

研究課題の概要

研究課題名	遺伝子多型ラットを用いたペルオキシソーム増殖剤のヒト発がんリスクの評価法の開発
主任研究者	土田 成紀
所属機関	弘前大学
研究成果の概要	グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST) M1遺伝子がNC型であるラットのペルオキシソーム増殖剤(PP)に対する低感受性は、PP活性化受容体(PPAR) α の内因性リガンド(hydroxyepoxyeicosa-trienoic acid, HEETなど)の産生低下によること、ヒト肝でもHEETの産生系は低下、分解系は増加し、その低感受性がNC型ラットと類似すること、NC型ラットが、ヒト肝でのPPのリスクを評価するモデルとなることを明らかにした。高感受性のKS型のラット肝では、肝前がん病変の出現に先行して、ペルオキシソームの二頭酵素(BE)の強い誘導が起きること、この誘導は、ヒストンアセチル化などエピジェネティックな機構によること、PPIによるラット肝発がん過程はBE陰性化とGST-A4発現との2段階に分けられることを明らかにした。これらの結果から、NC型ラットではBEの誘導が低く、前がん病変ができる前の状態にとどまっていると考えられた。

評価所見	実験そのものは良く行われたと考えるが、本来、リスク評価に活用することが目的の研究であり、KCとNC型ラットにペルオキシソーム増殖剤であるクロフィブレートを投与した場合、肝毒性や発がん性を指標としたNOAELがどの程度異なるかを比較する等の研究が必要であった。また、NCラットがペルオキシソーム増殖剤のヒトに対する評価モデルとなり得ることが示されたとされているが、評価モデルとして活用可能になるまでには、かなりの時間を要すると考えられる。
評価結果	目標の達成は不十分であった。

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	遺伝子多型ラットを用いたペルオキシソーム増殖剤のヒト発がんリスクの評価法の開発
主任研究者名	所属：弘前大学大学院医学研究科 氏名：土田 成紀（研究課題番号：0701）

ペルオキシソーム増殖剤（PP）は長期投与によりラットやマウスに肝がんを誘発するのに対し、ヒトでは発がん性は低いと考えられ、動物の種により発がん感受性が異なる。SD ラットのグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)-M1 遺伝子に KS 型と NC 型の 2 つの多型が存在する。KS 型ラットは 4 週間の PP 投与で肝にニ頭酵素（BE）が強く誘導され、6 週間以上の投与で BE 陰性巣（肝前がん病変）が出現するのに対し、NC 型ラットでは BE の誘導は弱く、陰性巣は出現しない。NC 型ラットの低感受性の機序を明らかにし、ヒト肝でも同様の機序で低感受性であることから、同ラットがヒト肝での PP のリスクを評価するモデルとなることを明らかにした。一方、PP による KS 型ラット肝発がん過程は BE 陰性化と GST-A4 発現との 2 段階で進み、GST-A4 陽性の病変は、遺伝毒性物質による GST-P 陰性病変と性質が類似することを明らかにした。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	遺伝子多型ラットを用いたペルオキシソーム増殖剤のヒト発がんリスクの評価法の開発 (研究期間：平成19年度～21年度)
主任研究者名	所属：弘前大学大学院医学研究科 氏名：土田 成紀(研究課題番号：0701)

1. 研究の概要

目的、必要性

ペルオキシソーム増殖剤（PP）には、高脂血症の治療薬や食品包装用プラスチックの可塑剤など食品に混入する危険のある広汎な物質が含まれる。PPは長期投与によりラットやマウスに肝がんを誘発するのに対し、ヒトでは発がん性は低いと考えられ、動物の種により発がん感受性が異なる。このため実験動物の結果をヒトへ外挿できないという問題がある。

SDラットのGST-M1遺伝子にKS型とNC型の2つの多型が存在する。KS型ラットは4週間のPP投与で肝にBEが強く誘導され、6週間以上の投与で多数のBE陰性巣（肝前がん病変）が出現するのに対し、NC型ラットではBEの誘導は弱く、6-60週間投与しても陰性巣はほとんど出現しない。NC型ラットのペルオキシソーム増殖剤（PP）に対する低感受性はヒトに類似し、ヒトのモデルになると期待される。

成果

NC型ラット、KS型ラット、ヒト肝、ヒト肝細胞、ヒト星細胞での成果と、相互の関係を図にまとめて示した。

	Control	Clofibrate投与	
	PPARリガンド産生系/ 標的遺伝子の発現	4 weeks BE誘導	8-60 weeks 前がん病変 (BE陰性)
KS型ラット肝	高い	高い ヒストン アセチル化	出現 → GST-A4 陽性
NC型ラット肝	低い	低い	なし
ヒト肝	低い		
ヒト肝細胞	低い	低い	
ヒト星細胞	低い	低い	

本研究は、NC型ラットの低感受性が、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR） α の内因性リガンド（hydroxyepoxyeicosatrienoic acid, HEET など）の産生低下により、外来性のPPに低反応になることを明らかにした。この低下により、PPAR α の内因性の標的遺伝子（ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化酵素など）の発現は低下した。また、ヒト肝でもHEETの産生系は低下、分解系は増加し、NC型

ラット肝と類似し、ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の発現レベルも同ラット肝に近いことを明らかにした。さらに培養ヒト肝細胞や星細胞を使い、ヒト遺伝子の PP に対する低反応性を確認した。これらの結果から、NC 型ラットは、ヒト肝での PP のリスクを評価するモデルとなることを明らかにした。

KS 型ラット肝を利用し、クロフィブレート (CF) によるラット肝発がん過程を解析し、肝前がん病変の出現に先行して、ペルオキシソームの二頭酵素 (BE) の強い誘導が起きること、この誘導は、BE 遺伝子のプロモーターへの PPAR α 、steroid receptor coactivator-3、BE などの結合によるヒストンアセチル化によることを明らかにした。KS 型では CF 投与 8 週間から BE 陰性巣が出現し、CF 投与 15 週間から BE 陰性巣の 33%は glutathione S-transferase (GST)-A4 陽性、nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf) 2 陽性を示すように変化し、投与 60 週間には BE 陰性巣の 80%が陽性になった。

NC 型ラットでは CF 投与による BE 誘導が弱く、BE 陰性巣は出現せず、GST-A4 陽性病変もなかった。

遺伝毒性発がん物質の投与により、ラット肝に GST-P 陽性と陰性の前がん病変が誘発されること、GST-P 陰性病変の 70%で GST-A4 と Nrf2 が陽性となることを明らかにした。これらの結果から、CF による KS 型ラット肝発がん過程は BE 陰性化と GST-A4 発現との 2 段階に分けられること、GST-A4 陽性の病変は、遺伝毒性物質による GST-P 陰性病変と性質が類似することを明らかにした。

これまで、PP と遺伝毒性物質によるラット肝発がん過程は異なると考えられていたが、CF 投与 15 週以降の時点では共通点があることを明らかにした。ラットを用いた化学物質の発がん性試験では、これまで GST-P 陽性の病変が注目されていたが、GST-P 陰性の病変も存在することを明らかにした。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

1) 平成19年度研究成果の概要

GST 遺伝子多型ラットでの PP に対する肝発がん感受性の差異に係わる要因の解析

①目的

SD ラットの GST-M1 遺伝子に KS 型 と NC 型の 2 つの多型が存在する。KS 型ラットは 4 週間の PP 投与で肝に BE が強く誘導され、6 週間以上の投与で多数の BE 陰性巣（肝前がん病変）が出現するのに対し、NC 型ラットでは BE の誘導は弱く、6・60 週間投与しても陰性巣はほとんど出現しない。NC 型ラットのペルオキシソーム増殖剤（PP）に対する低感受性はヒトに類似し、ヒトのモデルになると期待される。KS 型と NC 型ラットのクロフィブレート（CF）に対する感受性の差異に係わる要因を解明する。

②方法と③成果

PP として CF を 4 週間投与した KS 型と NC 型ラット肝と投与していないコントロール肝の抽出液を用いて

イ) BE 遺伝子の発現に係わる PPAR α 、その補助因子（steroid receptor coactivator (SRC)-1、2、3、PPAR binding protein (PBP) などの発現をウエスタンブロットで検討した。CF 投与に伴い PPAR α は 2—3 倍に増加したが、KS 型と NC 型で差を認めなかった。SRC-3 は CF 投与による変動を認めなかったが、KS 型で NC 型の 3 倍高い値を示した。SRC-1、2、PBP は、両ラットで検出されなかった。

ロ) PPAR α を固定化したカラムに、上記の 4 種類の核抽出液をかけ、吸着するタンパク質を SDS 電気泳動とウエスタンブロットにより分析した。CF 投与の KS 型肝では、BE、チオラーゼ（TH）、SRC-3 の結合を認めた。NC 型ラット肝とコントロールの KS 型肝では、これらの結合を認めなかった。

ハ) CF 投与の KS 型肝では、ウエスタンブロットによりヒストン H3 のアセチル化（Lys 9 or 14 残基）を認めたが、NC 型肝やコントロールの KS 型肝では認めなかった。

これらの結果から、PP に高感受性の KS 型ラットでは、肝発がん過程の初期に起こる BE の強い誘導にヒストンのアセチル化亢進などエピジェネティックな機構が関与することが示唆された。一方、NC 型では、PPAR α 量には差を認めなかったが、SRC-3 は低く、BE や TH は PPAR α に結合せず、ヒストンのアセチル化が低いことが判明した。

2) 平成20年度研究成果の概要

1 GST遺伝子多型ラットでのPPによる非実質細胞の活性化の差異

①目的

遺伝毒性発がん物質によるラット肝発がん過程では肝細胞だけでなく、Kupffer細胞などの非実質細胞の関与が示唆されている。遺伝子多型ラットでのCFによる肝前がん病変出現の差異に、非実質細胞が関与するか、非実質細胞のCFに対する反応性が異なるか検討する。

②方法と③成果

KS型とNC型ラット肝の間で、CF 8週間投与に伴うKupffer細胞、星細胞、血管内皮細胞の数の変化を免疫組織化学的に検討した。Kupffer細胞はCD68を、星細胞は平滑筋 α -actin (α -SMA)とcellular retinol binding protein (CRBP) 1を、内皮細胞はCD34をマーカーとして検出した。Kupffer細胞はCF投与によりKS型とNC型ともに、約30%減少した。星細胞はKS型で著しく減少した。

KS型とNC型ラットの間で、マイクロアレイを用いて遺伝子発現を解析した。 α -SMAは、KS型ラットでCF投与により増加し、免疫組織化学の結果と異なっていたが、この分子は平滑筋にも発現するため、アレイは、それを反映している可能性が考えられる。内皮細胞のマーカーCD34はCF投与によりKS型とNC型ともに減少した。

さらに、CF投与によりKS型ではBE陰性巣が出現し、同病巣ではGST A4とnuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf) 2が発現することを明らかにした。遺伝子毒性発がん剤によるラット肝発がん過程ではGST-P陽性の病変の他に、GST-P陰性の病変も出現する。GST-P陰性の病変では、GST A4とNrf2が発現することを見い出した。

2 ヒトGST遺伝子多型と肝での2頭酵素とPPAR α 発現の関連の解析

①目的

ヒト肝でGST遺伝子多型とペルオキシソーム酵素遺伝子発現の関係を検討した。肝疾患患者の肝組織20例についてGST-M1遺伝子型（欠損 (Null) 型、M1A型 (K型)、M1B (N型) の3種類) を調べ、それぞれの遺伝子型の肝8例についてアレイ解析を行った。

②方法と③成果

ヒトGST-M1遺伝子型の判定はFryerらの方法に従って行った。ヒト遺伝子発現アレイの結果からペルオキシソームとミトコンドリアに局在する脂肪酸の β -酸化に働く17種類の酵素遺伝子を選び、GST-M1遺伝子型により発現が異なるか検討した。それぞれの遺伝子の発現とGST-M1遺伝子型との間に関連は認められなかった。また、これらの遺伝子とPPAR α の発現にも明らかな関連は認められなかった。

3) 平成21年度研究成果の詳細

1 ヒト肝細胞／非実質細胞とNC型ラット肝のPPに対する応答能の比較

①目的

平成20年度のヒト肝のアレイ解析で、GST-M1遺伝子型とペルオキシソームやミトコンドリアの脂肪酸β-酸化酵素遺伝子発現の間に関連が認められなかったことから（表1）、

表1 ヒト肝でのペルオキシソームとミトコンドリアの脂肪酸β-酸化酵素遺伝子の発現

各試料の先頭の数字（例えば 3-Null-Mの3）は試料の識別番号、NullはM1遺伝子欠損型、M1AとM1BはM1遺伝子型。末尾のMは男性からの試料、Fは女性からの試料。数値は発現アレイの測定結果で無単位。数値が大きい程、遺伝子の発現量が多い。

