炎）と線維化（肝硬変）の環境下に起こる遺伝子異常が肝細胞癌発生をもたらすと考えられる。すなわち肝細胞癌では増殖能、浸潤能、転移能といった通常の腫瘍側因子の他に、発癌様式や再発に関与する宿主である肝の環境因子がその予後に大きく影響を及ぼすこととなる。

この慢性障害肝における発癌に関わる遺伝子異常を引き起こす一因として DNA の酸化障害を引き起こす活性酸素類 reactive oxygen species(ROS)の産生増加が報告されている。多くの ROS のうち hydroxyl radical(OH⁻)は guanine 塩基を修飾し強い DNA 障害をもたらすが、通常は DNA の修復機構により 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)として除去される。この DNA 障害塩基除去修復過程で中心的役割を果たすのが human ogg1 gene(hOGG1)である。

一方、肝臓に豊富に存在するチトクローム P450 (CYP)酵素群は生体異化合物代謝酵素 (Xenobiotic metabolizing enzyme) の中心的役割を果たすヘム蛋白であり、数多くの外的異化合物、とりわけ細胞膜を容易に通過し細胞毒となる脂溶性物質の解毒代謝に大きく関わっている。これら CYP 酵素群は、特定の薬物、食物、アルコール、タバコなどで誘導されることが知られている。さらに酵素群の種類、量、誘導における個体差が解毒および代謝における、薬剤効果や外的有害物質への感受性の違いに反映される。癌との関連では特にタバコとの因果関係が指摘される肺癌において CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 などとの関連が報告されている。

またアラキドン酸からのプロスタグランジン合成酵素のうち誘導型の cyclooxygenase-2 (COX-2)は、ある種の癌において発現し発癌、増殖、血管新生などに関与するとされ、非ステロイド性消炎鎮痛剤の大腸癌予防効果で知られており、肝細胞癌における臨床研究ではその発現が癌の分化度と関連するとの報告がある。この COX-2 がチトクローム P450 からのプロスタグランジン変換を促し、その際活性酸素生成産物である malondialdehyde (MDA)が産生されるとの報告がありチトクローム P450 が豊富な肝組織において先に述べた8-OHdGに代表される活性酸素によるDNA障害を通じ肝細胞癌発生、発癌・発育様式に関連するのではと考え本研究を着想した。

本研究において肝癌および非癌組織中の 8-OHdG および hOGG1 さらには種々のチトクローム P450、及び COX の発現パターンを検討することにより攻撃因子側として1) 活性酸素を主とする発癌因子測定による肝細胞癌発生母地としての肝組織の環境評価、および防御因子側として2) 外的発癌因子に呼応し誘導される内的防御因子の個体差などを遺伝子解析も含めを明らかにできればと望んでいる。

肝臓外科の見地からは個々の臨床症例における、肝細胞癌に対する外科手術療法の成績を左右する多中心性発癌、残肝再発の指標となり得るのに加え、チトクローム P450 酵素群の多様性からの個体差が補助療法としての化学療法における薬剤代謝に関連し制癌効果および薬剤選択の有力な指標となる可能性が期待される。

<研究成果>

[方法] 研究対象としてC型肝炎併存の肝細胞癌 40 例と Control 群として正常肝症例 16 例の非癌部肝切除標本を用いた。酸化ストレスによる DNA 塩基傷害指標となる 8-OHdG は抗体による免疫組織染色を行い肝細胞千個中の陽性細胞数を 8-OHdG labeling index(8-OHdG L.I.)として、さらに 8 hOGG1 の mRNA 発現を Real-Time quantitative PCR 法を用いて測定した後 hOGG1/GAPDH との比で表し各種臨床パラメータおよび病理組織学的因子と比較検討した。

[結果]

- 1) 8-OHdG L.I.と hOGG1 mRNA 発現は Control 群に比べ HCC 非癌部で有意に高かった。
 - 2) 各種臨床データと 8-OHdG L.I.および hOGG1 mRNA 発現との比較検討では 8-OHdG 低発現、hOGG1 mRNA 高発現および外科的切除断端陰性と微小肝静脈浸潤陰性の各因子が無再発期間延長と相関を示した。
- DNA 傷害の指標としての 8-OHdG 及び hOGG1 の測定は肝細胞癌治療後の肝内再発環境評価に有用な指標となりうることが示めされた。

<本研究の展開>

本研究においては肝切除により得られた肝細胞癌肝組織標本のうち非癌部組織を中心に検討することで、残肝組織内の癌再発環境を評価し得ると考えられる。非癌組織中の 8-OHdG および hOGG1 の発現を検討することにより 1) 攻撃因子側として、活性酸素を主とする DNA 傷害をもたらす酸化ストレス発癌因子測定による肝細胞癌発生母地としての肝組織の環境評価、2) 防御因子側として外的発癌因子に呼応し誘導される DNA 傷害修復遺伝子発現に代表される内的防御因子と癌再発、予後との関係が明らかにされるものと思われる。また内的防御力の個体差などが遺伝子解析も含めを明らかにできればと望んでいる。さらには治療に繋がる研究としては再発環境の改善が重要であり、上記攻撃因子の軽減として、ウイルスの除去や、薬物・食物による活性酸素の発生軽減や中和を促すことで、癌化学予防(chemoprevention, bio-chemoprevention)に繋がる研究も試みたい。

肝臓外科の見地からは個々の臨床症例における、肝細胞癌に対する外科手術療法の成績、ならびに適応を左右する多中心性発育、残肝再発の指標が確立すれば手術時において残肝再発危険群の抽出が得られ、術後の予防的補助療法などの治療選択が行われる可能性が期待される。