

## ラット肝発癌に及ぼすウルソデオキシコール酸の影響

鳥取大学医学部内科学第二教室 (主任 川崎 寛中教授)

大山賢治, 汐田剛史

## Effect of ursodeoxycholic acid on rat hepatocarcinogenesis

Kenji OYAMA, Goshi SHIOTA

*Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,  
Tottori University, Yonago 683-8504, Japan.***ABSTRACT**

Ursodeoxycholic acid (UDCA) is well-known to be effective for chronic liver diseases. However, its effect for hepatocarcinogenesis is not entirely elucidated. This study examined the effect of UDCA on rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN), in terms of tumor formation, apoptosis and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), glutathione S-transferase placental form (GST-P), bax and bcl-2. The numbers of tumors and GST-P-positive cells were lower in the UDCA group than in the control group. The apoptotic cells were increased with time in GST-P-positive lesions, and decreased in GST-P-negative lesions. The number of bax-positive cells was changed in accordance with that of apoptotic cells, and was significantly higher in the UDCA group than in the control group ( $p < 0.05$ ). However, there was no difference in the number of bcl-2-positive cells. These results suggest that ursodeoxycholic acid suppresses hepatocarcinogenesis initiated by DEN by means of inducing apoptosis mediated by expression of bax.

(Accepted in January 7, 2000)

**Key words :** ursodeoxycholic acid (UDCA), hepatocarcinogenesis, glutathione S-transferase placental form (GST-P), apoptosis, bax

## はじめに

現在, 我が国における肝細胞癌死亡者は癌死のうち男性では第3位, 女性では第4位であり, 合計年間約3万2千人である。肝細胞癌はその大部分がC型肝炎ウイルス, B型肝炎ウイルスによるウイルス性肝硬変より発生している<sup>1)</sup>。肝硬変患者では年率7%で肝細胞癌が発生する。最近導入されたインターフェロンの慢性肝炎に対する有効率は

約30%であるが, 肝硬変での有効率は低く, 加えて副作用が強いため肝癌発生の予防策が重要視される。以前より肝機能改善薬として汎用されてきた薬剤にグリチルリチン製剤, 漢方薬である小柴胡湯, そして胆汁酸製剤のウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid: UDCA) がある。これらの肝庇護剤は肝機能改善作用に加えて, 肝発癌抑制作用があるか否か臨床的に重要である。小柴胡湯は肝発癌抑制作用がヒト, 動物の両方で報告

されている<sup>2,3)</sup>。また、グリチルリチン製剤は肝発癌抑制作用がヒトで報告されており<sup>4)</sup>、最近、動物モデルを用いた実験でも確認されている<sup>5)</sup>。UDCAは二次性親水性胆汁酸であり、胆汁分泌促進効果、細胞保護作用等を持っている<sup>6)</sup>。

一般に細胞集団の増殖は、個々の細胞の核分裂(マイトーシス)と細胞死(アポトーシス)の差異により決定される。特に最近、アポトーシスの抑制が発癌に重要な役割を担うと考えられている。興味深いことに、代表的な発癌プロモーターであるフェノバルビタールやシプロテロンアセテートには強力なアポトーシス抑制作用があり、事実、これらのプロモーターを除去すると細胞はアポトーシスに陥ると報告されている<sup>7)</sup>。したがって、前癌状態にある肝細胞のアポトーシス抑制を阻止する薬剤、換言すればアポトーシスを促進する薬剤の投与が発癌抑制へ繋がる可能性があり、発癌予防の研究をこのような視点より進めることが重要である。

これまでUDCAは大腸発癌を抑制すると報告されているが<sup>8)</sup>、肝発癌に関する報告はない。本研究では、肝発癌へのUDCAの影響をdiethylnitrosamine (DEN)によるラット肝化学発癌モデルを用いて検討し、その機序としてアポトーシスの関与を中心に解析した。