遺伝子	GST-M1遺伝子型と性							
	3-Null-M	6-Null-M	19-M1A-M	8-M1B-M	7-M1AB-M	11-Null-F	18-M1A-F	9-M1B-F
PPARalpha	4790	2460	2420	4290	3760	2040	4070	5580
RXRA	4480	2910	2070	5350	4920	3400	4980	6290
Peroxisomal beta-oxidation								
Acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl	7260	12900	9250	13400	15500	7650	8940	7630
Acyl-CoA oxidase 2, branched chain	2790	3280	3710	8790	8330	4550	5830	8880
Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, EHHADH (LBP)	15800	7790	15700	22700	10400	14700	15800	7220
Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4, HSD17B4 (DBP)	18700	23400	14900	24600	18600	16400	15800	15900
Acetyl-CoA acyltransferase 1	19500	21600	15600	27800	31100	18800	21200	19500
Sterol carrier protein 2	43200	36200	19100	39100	33200	30600	33700	28900
Mitochondrial beta-oxidation								
Acyl-CoA dehydrogenase very long chain, ACADVL	13100	10000	9470	9830	14400	8530	7750	8060
ACADL	1380	740	1220	2270	1170	1580	1400	1340
ACADM	15500	15200	16500	26800	13200	19400	16200	10300
ACADS	1260	1920	1760	2660	2800	1810	1690	2250
ACADSB (short/branched chain)	7460	9210	15000	20800	13000	9680	18100	21200
ACAD11	4550	2410	2860	6340	6660	5100	5410	6870
Enoyl-CoA hydratase short chain 1, ECHS1	12200	16800	18500	22400	26500	24900	15900	23700
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, HADH	8750	12100	6790	12100	8880	10500	9440	11300
Acetyl-CoA acyltransferase 2	3300	12900	11500	14500	22800	11200	8070	13800
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, alpha subunit, HADHA	4440	5910	4160	4420	4960	3430	4460	3880
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, beta subunit, HADHB	10500	17900	27100	21300	21600	18300	13200	11300

NC型ラットのCFに対する低感受性に係わる新たな要因とその機序を解明する。これらの遺伝子のヒト肝での発現レベルがNC型ラットのレベルに近いこと、培養ヒト肝細胞を用いてこれらの遺伝子がPPに低反応性であることを明らかにする。

②方法

CFを含まない基礎食を投与したコントロールのオスとメスNC型とKS型のラット肝の遺伝子発現を、アレイにより網羅的に解析した。PP投与前と投与後のヒト肝を得ることはきわめて困難であることから、非投与肝を用いて、低反応性を規定する分子を明らかにするためである。Comparative genomic hybridization (CGH)解析は、NC型とKS型ラット核DNAを材料に、Agilent CGH アレイを用いて、そのプロトコールに従い行った。

NC型ラット肝で低下している後述の遺伝子のヒト肝での発現レベルを調べ、ラットのレベルと比較した。培養ヒト肝細胞株HepG2とヒト星細胞にclofibrilic acid処理を行い、ヒト遺伝子の発現変化を解析した。

当初計画していたヒト細胞を移植したキメラマウスの実験は、本研究の目的を実現するためにCGH解析に変更し、代わりにヒト肝細胞と星細胞の実験で補った。

③成果

イ) NC 型ラット肝での PPAR α リガンド産生酵素遺伝子と標的遺伝子の発現低下

発現アレイ解析の結果、NC 型ラットでは、脂肪酸の ω -水酸化経路の遺伝子（チトクローム P-450 4a2/4a3 (Cyp4a2/4a3)など）、脂肪酸の β -酸化経路の遺伝子（Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b、acetyl-CoA acyltransferase) など、PPAR α 標的遺伝子の発現が低下していることを見出した(表2)。Epoxide hydrolase 2 の発現は増加した。一方、PPAR α により発現が制御されるペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化経路と α -酸化経路の遺伝子、ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化経路のその他の遺伝子の発現には差がなかった(表3)。このように NC 型ラット肝では、CF の投与がなくても PPAR α 標的遺伝子の一部が低下していることが明らかになった。

表2 KS 型と NC 型ラット肝で発現に差がある遺伝子

各試料の末尾の M はオス、F はメスを示す。数値は発現アレイの測定結果で無単位。

遺伝子	GST-M1遺伝子型と性			
	KS型-M	NC型-M	KS型-F	NC型-F
1 脂肪酸 omega-水酸化経路				
Cyp4a2/4a3	29500	10800	18700	12100
Alcohol dehydrogenase 1	10100	1060	9440	5080
Aldehyde dehydrogenase 1a7	1340	140	3060	9030
Epoxide hydrolase 2	110	2560	400	2410
2 脂肪酸 beta-酸化経路				
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase				
b (Trifunctional protein), Hadhb	11500	6830	12300	7470
Acetyl-CoA acyltransferase 2	21600	12100	18100	9960
Dodecenoyl-CoA delta isomerase	6710	3460	7090	5030
2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	12800	7500	11600	6720
Enoyl-CoA hydratase 1, Ech1	5170	2500	8290	2890
Carnitine O-octanoyl-transferase	7830	1990	3780	1890
3 その他				
CD36	1770	780	23500	9560
Lipoprotein lipase	410	230	160	150
Angiopoietin-like 4	7220	1010	8760	3470

表3 KS型とNC型ラット肝で発現に差のない遺伝子

1 ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化経路

acyl-CoA dehydrogenase very long chain (Acadvl), acyl-CoA dehydrogenase long chain (Acadl), acyl-CoA dehydrogenase medium chain (Acadm), acyl-CoA dehydrogenase short chain (Acads), acyl-CoA dehydrogenase short branched chain (Acadsb), Acad11, enoyl-CoA hydratase short chain 1 (Echs1), L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase short chain (Hadh), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein) alpha subunit (Hadha)

2 ペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化経路

acyl-CoA oxidase 1 (Acox1), acyl-CoA oxidase 2 (Acox2), enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (L-bifunctional protein, Ehhadh, BE をコード), hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4 (D-bifunctional protein, Hsd17b4), acetyl-CoA acyltransferase 1 (Acaa1, thiolase をコード), sterol carrier protein 2 (Scp2), 2,4-dienoyl-CoA reductase 2 (Decr2), peroxisomal D3.D2-enoyl-CoA isomerase (Peci)

3 ペルオキシソームの脂肪酸 α -酸化経路

phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (Phyh), Phyh2, alpha-methylacyl-CoA
racemase (Amacr)

表 2 に示した NC 型ラット肝で発現が低下している遺伝子 (Cyp4a2/4a3、Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b、acetyl-CoA acyltransferase 2 など) は、アラキドン酸を含む不飽和脂肪酸の ω -水酸化とその後の β -酸化に係わる酵素であり (図 1)、enoyl-CoA hydratase 1 (Ech1) 遺伝子は、ミトコンドリアとペルオキシソームに局在する delta 3,5-delta 2,4-dienoyl-CoA isomerase をコードし、ミトコンドリアの enoyl-CoA hydratase short chain 1 (Echs1) とは異なる遺伝子である。低下している β -酸化のその他の酵素は、いずれもミトコンドリアに局在する酵素である。

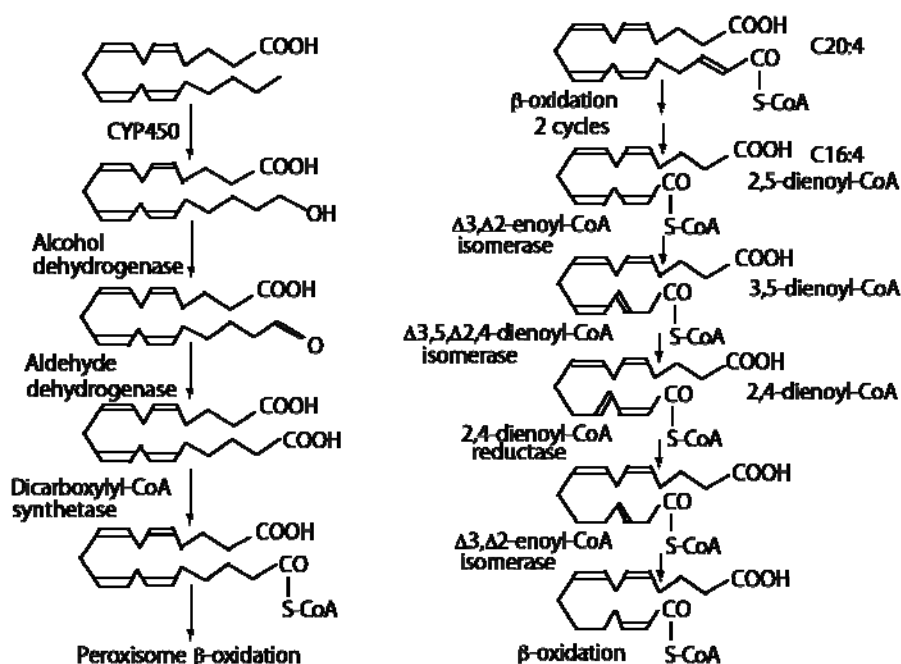


図1 アラキドン酸の ω -水酸化と β -酸化

ロ) NC 型ラットでの phospholipase A2 group IVc 遺伝子の欠失

CGH 解析の結果、NC 型ラットに、染色体 1q21 領域に phospholipase A2 group IVc (Pla2g4c) 遺伝子座を含む約 40 kb の欠失が認められた。

Pla2g4c はグリセリン脂質からアラキドン酸を放出し、アラキドン酸やそのエポキシ体 (epoxyeicosatrienoic acid, EET) の ω -水酸化物 (20-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) と hydroxyepoxyeicosatrienoic acid (HEET)) は、PPAR α の内因性リガンドとなることが報告されている (図 2)。アラキドン酸から EET の産生はチトクローム P-450 2c (Cyp2c) により、 ω -水酸化物の産生は Cyp4a による。Epoxide hydrolase 2 (EH2) は EET を dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET) に変換し、不活化する。NC 型ラットでは、Pla2g4c 遺伝子の欠失と Cyp4a2/4a3 の発現低下、epoxide hydrolase 2 の発現増加により (表 2)、PPAR α リガンドの産生が低下し、PPAR α 標的遺伝子の発現が低下していることが示唆される。Pla2 には多くのアイソザイムが存在する。ラット肝では Pla2g4c のほか、Pla2g4a や Pla2g6、Pla2g12a などが発現する。NC 型ラット肝で Pla2g4c 遺伝子が欠失しても、ほかのアイソザイムによりアラキドン酸のレベルは補償される可能性があり、PPAR α のリガンド低下には、Cyp4a 低下と epoxide hydrolase 2 増加が主に関与することも考えられる。

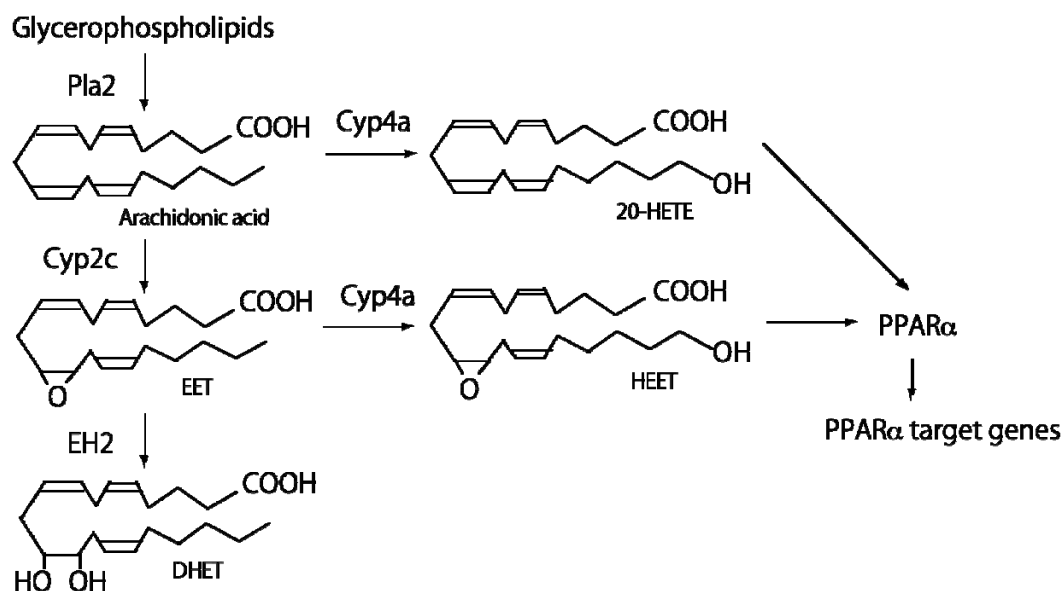


図2 PPAR α のリガンドHEETと20-HETE の合成経路

ハ) ヒト肝における PPAR α リガンド産生酵素遺伝子と脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の発現

NC 型ラット肝で低下していた遺伝子や PPAR α のリガンド産生に係わる遺伝子のヒト肝での発現レベルを調べ、その結果を表 4 にまとめた。ラット Cyp2c に対応するヒト CYP2C はラット肝より発現が高く、CYP4A11 と epoxide hydrolase 2 は、NC 型ラット肝に近い発現レベルであった (表 2 との比較から)。脂肪酸 β -酸化経路の acetyl-CoA acyltransferase 2 や dodecenoyl-CoA delta isomerase、carnitine O-octanoyltransferase の発現レベルも NC 型ラットの対応する遺伝子の発現と同程度であった。

これらの結果から、ヒト肝と NC 型ラット肝は、PPAR α リガンド産生系と脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の発現レベルで類似することが示唆された。

表4 ヒト肝での HEET 産生系と脂肪酸 β -酸化経路の遺伝子発現

遺伝子	GST-M1遺伝子型と性							
	3-Null-M	6-Null-M	19-M1A-M	8-M1B-M	7-M1AB-M	11-Null-F	18-M1A-F	9-M1B-F
PPAR α	4790	2460	2420	4290	3760	2040	4070	5580
RXRA	4480	2910	2070	5350	4920	3400	4980	6290
Phospholipase A2 group IVC, PLA2G4C	930	1240	880	1290	760	970	600	750
CYP2C8	70700	52700	36000	53000	65100	44300	46700	52400
CYP2C9	35500	33100	41400	48900	42900	32800	33300	45900
CYP4A11	22800	15800	10800	15700	15700	8420	12600	13900
Epoxide hydrolase 2	1000	1520	1800	2610	2590	3530	1610	2620
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b (Trifunctional protein), HADHB	10500	17900	27100	21300	21600	18300	13200	11300
Acetyl-CoA acyltransferase 2	3300	12900	11500	14500	22800	11200	8070	13800
Dodecenoyl-CoA delta isomerase	1280	1690	1980	2230	1910	2400	1840	1900
2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	6180	10300	12100	9700	11100	12000	8830	11700
Enoyl-CoA hydratase 1	1510	2790	3640	5470	3690	4440	3630	3360
Carnitine O-octanoyltransferase	3020	2400	1940	3310	5360	1620	2820	3290
Phytanoyl-CoA hydroxylase	32100	28100	24400	43200	39000	28300	43500	40200
APOA1	95700	86700	52200	64500	88500	44100	67200	77100
ABCG1	450	1390	1150	340	270	1040	910	430

ニ) Clofibrilic acid による培養ヒト肝細胞での脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の誘導能の評価

ヒト肝のPPAR α 標的遺伝子の発現レベルは、NC型ラット肝に近いことから、これらのヒト遺伝子が、PPに低反応性か検討するため、ヒト肝細胞株HepG2細胞を用いて、clofibrilic acidで処理し、遺伝子発現の変化を解析した。HepG2細胞の培養は、10% 牛胎児血清を加えたMEM培地で行い、clofibrilic acid処理は、0.5 mMと2.0 mMの最終濃度で培地に加え、3日間培養した。培養後、細胞を回収し、RNAを調製し、アレイ解析を行った。コントロールは、培地にエタノールのみを加えた。

コントロールの HepG2 細胞では、脂肪酸 ω -水酸化経路の遺伝子 (CYP4A11) の発現は低かったが、脂肪酸 β -酸化経路の遺伝子の多くが (Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b, acetyl-CoA acyltransferase 2 など)、高濃度の clofibrilic acid 投与により 44-74%増加した (表 5)。ペルオキシソームの enoyl-CoA hydratase/ 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EHHADH、BE をコードする遺伝子) の増加も 63%であり、KS 型ラット肝のような著しい増加は認められず、ヒトのこれら遺伝子の誘導は低いことが確認された。ヒト遺伝子の CF に対する低反応性は、NC 型ラット肝と類似の機序による可能性が考えられる。HepG2 細胞ではヒト肝に比べ、CYP4A11 や CYP2C、PLA2G4C の発現は著しく低下し、これが PPAR α リガンドの低下をもたらすのに対し、ヒト肝では epoxide hydrolase 2 が強く発現し、これがリガンド低下に係わることが示唆される。

表5 ヒト HepG2 細胞での clofibric acid (CFA) による遺伝子発現の変化

遺伝子	CFA 0	CFA 0.5	CFA 2.0
PPARalpha	470	480	890
RXRA	1080	690	2050
PLA2G4C	38	60	4
CYP2C8	47	2	5
CYP2C9	57	35	54
CYP4A11	60	21	13
Epoxide hydrolase 2	230	210	240
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase			
b (Trifunctional protein), HADHB	9890	11100	13300
Acetyl-CoA acyltransferase 2	2210	2010	3190
Dodecenoyl-CoA delta isomerase	2890	3340	3040
2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	1680	1700	2610
Enoyl-CoA hydratase 1	2020	2710	3510
Carnitine O-octanoyltransferase	280	290	460
Phytanoyl-CoA hydroxylase	1870	2310	4960
APOA1	22400	21700	24100
ABCG1	59	3	24

NC 型ラット肝とヒト肝、ヒト HepG2 細胞の PPAR α リガンド産生系と標的遺伝子の発現変化を表 6 にまとめた。HEET は PPAR α の内因性のリガンドであり、PLA2G4C と CYP2C、CYP4A は HEET の産生に、epoxide hydrolase 2 は産生抑制に働く (図 2)。NC 型ラットとヒト肝では、PLA2G4C の発現は異なるものの、それ以外の発現は類似し、両者で内因性のリガンドによる PPAR α の活性は低下していた。内因性のリガンドが、外因性の PP に対する反応性を規定することが報告されている。NC 型ラットで HEET の産生系が低下、分解系が亢進している本研究の結果はこの考えを支持する。ヒト肝の HEET 代謝系は NC 型ラット肝と類似する。これらの結果から、NC 型ラット肝は、ヒト肝での PP のリスクを評価するモデルになると考えられる。ただし、GST-M1 の多型が、NC 型ラット肝の PP に対する低反応性に直接関与する可能性は低く、同ラットで PPAR α の内因性のリガンドが低下していることによると考えられた。

表6 NC型ラット肝とヒト肝の PPAR α リガンド産生系と標的遺伝子発現の類似性

遺伝子	KS型ラット肝	NC型ラット肝	ヒトHepG2細胞	ヒト肝
PLA2G4C	+	-	-	+
CYP2C	++	++	-	++
CYP4A	++	+	-	+
Epoxide hydrolase 2	-	++	-	++
PPAR α の活性化				
内因性リガンド (HEET)				
HADHB, DCI, ECH1の発現	++	+	±	±
外因性アゴニスト (PPs)				
ACOX1, EHHADHの発現	++	+	±	/

ホ) Clofibric acid によるヒト星細胞での脂肪酸 β -酸化とレチノール代謝系酵素遺伝子の誘導能の評価
ヒト星細胞 (ScienCell Research Laboratories, San Diego, CA, USA) をプロトコールに従い培養、0.5 mM と 2 mM clofibric acid で2日間処理し、遺伝子発現の変化を解析した。ヒト星細胞では、PPAR α の発現は認めたが、PPAR α リガンド産生系と epoxide hydrolase 2 遺伝子の発現は認めず、clofibric acid 処理による脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の誘導は、enoyl-CoA hydratase 1を除いて観察されなかった (表7)。星細胞はレチノールを多量に含み、活性化刺激によりレチノールからレチノイン酸が合成されることが知られている。この合成には alcohol dehydrogenase と aldehyde dehydrogenase が係わることから、これら酵素遺伝子の発現が clofibric acid 処理により変化するか検討した。星細胞で発現レベルが高い遺伝子を表7に示した。どのアイソザイムがレチノイン酸の合成に係わるか、明らかでないが、aldehyde dehydrogenase 1A3を除いて、明らかな変化はなかった。レチノイン酸の分解に働く CYP26A1 と CYP26B1 の発現は観察されなかった。CRBP1については後述する。これらの結果から、ヒト星細胞の clofibric acid に対する反応性は低いと考えられた。

表7 ヒト星細胞の HEET 産生系、脂肪酸 β -酸化経路、レチノール代謝系遺伝子の clofibric acid (CFA) による発現変化

遺伝子	CFA 0	CFA 0.5	CFA 2.0
PPARalpha	480	430	320
RXRA	1080	1420	1570
PLA2G4C	37	9	21
CYP2C8	23	26	21
CYP2C9	55	13	29
CYP4A11	60	83	100
Epoxide hydrolase 2	12	34	55
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b (Trifunctional protein), HADHB	7800	8420	7970
Acetyl-CoA acyltransferase 2	1680	1900	2260
Dodecenoyl-CoA delta isomerase	660	800	920
2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	4290	4500	4010
Enoyl-CoA hydratase 1	1130	1440	1750
Carnitine O-octanoyltransferase	560	700	740
Phytanoyl-CoA hydroxylase	3130	3240	3370
APOA1	360	320	480
ABCG1	650	620	450
レチノール代謝系			
Retinol saturase	740	820	750
Cellular retinol binding protein 1	8050	7980	4550
Alcohol dehydrogenase 5	7240	7930	7030
Aldehyde dehydrogenase 1A3	2940	2940	4580
Aldehyde dehydrogenase 1L2	1960	1860	2350
Aldehyde dehydrogenase 2	3500	3640	2920
Aldehyde dehydrogenase 3A2	970	1020	1250
Aldehyde dehydrogenase 6A1	1630	1590	1360
Aldehyde dehydrogenase 7A1	2770	2770	2820
Aldehyde dehydrogenase 9A1	5260	4820	5530
Aldehyde dehydrogenase 18A1	4230	4020	3980
CYP26A1	9	15	10
CYP26B1	64	48	76

2 PP によるラット肝発がん過程における星細胞の役割——肝発がん感受性と星細胞の反応性との関連

(1) CF 投与による星細胞の減少機序の解析

①目的

昨年度、CF 投与 8 週間で KS 型ラット肝では星細胞が著しく減少することを明らかにしたので、この減少がアポトーシスによるか検討した。

②方法

アポトーシス細胞の検出は、CF 投与 8 週間の KS 型と NC 型ラット肝の切片を材料に TUNEL 法による in situ apoptosis 検出キット (TAKARA) を用いて行った。肝細胞 1000 個中のアポトーシス陽性細胞数を測定した。

③成果

CF 投与とコントロールの KS 型ラット肝の TUNEL 陽性細胞はともに 0.1% で、CF 投与による増加は認められなかった。NC 型ラット肝の陽性細胞も CF 投与とコントロールとも 0.1% で KS 型と差はなかった。HE 染色による組織切片では明らかな炎症細胞の浸潤などを認めなかった。アポトーシスを検出できなかったことから、星細胞の別なマーカー、CRBP1 に対する抗体による免疫組織化学を行い、星細胞数を測定した。その結果、平成 20 年度の抗 α -SMA 抗体で測定した結果と同様に、KS 型で CF により星細胞が減少することが確認された。従って、この減少は、アポトーシス以外の機序によることが示唆された。

(2) 星細胞に発現する遺伝子と clofibric acid による発現変化

①目的

肝細胞のがん化に、星細胞を含む非実質細胞と肝細胞の相互作用が関与することが示唆されている。星細胞に発現する遺伝子と PP による星細胞での発現変化を明らかにする。

②方法

初代培養ヒト星細胞の培養と clofibric acid 処理は前述の方法で行った。遺伝子発現は human genome U133 Plus 2.0, Affymetrix を用いて、そのプロトコールに従い行った。

③成果

コントロールの星細胞では、CRBP1、vimentin、hepatocyte growth factor などの発現レベルが高く、星細胞の性質と一致した (表 8)。Clofibric acid 処理に伴い、CRBP1 の発現が低下し、 α -SMA が増加した。その他の星細胞に特徴的な遺伝子の発現には明らかな変化がなかった。薬剤処理による細胞数の減少はないことから、CRBP1 の減少と α -SMA や PPAR γ の増加は、星細胞が何らかの細胞系列に分化することを示唆する知見と考えられた。

これらの結果から、CF 投与 KS 型ラット肝の CRBP1 陽性細胞の減少は、星細胞のアポトーシスよりは、異なる細胞系列への分化による可能性も考えられた。また、CF 投与の同ラットで低下した SIGLEC5 と CYP7A1 は、コントロールのヒト星細胞で発現がなかったことから、星細胞以外の細胞の変化を反映していることが示唆された。