#### 材料および方法

**動物および飼料** 5週齢344 Fisher系雄性ラット(日本チャールズリバー、横浜)を基礎飼料投与

群(1群)、0.1% (w/w) UDCA含有飼料投与群(2群)、0.3% UDCA含有飼料投与群(3群)に分けた。飼料はCE-2飼料(日本クレア、東京)およびUDCA含有CE-2飼料を使用した。

**研究方法** 90匹のラットを3群に分け、各々の飼料を2週間投与後、DEN(和光純薬、大阪)を38 mg/kg体重の週1回腹腔内投与を3週間、続いて50 mg/kg体重の週1回腹腔内投与を3週間行った(図1)。DEN投与終了5週後、10週後、18週後にエーテル麻酔下にラットを屠殺した。腹大動脈にカニューレを挿入して採血を行い、30分間室温静置後、遠心分離にて血清を得た。また、体重、肝重量測定後、肝を1 mm厚に薄切し、腫瘍数および腫瘍径を計測した。肝の一部を4%パラホルムアルデヒドで24時間固定後、パラフィン包埋を行った。3 μmの薄切切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色および免疫組織化学的検討を行った。

**肝機能試験** 血清ビリルビン値はクリメイトBIL-2(第一化学薬品、東京)を用いてアゾビリルビン法にて測定した。血清アルブミン値はアルブミンジッセイケン(実生研、東京)を用いてプロモクレゾールグリーン法により測定した。血清aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)値はクイックオートII(シノテスト、東京)を用いて紫外線スペクトロメトリー法により測定した。血清アルカリフォスファターゼ(ALP)値は、ALPジッセイケンを用いたSSCC法により測定した。これらはバイオケ

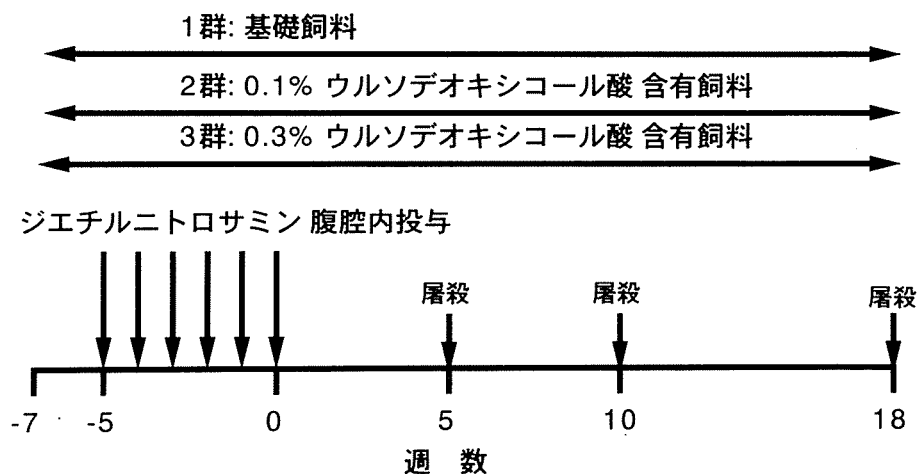


図1. ジエチルニトロサミン肝化学発癌実験プロトコール。ラットを3群に分け各々の飼料を投与し、ジエチルニトロサミン腹腔内投与5週後、10週後、18週後に屠殺。

ミカルアナライザー(AU5232, オリンパス, 東京)を用いて分析した. アルファフェトプロテイン (AFP) 値はAFPエイケンキット(英研化学, 東京)を用いてラジオイムノアッセイにて行い, ARC-950ガンマカウンター(アロカ, 東京)にて測定した.

**胆汁酸分析** 血中および肝臓中の胆汁酸をSakakuraらの方法を用いて分析した<sup>9)</sup>. すなわち, 血清0.5 mLを0.1 Mのリン酸緩衝液(pH 7.2) 5 mLで希釈し, 0.1 mLの標準液と混合した後, Bond Elut C18カートリッジに通した. 3 mLの蒸留水で洗浄した後, 3 mLのメタノールで抽出した. 抽出液は減圧下において濃縮し, 200  $\mu$ Lのmobil phase Bに溶解した. 5°C, 1600 g, 10分間遠心分離した後, 10  $\mu$ Lの上清液をHPLCに注入した. HPLCシステムはLC RF-550スペクトロフルオロメーターを備えたLC-10A(島津製作所, 東京)を使用した. また, 肝組織100 mgを用いて同様に測定した.