ヒト星細胞で発現する遺伝子として、hepatocyte growth factor、tumor growth factor- β 1、interleukin 6 などが明らかになった。

表 8 ヒト星細胞での clofibric acid (CFA) による遺伝子発現の変化

遺伝子	CFA 0	CFA 0.5	CFA 2.0
PPARalpha	480	430	320
PPARgamma	320	450	710
RXRA	1080	1420	1570
Glial fibrillary acidic protein	17	4	2
Cellular retinol binding protein 1	8050	7980	4550
alpha-Smooth muscle actin,			
ACTG2	180	250	430
Desmin	480	650	440
Vimentin	36000	30700	33500
Tumor growth factor-beta 1	2880	2620	2290
Hepatocyte growth factor	2110	2070	1660
Interleukin 6	1490	1180	1520
SIGLEC5	3	3	4
BCL6	3900	3820	3380
CYP7A1	1	1	0
CYP1B1	9130	10200	13900
CYP51A1	4470	5350	6190

4) 3年間(2年間)の研究成果のまとめ

研究全体の目的：ペルオキシソーム増殖剤（PP）には、高脂血症の治療薬や食品包装用プラスチックの可塑剤など食品に混入する危険のある広汎な物質が含まれる（1, 2）。PPは長期投与によりラットやマウスに肝がんを誘発するのに対し（3-5）、ヒトでは発がん性は低いと考えられ、動物の種により発がん感受性が異なる（6-8）。このため、実験動物の結果をヒトへ外挿できないという問題がある。

我々は、SDラットの薬物代謝酵素グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）-M1 遺伝子に KS 型と NC 型の 2 種類の遺伝子型が存在することを明らかにし（9）、さらに、KS 型ラットは PP に高感受性で、4-8 週間の投与で肝前がん病変ができるのに対し、NC 型ラットは 60 週間の投与でも肝前がん病変ができず抵抗性であることを見出した（10）。

本研究は、1) NC 型ラットの低感受性を規定する要因を解明する、2) ヒト肝と肝細胞の PP に対する低反応性の機序を解明する、3) PP に対するヒトの低感受性が NC 型ラットと同様の機序によることを明らかにする。これらのことから、NC 型ラットの結果をヒトに外挿できることを示し、遺伝子多型ラットを用いて、PP のヒトでの発がんリスクを評価する方法を開発する。

このために以下の項目について研究した。

- 1 クロフィブレート（CF）投与 4 週間の時点での KS 型と NC 型ラット肝でのペルオキシソームの 2 頭酵素（BE）誘導の差異
- 2 CF 投与 8 週間からそれ以降の時点での KS 型と NC 型ラット肝での前がん病変出現の差異
- 3 ヒト肝における GST-M1 遺伝子多型とペルオキシソーム関連遺伝子発現との関連
- 4 コントロール KS 型と NC 型ラット肝でのペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR） α リガンド産生酵素遺伝子と標的遺伝子発現の差異
- 5 ヒト肝における PPAR α リガンド産生酵素遺伝子と脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の発現
- 6 Clofibric acid による培養ヒト肝細胞での脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の誘導
- 7 CF による培養ヒト星細胞での遺伝子発現の変化

各項目の全体の研究計画に占める位置づけを図 1 にまとめた。以下にこれらの項目ごとに研究成果を説明する。

	Control	Clofibrate 投与	
	PPAR リガンド産生系/ 標的遺伝子の発現	4 weeks BE 誘導	8 - 60 weeks 前がん病変 (BE 陰性系)
KS 型ラット肝	高い	高い 何による (1)	出現 何による (2)
NC 型ラット肝	低い 何による (4)	低い	なし
ヒト肝	GST-M1 遺伝子型 との関連 (3) PPAR リガンド産生 (5)		
ヒト肝細胞	Clofibric acid による 標的遺伝子の発現 (6)		
ヒト星細胞	Clofibric acid による 遺伝子発現の変化 (7)		

図 1 各項目の全体の研究計画に占める位置づけ。括弧内の数字は項目の番号

1 CF 投与4週間の時点での KS 型と NC 型ラット肝での BE 誘導の差異

[目的]

KS 型のラットでは6-8週間の PP 投与による肝前がん病変の出現に先行して、BE が強く誘導されるのに対し、NC 型ラットでは誘導が弱いことを見出した (10)。PP による BE の誘導は PPAR α を介して転写レベルで起こることが知られている。CF 投与4週間の時点で、KS 型ラット肝で BE が顕著に誘導されるのは、どのような因子によるか検討した (11)。

[方法]

クロフィブレードの投与は、生後7週齢の KS 型と NC 型の SD ラットに PP として 0.3%クロフィブレード (CF) を含む飼料を4週間与えた。コントロールは基礎食を4週間投与した。ウエスタンブロットは、ラット肝の上清、ペルオキシソームあるいは核画分を Laemmli の方法により SDS-電気泳動を行い、その後、タンパク質をニトロセルロース膜にトランスファーし、抗体により検出した。Northern ブロットは、ラット肝から RNA を調製し、常法に従い、BE cDNA を用いて行った。PPAR α に結合するタンパク質の精製は、まず、ラット PPAR α を大腸菌で発現させ、精製しアガロースに固定したカラムを作製し、このカラムにラット肝核抽出液をかけ、結合するタンパク質を 1M NaCl により溶出して行った。溶出したタンパク質の同定は、ウエスタンブロットにより行った。ゲルシフトアッセイは、BE 遺伝子エンハンサーをプローブとして、ラット肝核抽出液を用いて、常法に従い行った。免疫組織化学は、ラット肝を固定後、薄切切片を作成し、抗 BE 抗体を用いて、常法に従い行った。

[結果と考察]

1-1. KS 型ラット肝での BE の強い誘導

CF を4週間投与した KS 型と NC 型ラット肝のタンパク質を SDS 電気泳動後、抗 BE 抗体によりウエスタンブロットを行なった。KS 型では CF 投与に伴い BE タンパク質が 67 倍に、NC 型では 30 倍に増加し、KS 型で増加が顕著であった。BE mRNA レベルの増加も KS 型で顕著であった。

1-2. KS 型ラット肝での SRC-3 と BE の PPAR α への結合

BE 遺伝子の発現に働く PPAR α のタンパクレベルは、CF 投与に伴い増加したが、KS 型と NC 型ラット肝で差を認めなかった。PPAR α を固定したカラムを作製し、CF を投与したラット肝核抽出液をかけたところ、KS 型では 110、72、42-kDa のタンパク質が結合した。これらはそれぞれ、PPAR α のコアクチベータである steroid receptor coactivator (SRC)-3、BE、チオラーゼと同定された (図2)。NC 型では結合するタンパク質はほとんどなかった。SRC-3 タンパクレベルは KS 型ラット肝の核で、NC 型の3倍に増加していた。

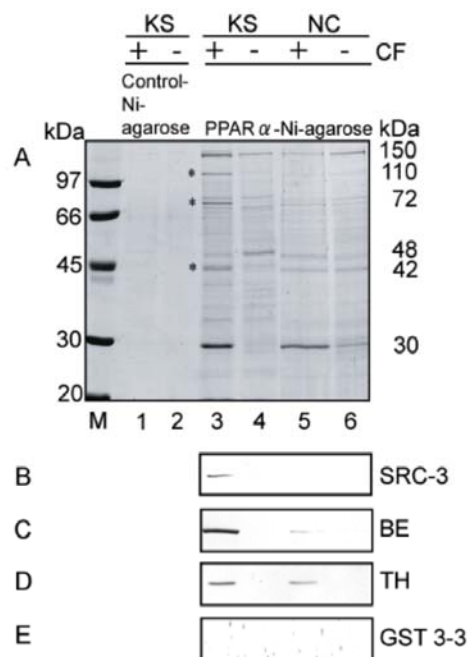


図2 CF投与KS型ラット肝でのSRC-3、BE、thiolaseのPPAR α への結合

1-3. SRC-3 と BE の PPAR α -BE エンハンサーへの結合

BE エンハンサーをプローブとしたゲルシフトアッセイで、CF を投与した KS 型の核画分では、抗 SRC-3 抗体や抗 BE 抗体の添加によりバンドが減少した。従って、KS 型では BE や SRC-3 が PPAR α に結合し、BE 遺伝子エンハンサーに結合すると考えられた。NC 型では、これらの結合は観察されなかった。

1-4. KS 型ラット肝でのヒストン H3 のアセチル化

抗アセチル化ヒストン抗体を用いたウエスタンブロットの結果から、CF を投与した KS 型の核画分でヒストン H3 のアセチル化が観察された。NC 型では、観察されなかった (図3)。

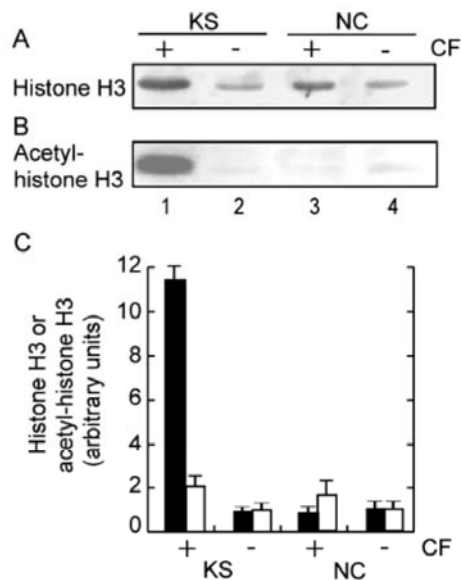


図3 CF投与KS型ラット肝でのヒストンH3のアセチル化

1-5. KS型ラット肝でのBEの核局在

抗BE抗体を用いた免疫組織化学により、CFを投与したKS型ラット肝では、細胞質が顆粒状に染色されたほかに核も濃染された。NC型ラットでは、細胞質が弱く染色されるだけで、核の染色は認めなかった。

BEやチオラーゼはアセチル-CoAの産生に働き、SRC-3はヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性をもつことから(12, 13)、KS型でこれらがPPAR α に結合する結果は、BEの著しい誘導がヒストンアセチル化によることを示唆し、CFにより誘導されるBEやチオラーゼが、自身の転写を促進している可能性が考えられた。従って、CFによるラット肝発がんには、ヒストンのアセチル化を介するエピジェネティックな機構の関与が示唆された。

2 CF投与8週間からそれ以降の時点でのKS型とNC型ラット肝での前がん病変出現の差異

1) PPによるラット肝前がん病変におけるGST-A4とNrf2の発現

[目的]

KS型ラットではCF投与によりBEが強く誘導された後、投与8週間でBE陰性の肝前がん病変が出現する(10, 14, 15)。従って、CFによるラット肝前がん病変ではBEが発現から欠損へと変化する。この変化がどのような因子によるのかは明らかでない。

PPによる発がんでは過酸化水素や酸化ストレスの関与が示唆されていることから、同病変出現と過酸化脂質の代謝産物の解毒に働くGST-A4(16)、酸化ストレスの防御に働く転写因子nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf) 2(17, 18)の発現との関連を検討した(19)。

PPと遺伝毒性発がん物質により誘発されたラット肝前がん病変では、遺伝子発現パターンが異なり、

共通のマーカーは知られていない。CF によるラット肝前がん病変での Nrf2 の発現は、遺伝毒性発がん物質による病変の場合と共通であることから、GST-A4 についても検討し、これらが PP と遺伝毒性発がん物質による病変の共通のマーカーとなるか解析した (19)。

[方法]

CF の投与によるラット肝前がん病変は、生後 7 週齢の KS 型の SD ラットに 0.3%CF を含む飼料を 8-60 週間投与し、誘発した。遺伝毒性物質によるラット肝前がん病変は、Solt-Farber 法に従い、ジエチルニトロサミン (DEN) と 2-アセチルアミノフルオレン (AAF) の投与と部分肝切除により誘発した。免疫組織化学は、前述の方法により行った。

[結果と考察]

2-1. CF 投与ラット肝前がん病変における GST-A4 と Nrf2 の発現

当初、GST-A4 は BE が発現する非病変部で陽性となると予想したが、そこでは発現せず、BE 陰性巣の一部で陽性となった。BE 陰性巣と GST-A4 発現の関係を経時的に解析した結果、BE 陰性巣は CF 投与 8 週間から検出されるのに対し、GST-A4 は CF 投与 15 週間から BE 陰性巣の 33% で発現し、投与 60 週間では BE 陰性巣の約 80% で陽性を示した。GST-A4 陽性を示した BE 陰性巣は、GST-A4 陰性のものに比べ、面積の大きいものが多かった。さらに、GST-A4 の発現に一致して Nrf2 の発現を認めた (19) (表 1)。

表 1 クロフィブレート投与による KS 型ラットでの前がん病変の誘発

前がん病巣	個数 (/ cm ²)	病巣中各タンパク質欠損あるいは発現のパーセント		
		BE 欠損	GST-A4 発現	Nrf2 発現
BE 陰性巣	60.4 ± 1.6	/	86.4 ± 8.2	83.3 ± 7.9
GST-A4 陽性巣	78.3 ± 7.8	67.7 ± 5.2	/	93.5 ± 1.0

2-2. 遺伝毒性物質によるラット肝前がん病変における GST-A4 の発現

遺伝毒性発がん物質の投与により、ラット肝には GST-P 陽性および陰性の前がん病変が誘発される。解析の結果、GST-P 陽性巣の 40%、GST-P 陰性巣では 70% が、GST-A4 陽性であった。これら病変での Nrf2 の陽性率は、GST-A4 の陽性率と一致した (表 2)。

表 2 遺伝毒性発がん物質による KS 型ラットでの GST-P 陽性巣と陰性巣での

GST-A4 と Nrf2 の発現

前がん病巣	個数 (/ cm ²)	病巣中各タンパク質発現のパーセント	
		GST-A4	Nrf2
GST-P 陽性巣	159 ± 15	40.4 ± 2.8	40.3 ± 0.3
GST-P 陰性巣	139 ± 15	69.7 ± 2.1	70.5 ± 5.6

これらの結果から、GST-A4 は、CF と遺伝毒性物質の両方による前がん病変を検出できる陽性マーカーとなることが示唆された。最近、GST-A4 を細胞に発現させると、細胞ががん化することが報告されている (20)。また、Nrf2 は、これまで、がん化を抑える機能が注目されてきたが (21, 22)、前がん病変に発現することから、発がんを促進する可能性についても検討する必要があることを明らかにした。遺伝毒性物質によるラット肝前がん病変は、これまで GST-P 陽性の病巣 (22-24) が注目されていたが、GST-P 陰性の病巣も存在すること (25)、後者の病変は、CF による GST-A4 陽性の前がん病変と性質が類似することを明らかにした (19)。

2) GST遺伝子多型ラット非実質細胞のPPに対する反応性の差異

[目的]

遺伝毒性発がん物質によるラット肝発がん過程では肝細胞だけでなく、Kupffer 細胞などの非実質細胞の関与が示唆されている (26-28)。遺伝子多型ラットでの CF による肝前がん病変出現の差異に、非実質細胞が関与する可能性を考え、KS 型と NC 型ラット肝の間で、CF 8 週間投与に伴う Kupffer 細胞、星細胞、血管内皮細胞の数の変化を検討した。

[方法]

Kupffer 細胞はCD68を、星細胞は平滑筋 α -actin (α -SMA)とcellular retinol binding protein (CRBP) 1を、内皮細胞はCD34をマーカーとして免疫組織化学的に検出し、細胞数を測定した。アポトーシス細胞の検出はTUNEL法により行った。マイクロアレイ解析は、Rat Genome 230 2.9, Affymetrixを用い、そのプロトコールに従い行った。

[結果と考察]

2-3. CF による KS 型ラット肝での星細胞の減少

α -SMA と CD34 染色の結果を図 4 と 5、細胞数の結果を表 3 にまとめた。Kupffer 細胞は CF 投与により KS 型と NC 型ともに、約 30%減少した。星細胞は KS 型で著しく減少した。内皮細胞は細胞同士が連結しているため細胞数を計測できなかったが、CF 投与により KS 型と NC 型ともに CD34 の染色性が低下し、KS 型では肝細胞が陽性を示すようになった。

CF 投与による KS 型ラット肝での星細胞の減少がアポトーシスによる可能性を考え、TUNEL 法によるアポトーシスを測定したが、多型ラット間で差異は認められなかった。炎症細胞の浸潤も観察されなかった。

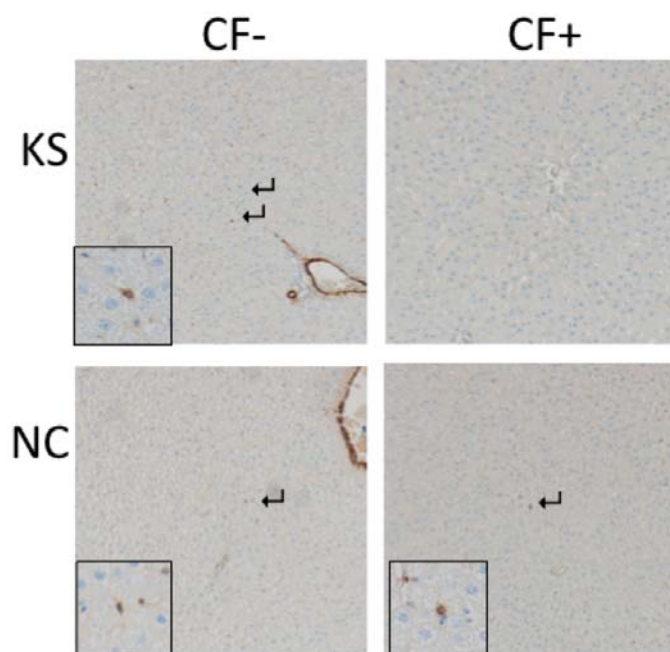


図4 抗 α -SMA 抗体による星細胞の検出。左下隅に挿入した図は 200 倍。矢印は陽性星細胞。

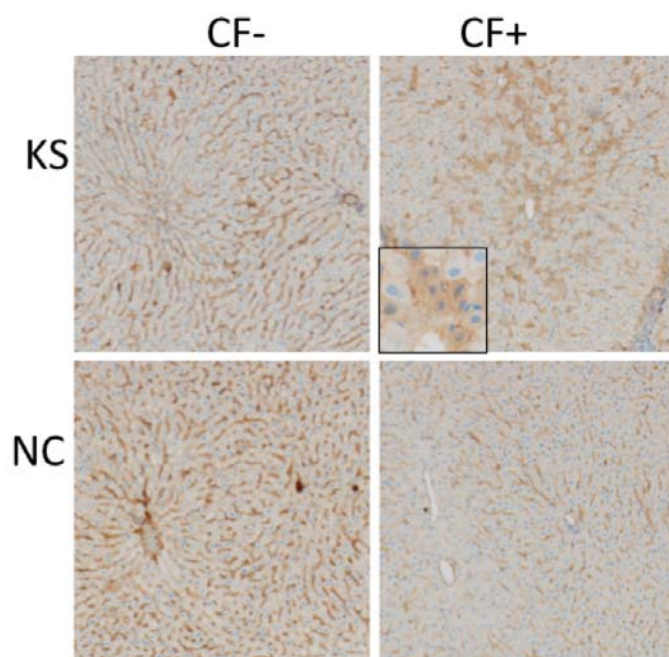


図5 抗 CD34 抗体による内皮細胞の検出。CF 投与 KS 型ラットでは CD34 は肝細胞に染まる。

表3 クロフィブレート投与による GST-M1 遺伝子多型ラットでの非実質細胞の変化

	KS 型ラット		NC 型ラット	
	-----		-----	
Clofibrate (CF)	-	+	-	+

	個数 / mm2			
CD68-陽性細胞（Kupffer 細胞）	433 ± 15	313 ± 13	573 ± 16	389 ± 15
α-SMA 陽性細胞（星細胞）	60 ± 14	2 ± 1	44 ± 10	36 ± 7

2-4. CF による非実質細胞関連遺伝子の発現変化

KS型とNC型ラット肝の間で、これら非実質細胞のCFに対する反応性の違いを定量的に評価するため、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現を解析した。非実質細胞に関連した主要な遺伝子の発現結果を表4にまとめた。星細胞のマーカーα-SMAは、KS型ラットでCF投与により増加し、免疫組織化学の結果と異なっていたが、この分子は平滑筋にも発現するため、アレイの結果は、それを反映している可能性が考えられた。内皮細胞のマーカーCD34はCF投与によりKS型とNC型ともに減少した。これらの非実質細胞とは別に、白血球などに発現するsiglec-5がKS型で著しく低下し、Bcl6は、KS型ラットでCF投与により著しく低下した。Cyp7a1は、肝細胞に発現する遺伝子であるが、KS型ラットでCFにより著しく低下した。

表4 クロフィブレート投与による非実質細胞に関連した遺伝子発現の変化

	KS 型ラット		NC 型ラット	
	Clofibrate (CF)	- +	- +	- +
Kupffer 細胞				
CD68		700 610	760 680	
MyD88		1550 1870	1430 1420	
Abcg1		480 2170	420 850	
CD36		220 2160	160 2280	
TNF- α		50 20	9 50	
IL-6		5 3	60 4	
星細胞				
Glial fibrillary acidic protein		170 90	90 70	
Cellular retinol binding protein		10090 9160	3510 3530	
α -Smooth muscle actin (Actg2)		32 51	46 23	
Desmin		100 120	130 80	
TGF- β 1		130 200	130 60	
血管内皮細胞				
CD34		70 30	70 20	
VLDL receptor		50 230	40 390	
HGF		70 100	60 30	
その他、KS 型と NC 型で発現に顕著な差のある遺伝子				
Siglec5 (CD170)		1 14	280 200	
Bcl6		3470 100	4430 2740	
Cyp7a1		8540 470	2110 5710	

一般にアポトーシスを起こした細胞は、マクロファージやその他の細胞に取り込まれ、処理されるため、アポトーシス細胞を証明することは困難な場合がある。ラットに硝酸鉛を投与すると一過性に肝細胞の増殖が起こり、その後アポトーシスが起こる (29)。アポトーシスを起こした肝細胞はマクロファージに取り込まれ、肝細胞を取り込んだマクロファージはフェリチン陽性細胞として検出できることを明らかにした (30)。KS 型ラット肝でアポトーシスを起こした星細胞が、マクロファージや肝細胞などに取り込まれた場合、星細胞に含まれる分子をマーカーに、取り込んだ細胞を検出可能か、検討中である。

3 ヒト肝における GST-M1 遺伝子多型とペルオキシソーム関連遺伝子発現との関連

[目的]

GST-M1遺伝子がKS型のラットではCFによる肝前がん病変ができ、NC型ではできにくいこと、KS型ラットではCFによりペルオキシソームの酵素が強く誘導されるのに対し、NC型では誘導が低いという結果から、ヒト肝でGST遺伝子多型とペルオキシソーム酵素遺伝子発現の関係を検討した。この解析を行うため、肝疾患で肝部分切除術を受けた患者の肝組織20例についてGST-M1遺伝子型（欠損（Null）型、M1A型（K型）、M1B（N型）の3種類）を調べ、男性と女性のそれぞれの遺伝子型の肝を選び、8例についてアレイ解析を行った。ヒト肝組織を用いた本研究は、弘前大学大学院医学研究科倫理委員

会の承認を得るとともに、患者にその趣旨を説明し、同意書を得て行った。

[方法]

ヒトGST-M1遺伝子型の判定はFryerらの方法 (31) に従い行った。ヒト遺伝子発現アレイは、Human Genome U133 Plus 2.0, Affymetrix を用いて、そのプロトコールに従い行った。

[結果と考察]

3-1. ヒト GST-M1 遺伝子多型肝でのペルオキシソームとミトコンドリア脂肪酸β-酸化酵素遺伝子の発現

ペルオキシソームとミトコンドリアに局在する脂肪酸のβ-酸化に働く 17 種類の酵素遺伝子 (32) を選び、GST-M1 遺伝子型により発現が異なるか検討した。発現に個体差はみられたものの、それぞれの遺伝子の発現と GST-M1 遺伝子型との間に関連は認められなかった。また、これらの遺伝子と PPARα の発現にも明らかな関連はなかった (表 5)。

表 5 ヒト肝でのペルオキシソームとミトコンドリアの脂肪酸β-酸化酵素遺伝子の発現

各試料の先頭の数字 (例えば 3-Null-Mの3) は試料の識別番号、NullはM1遺伝子欠損型、M1AとM1BはM1遺伝子型。末尾のMは男性からの試料、Fは女性からの試料。数値は発現アレイの測定結果で無単位。数値が大きい程、遺伝子の発現量が多い。

遺伝子	GST-M1遺伝子型と性							
	3-Null-M	6-Null-M	19-M1A-M	8-M1B-M	7-M1AB-M	11-Null-F	18-M1A-F	9-M1B-F
PPARalpha	4790	2460	2420	4290	3760	2040	4070	5580
RXRA	4480	2910	2070	5350	4920	3400	4980	6290
Peroxisomal beta-oxidation								
Acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl	7260	12900	9250	13400	15500	7650	8940	7630
Acyl-CoA oxidase 2, branched chain	2790	3280	3710	8790	8330	4550	5830	8880
Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, EHHADH (LBP)	15800	7790	15700	22700	10400	14700	15800	7220
Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4, HSD17B4 (DBP)								
Acetyl-CoA acyltransferase 1	18700	23400	14900	24600	18600	16400	15800	15900
Sterol carrier protein 2	19500	21600	15600	27800	31100	18800	21200	19500
	43200	36200	19100	39100	33200	30600	33700	28900
Mitochondrial beta-oxidation								
Acyl-CoA dehydrogenase								
very long chain, ACADVL	13100	10000	9470	9830	14400	8530	7750	8060
ACADL	1380	740	1220	2270	1170	1580	1400	1340
ACADM	15500	15200	16500	26800	13200	19400	16200	10300
ACADS	1260	1920	1760	2660	2800	1810	1690	2250
ACADSB (short/branched chain)	7460	9210	15000	20800	13000	9680	18100	21200
ACAD11	4550	2410	2860	6340	6660	5100	5410	6870
Enoyl-CoA hydratase short chain 1, ECHS1								
	12200	16800	18500	22400	26500	24900	15900	23700
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, HADH								
	8750	12100	6790	12100	8880	10500	9440	11300
Acetyl-CoA acyltransferase 2	3300	12900	11500	14500	22800	11200	8070	13800
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, alpha subunit, HADHA								
	4440	5910	4160	4420	4960	3430	4460	3880
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, beta subunit, HADHB								
	10500	17900	27100	21300	21600	18300	13200	11300

4 コントロール KS 型と NC 型ラット肝での PPAR α リガンド産生酵素遺伝子と標的遺伝子発現の差異

[目的]

ヒト肝のアレイ解析で、GST-M1 遺伝子型とペルオキシソームやミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子発現の間に関連が認められなかったことから、NC 型ラットの CF に対する低感受性の機序を、GST-M1 遺伝子以外の要因も考慮に入れ、再検討する必要があると考えられた。PP 投与前と投与後のヒト肝を得ることはきわめて困難であることから、非投与の肝を用いて、低反応性を規定する分子を明らかにする必要がある。このため、CF を含まない基礎食を投与したオスとメス NC 型と KS 型のラット肝の遺伝子発現を、アレイにより網羅的に解析した。その結果、NC 型ラット肝でいくつかの PPAR α 標的遺伝子の発現が低下していることを明らかにした。そこで、その機序を解明するため、NC 型と KS 型ラット核 DNA を用いて、comparative genomic hybridization (CGH) 解析を行い、遺伝子の欠失あるいは増幅の有無を検索した。

[方法]

発現アレイの解析は、前述の方法で行った。Comparative genomic hybridization (CGH) 解析は、Agilent CGH アレイを用いて、そのプロトコールに従い行った。

[結果と考察]

4-1. NC 型ラット肝での PPAR α リガンド産生酵素遺伝子と標的遺伝子の発現低下

発現アレイ解析の結果、NC 型ラットでは、脂肪酸の ω -水酸化経路の遺伝子（チトクローム P-450 4a2/4a3、Cyp4a2/4a3）、脂肪酸の β -酸化経路の遺伝子（Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b、acetyl-CoA acyltransferase 2）など、PPAR α 標的遺伝子の発現が低下していることを見出した（表 6）。Epoxide hydrolase 2 の発現は増加した。一方、PPAR α により発現が制御されるペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化経路と α -酸化経路の遺伝子（33）、ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化経路のその他の遺伝子の発現には差がなかった（表 7）。このように NC 型ラット肝では CF の投与がなくても PPAR α 標的遺伝子の一部の発現が低下していることが明らかとなった。

NC 型ラット肝で発現が低下している遺伝子（Cyp4a2/4a3、Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b、acetyl-CoA acyltransferase 2 など）は、アラキドン酸を含む不飽和脂肪酸の ω -水酸化とその後の β -酸化に係わる酵素であり（34, 35）（図 6）、enoyl-CoA hydratase 1 (Ech1) 遺伝子は、ミトコンドリアとペルオキシソームに局在する delta 3,5-delta 2,4-dienoyl-CoA isomerase をコードし（36）、ミトコンドリアの enoyl-CoA hydratase short chain 1 (Echs1) とは異なる遺伝子である。低下している β -酸化のその他の酵素は、いずれもミトコンドリアに局在する酵素である。

表6 KS 型と NC 型ラット肝で発現が変化している遺伝子

各試料の末尾の M はオス、F はメスを示す。数値は発現アレイの測定結果で無単位。

遺伝子	GST-M1遺伝子型と性			
	KS型-M	NC型-M	KS型-F	NC型-F
1 脂肪酸 omega-水酸化経路				
Cyp4a2/4a3	29500	10800	18700	12100
Alcohol dehydrogenase 1	10100	1060	9440	5080
Aldehyde dehydrogenase 1a7	1340	140	3060	9030
Epoxide hydrolase 2	110	2560	400	2410
2 脂肪酸 beta-酸化経路				
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase				
b (Trifunctional protein), Hadhb	11500	6830	12300	7470
Acetyl-CoA acyltransferase 2	21600	12100	18100	9960
Dodecenoyl-CoA delta isomerase	6710	3460	7090	5030
2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	12800	7500	11600	6720
Enoyl-CoA hydratase 1, Ech1	5170	2500	8290	2890
Carnitine O-octanoyl-transferase	7830	1990	3780	1890
3 その他				
CD36	1770	780	23500	9560
Lipoprotein lipase	410	230	160	150
Angiopoietin-like 4	7220	1010	8760	3470

表7 KS 型と NC 型ラット肝で発現に差のない遺伝子

1 ミトコンドリアの脂肪酸 β-酸化経路

acyl-CoA dehydrogenase very long chain (Acadvl), acyl-CoA dehydrogenase long chain (Acadl), acyl-CoA dehydrogenase medium chain (Acadm), acyl-CoA dehydrogenase short chain (Acads), acyl-CoA dehydrogenase short branched chain (Acadsb), Acad11, enoyl-CoA hydratase short chain 1 (Echs1), L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase short chain (Hadh), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein) alpha subunit (Hadha)

2 ペルオキシソームの脂肪酸 β-酸化経路

acyl-CoA oxidase 1 (Acox1), acyl-CoA oxidase 2 (Acox2), enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (L-bifunctional protein, Ehhadh, BE をコード), hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4 (D-bifunctional protein, Hsd17b4), acetyl-CoA acyltransferase 1 (Acaa1, thiolase をコード), sterol carrier protein 2 (Scp2), 2,4-dienoyl-CoA reductase 2 (Decr2), peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase (Peci)

3 ペルオキシソームの脂肪酸 α-酸化経路

phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (Phyh), Phyh2, alpha-methylacyl-CoA racemase (Amacr)

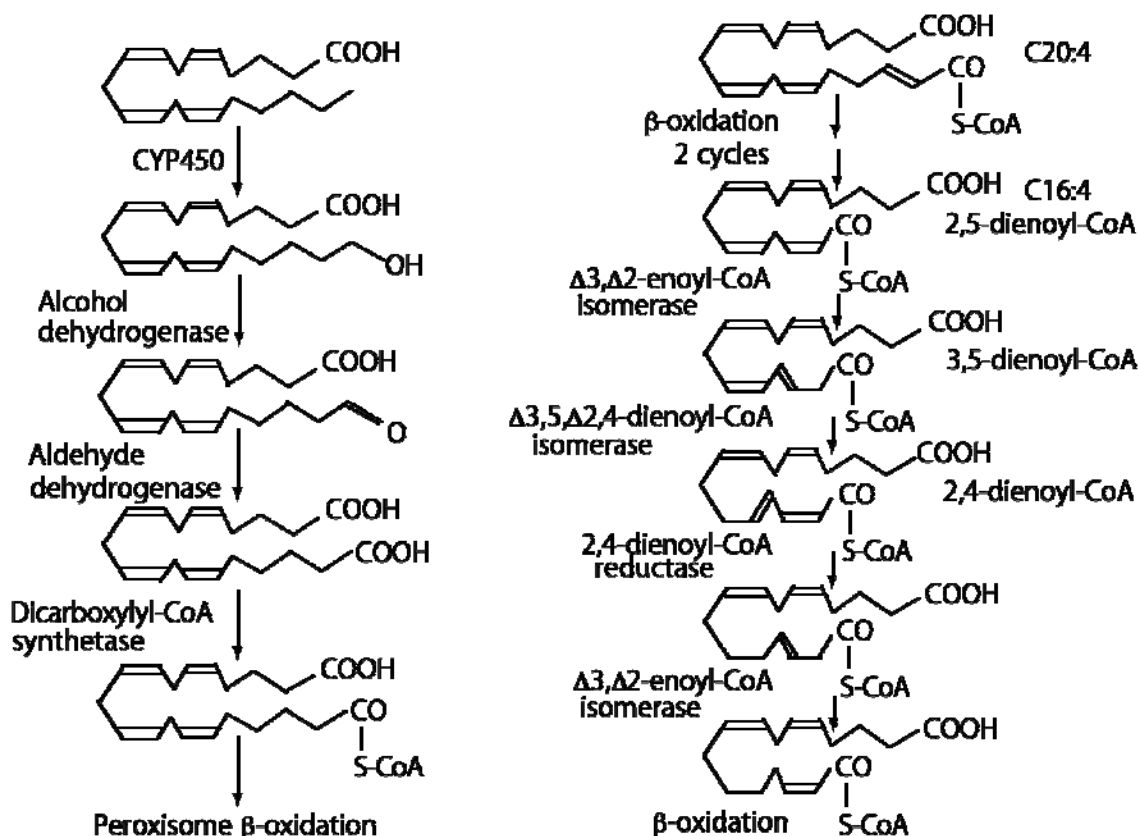


図6 アラキドン酸の ω -水酸化と β -酸化

4-2. NC型ラットでの phospholipase A2 group IVc 遺伝子の欠失

CGH解析の結果、NC型ラットに、染色体1q21領域に phospholipase A2 group IVc (Pla2g4c) 遺伝子座を含む約40 kbの欠失が認められた。

Pla2g4cはグリセロリン脂質からアラキドン酸を放出し(37)、アラキドン酸やそのエポキシ体(epoxyeicosatrienoic acid, EET)の ω -水酸化物(20-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE)とhydroxyepoxyeicosatrienoic acid (HEET))は、PPAR α の内因性リガンドとなることが報告されている(38, 39)(図7)。アラキドン酸からEETの産生はチトクロームP-450 2c(Cyp2c)により、 ω -水酸化物の産生はCyp4aによる。Epoxide hydrolase 2(EH2)はEETをdihydroxyeicosatrienoic acid(DHET)に変換し、不活化する(40)。NC型ラットでは、Pla2g4c遺伝子の欠失とCyp4a2/4a3の発現低下、epoxide hydrolase 2の発現増加により(表6)、PPAR α リガンドの産生が低下し、PPAR α 標的遺伝子の発現が低下していることが示唆される。Pla2には多くのアイソザイムが存在する(41)。ラット肝ではPla2g4cのほか、Pla2g4aやPla2g6、Pla2g12aなどが発現する。NC型ラット肝でPla2g4c遺伝子が欠失しても、ほかのアイソザイムによりアラキドン酸のレベルは補償される可能性があり、PPAR α のリガンド低下には、Cyp4a低下とepoxide hydrolase 2増加が主に関与することも考えられる。最近、PPAR α の新たなリガンドとして1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholineが報告された(42)。このリガンドの合成には、acetyl-CoA carboxylase、ELOVL family member 6、stearoyl-CoA desaturase、choline kinaseなどが係わることが示唆される。これらの発現はKS型とNC型で差を認めなかった。

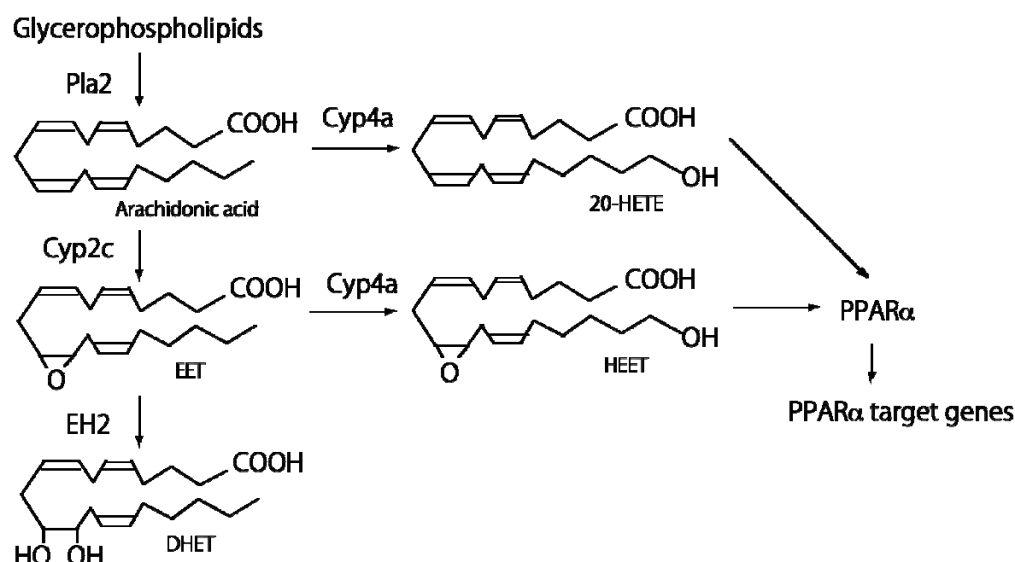


図7 PPAR α のリガンド HEET と 20-HETE の合成経路

5 ヒト肝における PPAR α リガンド産生酵素遺伝子と脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の発現

[目的]

NC型ラット肝で低下しているPPAR α リガンド産生酵素系と脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子のヒト肝での発現レベルを調べ、KS型とNC型ラットの発現レベルと比較した。

[方法]

発現アレイ解析は、前述の方法で行った。

[結果と考察]

5-1. ヒト肝における PPAR α リガンド産生酵素遺伝子の発現

アレイ解析によるヒト肝でのこれら遺伝子の発現レベルを表8にまとめた。ラット Cyp2c に対応するヒト CYP2C はラット肝より発現が高く、CYP4A11 と epoxide hydrolase 2 は、NC 型ラット肝に近い発現レベルであった（表6との比較から）。脂肪酸 β -酸化経路の acetyl-CoA acyltransferase 2 や dodecenoyl-CoA delta isomerase、carnitine O-octanoyltransferase の発現レベルも NC 型ラットの対応する遺伝子と同程度であった。

これらの結果から、ヒト肝と NC 型ラット肝は、PPAR α リガンド産生系と脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の発現レベルで類似することが示唆された。

表 8 ヒト肝臓での HEET 産生系と脂肪酸 β -酸化経路の遺伝子発現

遺伝子	GST-M1遺伝子型と性							
	3-Null-M	6-Null-M	19-M1A-M	8-M1B-M	7-M1AB-M	11-Null-F	18-M1A-F	9-M1B-F
PPARalpha	4790	2460	2420	4290	3760	2040	4070	5580
RXRA	4480	2910	2070	5350	4920	3400	4980	6290
Phospholipase A2 group IVC,								
PLA2G4C	930	1240	880	1290	760	970	600	750
CYP2C8	70700	52700	36000	53000	65100	44300	46700	52400
CYP2C9	35500	33100	41400	48900	42900	32800	33300	45900
CYP4A11	22800	15800	10800	15700	15700	8420	12600	13900
Epoxide hydrolase 2	1000	1520	1800	2610	2590	3530	1610	2620
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase								
b (Trifunctional protein), HADHB	10500	17900	27100	21300	21600	18300	13200	11300
Acetyl-CoA acyltransferase 2	3300	12900	11500	14500	22800	11200	8070	13800
Dodecenoyl-CoA delta isomerase	1280	1690	1980	2230	1910	2400	1840	1900
2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	6180	10300	12100	9700	11100	12000	8830	11700
Enoyl-CoA hydratase 1	1510	2790	3640	5470	3690	4440	3630	3360
Carnitine O-octanoyltransferase	3020	2400	1940	3310	5360	1620	2820	3290
Phytanoyl-CoA hydroxylase	32100	28100	24400	43200	39000	28300	43500	40200
APOA1	95700	86700	52200	64500	88500	44100	67200	77100
ABCG1	450	1390	1150	340	270	1040	910	430

6 Clofibrilic acid による培養ヒト肝細胞での脂肪酸β-酸化酵素遺伝子の誘導

[目的]

ヒト肝での前述したPPARα標的遺伝子の発現レベルは、NC型ラット肝に近いことから、これらのヒト遺伝子が、PPに低反応性であるか検討するため、ヒト肝細胞株HepG2細胞（43）を用いて、clofibrilic acidで処理し、遺伝子発現の変化を解析した。

[方法]

HepG2細胞の培養は、10% 牛胎児血清を加えたMEM培地で行い、clofibrilic acid 処理は、0.5 mMと2.0 mMの最終濃度で培地に加え、3日間培養した。培養後、細胞を回収し、RNAを調製し、アレイ解析を行った。コントロールは、培地にエタノールのみを加えた。

[結果と考察]

6-1. ヒト HepG2 細胞での clofibrilic acid によるβ-酸化酵素遺伝子の低い誘導

コントロールの HepG2 細胞では、脂肪酸ω-水酸化経路の遺伝子（CYP4A11）の発現は低かったが、脂肪酸β-酸化経路の遺伝子の多くが（Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b, acetyl-CoA acyltransferase 2 など）、高濃度の clofibrilic acid 投与により 44-74%増加した（表 9）。ペルオキシソームの enoyl-CoA hydratase/ 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EHHADH、BE をコードする遺伝子) の増加も 63%であり、KS 型ラット肝のような著しい増加は認められず、ヒトのこれら遺伝子の誘導は低いことが確認された（44）。ヒト遺伝子の CF に対する低反応性は、NC 型ラット肝と類似の機序による可能性が考えられる。HepG2 細胞ではヒト肝に比べ、CYP4A11 や CYP2C、PLA2G4C の発現は著しく低下し、これらの低下が PPARαのリガンドの低下をもたらすのに対し、ヒト肝では epoxide hydrolase 2 がリガンド低下に係わることが示唆される。

NC 型ラット肝とヒト肝、ヒト HepG2 細胞の PP に対する反応性とそれに係わるパラメーターの発現変化を表 10 にまとめた。HEET は PPARαの内因性のリガンドであり、PLA2G4C と CYP2C、CYP4A は HEET の産生に、EH2 は産生抑制に働く（図 7）。NC 型ラットとヒト肝では、PLA2G4C の発現は異なるものの、それ以外の発現は類似し、両者で内因性のリガンドによる PPARαの活性は低下していた。内因性のリガンドが、外因性の PP に対する反応性を規定することが報告されている（39）。NC 型ラットで HEET の産生系が低下、分解系が亢進している本研究の結果はこの考えを支持する。ヒト肝の HEET 代謝系は NC 型ラット肝と類似する。これらの結果から、NC 型ラット肝は、ヒト肝での PP のリスクを評価するモデルになると考えられる。ただし、GST-M1 の多型が、NC 型ラット肝の PP に対する低反応性に直接関与する可能性は低く、同ラットで PPARαの内因性のリガンドが低下していることによると考えられる。

表 9 ヒト HepG2 細胞での clofibric acid (CFA) による遺伝子発現の変化

遺伝子	CFA 0	CFA 0.5	CFA 2.0
PPARalpha	470	480	890
RXRA	1080	690	2050
PLA2G4C	38	60	4
CYP2C8	47	2	5
CYP2C9	57	35	54
CYP4A11	60	21	13
Epoxide hydrolase 2	230	210	240
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b (Trifunctional protein), HADHB	9890	11100	13300
Acetyl-CoA acyltransferase 2	2210	2010	3190
Dodecenoyl-CoA delta isomerase	2890	3340	3040
2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	1680	1700	2610
Enoyl-CoA hydratase 1	2020	2710	3510
Carnitine O-octanoyltransferase	280	290	460
Phytanoyl-CoA hydroxylase	1870	2310	4960
APOA1	22400	21700	24100
ABCG1	59	3	24

表 10 NC 型ラット肝とヒト肝の PPAR α リガンド産生系と標的遺伝子発現の類似性

遺伝子	KS型ラット肝	NC型ラット肝	ヒトHepG2細胞	ヒト肝
PLA2G4C	+	-	-	+
CYP2C	++	++	-	++
CYP4A	++	+	-	+
Epoxide hydrolase 2	-	++	-	++
PPAR alphaの活性化				
内因性リガンド (HEET)				
HADHB, DCI, ECH1の発現	++	+	±	±
外因性アゴニスト (PPs)				
ACOX1, EHHADHの発現	++	+	±	/

7 CF による培養ヒト星細胞での遺伝子発現の変化

[目的]

肝細胞のがん化に、星細胞を含む非実質細胞と肝細胞の相互作用が関与することが示唆されている(26-28)。CF 投与による KS 型ラット肝での前がん病変誘発に果たす非実質細胞の役割を明らかにする

ため、肝組織を用いて発現アレイ解析を行い、KS 型と NC 型で発現の異なる数種類の遺伝子を見出した。しかし、これらの発現の差異が、非実質細胞の反応性の差異を反映したものかは明らかでなかった。そこで、初代培養ヒト星細胞を用いて同細胞に発現する遺伝子と PP による発現変化を解析した。

[方法]

ヒト星細胞 (ScienCell Research Laboratories, San Diego, CA, USA) をプロトコールに従い、Stellate Cell 培地で培養、0.5 mM と 2 mM clofibric acid で 2 日間処理した。遺伝子発現は human genome U133 Plus 2.0, Affymetrix を用いて、そのプロトコールに従い行った。

[結果と考察]

ヒト星細胞では、PPAR α の発現は認めたが、PPAR α リガンド産生系と epoxide hydrolase 2 の発現は認めず、clofibric acid 処理による脂肪酸 β -酸化酵素遺伝子の誘導は、enoyl-CoA hydratase 1 を除いて観察されなかった (表 1 1)。星細胞はレチノールを多量に含み、活性化刺激によりレチノールからレチノイン酸が合成されることが知られている (45)。この合成には alcohol dehydrogenase と aldehyde dehydrogenase が係わることから、これら酵素遺伝子の発現が clofibric acid 処理により変化するか検討した。星細胞で発現レベルが高い遺伝子を表 1 1 に示した。どのアイソザイムがレチノイン酸の合成に係わるか、明らかでないが、aldehyde dehydrogenase 1A3 を除いて、明らかな変化はなかった。レチノイン酸の分解に働く CYP26A1 と CYP26B1 の発現は観察されなかった。これらの結果から、ヒト星細胞の clofibric acid に対する反応性は低いと考えられた。

コントロールの星細胞では、CRBP1、vimentin、hepatocyte growth factor などの発現レベルが高く、星細胞の性質と一致した (表 1 2)。Clofibric acid 処理に伴い、CRBP1 の発現が低下し、 α -SMA が増加した。その他の星細胞に特徴的な遺伝子の発現には明らかな変化がなかった。薬剤処理による細胞数の減少はないことから、CRBP1 の減少と α -SMA や PPAR γ の増加は、一部の星細胞が何らかの細胞系列に分化すること (46) を示唆する知見と考えられた。

これらの結果から、CF 投与の KS 型ラット肝の CRBP1 陽性細胞の減少は、星細胞のアポトーシスよりは、異なる細胞系列への分化による可能性も考えられた。また、CF 投与の同ラットで顕著に低下した SIGLEC5 と CYP7A1 は、コントロールのヒト星細胞で発現がなかったことから、KS 型ラット肝での結果は、星細胞以外の細胞の変化を反映していることが示唆された。

ヒト星細胞で発現する遺伝子として、hepatocyte growth factor、tumor growth factor- β 1、interleukin 6 などが明らかになったので、これらが、KS 型ラット肝で、どのように変動するか検討する必要がある。

表 1 1 ヒト星細胞の HEET 産生系、脂肪酸 β -酸化経路、レチノール代謝系遺伝子の clofibric acid (CFA) による発現変化

遺伝子	CFA 0	CFA 0.5	CFA 2.0
PPARalpha	480	430	320
RXRA	1080	1420	1570
PLA2G4C	37	9	21
CYP2C8	23	26	21
CYP2C9	55	13	29
CYP4A11	60	83	100
Epoxide hydrolase 2	12	34	55
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase b (Trifunctional protein), HADHB	7800	8420	7970
Acetyl-CoA acyltransferase 2	1680	1900	2260
Dodecenoyl-CoA delta isomerase	660	800	920
2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	4290	4500	4010
Enoyl-CoA hydratase 1	1130	1440	1750
Carnitine O-octanoyltransferase	560	700	740
Phytanoyl-CoA hydroxylase	3130	3240	3370
APOA1	360	320	480
ABCG1	650	620	450
レチノール代謝系			
Retinol saturase	740	820	750
Cellular retinol binding protein 1	8050	7980	4550
Alcohol dehydrogenase 5	7240	7930	7030
Aldehyde dehydrogenase 1A3	2940	2940	4580
Aldehyde dehydrogenase 1L2	1960	1860	2350
Aldehyde dehydrogenase 2	3500	3640	2920
Aldehyde dehydrogenase 3A2	970	1020	1250
Aldehyde dehydrogenase 6A1	1630	1590	1360
Aldehyde dehydrogenase 7A1	2770	2770	2820
Aldehyde dehydrogenase 9A1	5260	4820	5530
Aldehyde dehydrogenase 18A1	4230	4020	3980
CYP26A1	9	15	10
CYP26B1	64	48	76

表 1 2 ヒト星細胞での clofibrilic acid (CFA) による遺伝子発現の変化

遺伝子	CFA 0	CFA 0.5	CFA 2.0
PPARalpha	480	430	320
PPARgamma	320	450	710
RXRA	1080	1420	1570
Glial fibrillary acidic protein	17	4	2
Cellular retinol binding protein 1	8050	7980	4550
alpha-Smooth muscle actin,			
ACTG2	180	250	430
Desmin	480	650	440
Vimentin	36000	30700	33500
Tumor growth factor-beta 1	2880	2620	2290
Hepatocyte growth factor	2110	2070	1660
Interleukin 6	1490	1180	1520
SIGLEC5	3	3	4
BCL6	3900	3820	3380
CYP7A1	1	1	0
CYP1B1	9130	10200	13900
CYP51A1	4470	5350	6190

今後のリスク評価への貢献

- イ) NC 型ラットの PP に対する低感受性の機序を解明し、同ラットがヒト肝での PP のリスクを評価するモデルになることを明らかにしたので、PP のリスク評価を容易にする。
- ロ) KS 型ラットの結果から PP によるラット肝発がん過程が少なくとも 2 段階で進行することを明らかにし、げっ歯類に対する PP の発がん機構の解明に貢献した。ヒトに対する PP の発がんリスクの低さを裏付ける根拠と考えられる。
- ハ) これまで PP と遺伝毒性物質によるラット肝発がん過程は異なると考えられてきたが、CF 投与 15 週以降の時点では GST-A4 や Nrf2 の発現など共通点があることを明らかにした。両物質の発がん過程を統一的に捉える端緒を開いた。
- ニ) 化学物質のがん原性試験の中で、中期 in vivo ラット発がん試験は、GST-P 陽性の病変を検出し、発がん性を評価する。遺伝毒性発がん物質の投与により GST-P 陽性の病変だけでなく、GST-P 陰性の病変も出現することから、上記発がん試験の問題点を明らかにした。
- ホ) Nrf2 は、いろいろな抗酸化物質あるいはがんの化学予防に働く物質の標的分子として、がん化を抑える機能が注目されている。PP や遺伝毒性物質によるラット肝発がん過程で Nrf2 の発現があることから、がん化を促進する可能性も排除できない。この場合、化学予防物質は、がん化を促進するリスクになりうると考えられる。

引用文献

- 1 Lazarow PB, deDuve C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 2043-2046, 1976.
- 2 Tolbert NE. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu Rev Biochem* 50, 133-157, 1981
- 3 Svoboda DJ, Azarnoff DL. Tumors in male rats fed ethylchlorophenoxyisobutyrate, a hypolipidemic drug. *Cancer Res* 39, 3419-3428, 1979.
- 4 Reddy JK, Azarnoff DL, Hignite CE. Hypolipidemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogenesis. *Nature* 283, 397-398, 1980.
- 5 Corton JC, Lapinskas PJ, Gonzalez FJ. Central role of PPARalpha in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators. *Mutat Res* 448, 139-151, 2000.
- 6 Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Effects of DEHP in the liver: Modes of action and species-specific differences. *Crit Rev Toxicol* 36, 459-479, 2006.
- 7 Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SM, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dagan YP. Mode of action in relevance of rodent liver tumors to human cancer risk. *Toxicol Sci* 89, 51-56, 2006.
- 8 Morimura K, Cheung C, Ward JM, Reddy JK, Gonzalez FJ. Differential susceptibility of mice humanized for peroxisome proliferator-activated receptor alpha to Wy-14,643-induced liver tumorigenesis. *Carcinogenesis* 27, 1074-1080, 2006.
- 9 Kumano T, Kimura J, Hayakari M, Yamazaki T, Sawamura D, Tsuchida S. Polymorphism of the glutathione transferase subunit 3 in Sprague-Dawley rats involves a reactive cysteine residue. *Biochem J* 350, 405-412, 2000.
- 10 Kudo T, Asano J, Shimizu T, Nanashima N, Fan Y, Akita M, Ookawa K, Hayakari M, Yokoyama Y, Suto K, Tsuchida S. Different susceptibility to peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis in rats with polymorphic glutathione transferase genes. *Cancer Sci* 97, 703-709, 2006.
- 11 Asano J, Kudo T, Shimizu T, Fan Y, Nanashima N, Yamana D, Miura T, Yamada T, Tsuchida S. Histone acetylation and steroid receptor coactivator expression during clofibrate-induced rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci* 101, 869-875, 2010.
- 12 Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387, 677-684, 1997.
- 13 Utley RT, Ikeda K, Grant PA, Cote J, Steger DJ, Eberharder A, John S, Workman JL. Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394, 498-502, 1998.
- 14 Yokoyama Y, Tsuchida S, Hatayama I, Satoh K, Narita T, Rao MS, Reddy JK, Yamada J, Suga T, Sato K. Loss of peroxisomal enzyme expression in preneoplastic and neoplastic lesions induced by peroxisome proliferators in rat livers. *Carcinogenesis* 13, 265-269, 1992.
- 15 Yokoyama Y, Tsuchida S, Hatayama I, Sato K. Lack of peroxisomal enzyme inducibility in rat hepatic preneoplastic lesions induced by mutagenic carcinogens: contrasted expression of glutathione S-transferase P-form and enoyl-CoA hydratase. *Carcinogenesis* 14, 393-398, 1993.
- 16 Jensson H, Guthenberg C, Alin P, Mannervik B. Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals. *FEBS Lett* 203, 207-209, 1986.
- 17 Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 313-322, 1997.

- 18 Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76-86, 1999.
- 19 Shimizu T, Fan Y, Yamana D, Miura T, Nanashima N, Yamada T, Tsuchida S. Glutathione S-transferase A4 is a positive marker for rat hepatic foci induced by clofibrate and genotoxic carcinogens. *Cancer Sci* 101, 1093-1098, 2010.
- 20 Sharma R, Brown D, Awasthi S, Yang Y, Sharma A, Patrick B, Saini MK, Singh SP, Zimniak P, Singh SV, Awasthi YC. Transfection with 4-hydroxynonenal-metabolizing glutathione S-transferase isozymes leads to phenotypic transformation and immortalization of adherent cells. *Eur J Biochem* 271, 1690-1701, 2004.
- 21 Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat Res* 555, 133-148, 2004.
- 22 Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3964-3968, 1985.
- 23 Tsuchida S, Sato K. Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem* 27, 337-384, 1992.
- 24 Ito N, Tamano S, Shirai T. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci* 94, 3-8, 2003.
- 25 Fan Y, Shimizu T, Yamada T, Nanashima N, Akita M, Asano J, Tsuchida S. Development of glutathione S-transferase-P-negative foci accompanying nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 expression during early stage of rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci* 99, 497-501, 2008.
- 26 Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 317, 121-124, 2007
- 27 Rose ML, Rivera CA, Bradford BU, Graves LM, Cattley RC, Schoonhoven R, Swenberg JA, Thurman RG. Kupffer cell oxidant production is central to the mechanism of peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* 20, 27-33, 1999.
- 28 Rusyn I, Kadiiska MB, Dikalova A, Kono H, Yin M, Tsuchiya K, Mason RP, Peters JM, Gonzalez FJ, Segal BH, Holland SM, Thurman RG. Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells. *Mol Pharmacol* 59, 744-750, 2001.
- 29 Columbano A, Ledda-Columbano GM, Coni PP, Faa G, Liguori C, Santa Cruz G, Pani P. Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. *Lab Invest* 52, 670-675, 1985.
- 30 Fan Y, Yamada T, Shimizu T, Nanashima N, Akita M, Suto K, Tsuchida S. Ferritin expression in rat hepatocytes and Kupffer cells after lead nitrate treatment. *Toxicol Pathol* 37, 209-217, 2009.
- 31 Fryer AA, Zhao L, Aldersea J, Pearson WR, Strange RC. Use of site-directed mutagenesis of allele-specific PCR primers to identify the GSTM1 A, GSTM1 B, GSTM1 A,B and GSTM1 null polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTM1 locus. *Biochem J* 295, 313-315, 1993.
- 32 Wanders RJA, Waterham HR. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1707-1720, 2006.
- 33 Gloerich J, van den Brink DM, Ruiter JP, van Vlies N, Vaz FM, Wanders RJ, Ferdinandusse S. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPARalpha in its regulation. *J Lipid Res* 48, 77-85, 2007.
- 34 Hardwick JP. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem Pharmacol* 75, 2263-2275, 2008.
- 35 Sanders RJ, Ofman R, Dacremont G, Wanders RJ, Kemp S. Characterization of the human omega-oxidation pathway for omega-hydroxy-very-long-chain fatty acids. *FASEB J* 22,

2064-2071, 2008.

- 36 Filppula SA, Yagi AI, Kilpelainen SH, Novikov D, FitzPatrick DR, Vihinen M, Valle D, Hiltunen JK. Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase from rat liver. Molecular characterization. *J Biol Chem* 273, 349-355, 1998.
- 37 Asai K, Hirabayashi T, Houjou T, Uozumi N, Taguchi R, Shimizu T. Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 278, 8809-8814, 2003.
- 38 Cowart LA, Wei S, Hsu MH, Johnson EF, Krishna MU, Falck JR, Capdevila JH. The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* 277, 35105-35112, 2002.
- 39 Gatica A, Aguilera MC, Contador D, Loyola G, Pinto CO, Amigo L, Tichauer JE, Zanlungo S, Bronfman M. P450 CYP2C epoxygenase and CYP4A ω -hydroxylase mediate ciprofibrate-induced PPAR α -dependent peroxisomal proliferation. *J Lipid Res* 48, 924-934, 2007.
- 40 Ng VY, Huang Y, Reddy M, Falck JR, Lin ET, Kroetz DL. Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Drug Metab Dispos* 35, 1126-1134, 2007.
- 41 Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RRV, Xu HE, Turk J, Semenkovich CF. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR α in liver. *Cell* 138, 476-488, 2009.
- 42 Shimizu T, Ohto T, Kita Y. Cytosolic phospholipase A2: biochemical properties and physiological roles. *IUBMB Life Sci* 58, 328-333, 2006.
- 43 van Delft JHM, van Aken E, van Breda SGJ, Herwijnen MH, Staal YCM, Kleijnans JCS. Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. *Carcinogenesis* 25, 1265-1276, 2004.
- 44 Woodyatt NJ, Lambe KG, Myers KA, Tugwood JD, Roberts RA. The peroxisome proliferator (PP) response element upstream of the human acyl-CoA oxidase gene is inactive among a sample human population: significance for species differences in response to PPs. *Carcinogenesis* 20, 369-372, 1999.
- 45 Radaeva S, Wang L, Radaev S, Jeong WI, Park O, Gao B. Retinoic acid signaling sensitizes hepatic stellate cells to NK cell killing via upregulation of NK cell activating ligand RAE1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G809-G816, 2007.
- 46 Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88, 125-172, 2008.

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト (論文は、添付すること。)

1. Shimizu T, Fan Y, Yamana D, Miura T, Nanashima N, Yamada T, Tsuchida S. Glutathione S-transferase A4 is a positive marker for rat hepatic foci induced by clofibrate and genotoxic carcinogens. *Cancer Sci* 101, 1093-1098, 2010.
2. Asano J, Kudo T, Shimizu T, Fan Y, Nanashima N, Yamana D, Miura T, Yamada T, Tsuchida S. Histone acetylation and steroid receptor coactivator expression during clofibrate-induced rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci* 101, 869-875, 2010.

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

なし

3 今後の問題点等

- 1) KS 型ラットの結果から PP によるラット肝発がん過程が少なくとも 2 段階で進行することを明らかにしたが、BE 陰性化の機序について、星細胞からのシグナルを必要とするかなど、解明する必要がある。
- 2) これまで PP と遺伝毒性物質によるラット肝発がん過程は異なると考えられてきたが、GST-A4 や Nrf2 の発現など共通点があることを明らかにした。両物質による発がん過程の異同についてさらに究明し、より効率的な発がんスクリーニング法を開発する必要がある。
- 3) 中期 *in vivo* ラット発がん試験は、国際的にがん原性試験として広く使用されていることから、遺伝毒性発がん物質の投与により出現する GST-P 陰性病変の性質を解明する必要がある。
- 4) Nrf2 とがん化学予防物質は、肝発がん過程のある程度進んだ時期には、発がんを促進する可能性が考えられ、そのような時期における役割の解明が必要である。