**アポトーシスの評価** アポトーシスはタネル(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling: TUNEL)法にて評価した. 脱パラフィン後, 20  $\mu$ g/mLのプロテナーゼK(山ノ内, 東京)に室温10分間反応させた. その後2%の過酸化水素水加メタノールに室温20分間反応させ, ApopTag Peroxidase Kit(オンコール, 米国)を用いて可視化した. 核染色にはメチルグリーンを用いた. アポトーシス陽性細胞率は無作為に選んだ5000個の肝細胞中の陽性細胞数より計算した.

**免疫組織化学的検討** 免疫組織化学にはavidin-biotin-peroxidase complex (ABC)法によりベクスタイン免疫組織化学染色システム(ベクターラボラトリー, 米国)を用いた. 脱パラフィン後, 約10分間マイクロウェーブ処理を行い, 2%の過酸化水素水加メタノールに室温20分間反応させた. 正常血清にて非特異的な反応を阻止した後, 一次抗体を4°Cで一晩反応させた. その後, ピオチン化二次抗体を室温30分間反応させ, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(3, 3'-diaminobenzidine: DAB)にて発色後, ヘマトキシリンを用いて核染色を行った. 一次抗体は, ラット抗glutathione S-transferase placental form (GST-P)ポリクローナル抗体 (100倍希釈, エム

ビーエル, 名古屋), マウス抗proliferating cell nuclear antigen (PCNA)モノクローナル抗体 (100倍希釈, ノボカストラ, イギリス), ウサギ抗baxポリクローナル抗体 (100倍希釈, サンタクルーズ, 米国), ウサギ抗bcl-2ポリクローナル抗体 (100倍希釈, サンタクルーズ, 米国)を使用した. GST-P陽性細胞率は各々無作為に選んだ肝細胞3000個, PCNAは1000個の細胞中の陽性細胞数より計算した. またbax及びbcl-2発現の評価は, 陽性細胞が認められない場合0点, 10%未満の場合1点, 10%以上50%未満の場合2点, 50%以上の場合3点としてスコア化した.

**統計学的処理** 成績は, 平均値 $\pm$ 標準誤差(SEM)で示した. 群間の差の検定には分散分析(ANOVA), Fisher検定を用い,  $P < 0.05$ を有意と判定した.

## 結 果

### ラット体重と肝重量

ラット体重は5週, 18週では各群間で差はなかった. 10週では1群の $328 \pm 6$  gに対し, 2群では $314 \pm 5$  g, 3群では $308 \pm 3$  gと有意に低体重となっていた( $p < 0.05$ , 表1). 肝重量は5週, 18週では各群間で有意差はなかったが, 10週では1群の $10.4 \pm 0.3$  gに対し, 2群では $9.3 \pm 0.1$  g, 3群では $9.1 \pm 0.2$  gと有意に低かった( $p < 0.05$ ). 肝体重比は5週および10週では, 1群と比較して3群で有意に低かったが ( $p < 0.05$ ), 18週では各群間に差はなかった.

### 肝機能

ASTは5週で1群の $239 \pm 42$  IU/Lに対し, 3群では $106 \pm 8$  IU/Lと有意に低値であった( $P < 0.05$ , 表2). 10週および18週では差はなかった. ALTは5週および10週において2群, 3群で低値である傾向を認めたが, 有意差はなかった. ALPは10週において, 1群と比較し3群で有意に低値であった( $p < 0.05$ ) が, 5週および18週では各群間で差はなかった. 5週の胆汁酸分析では,  $\alpha$ -ムリコール酸は血清中, 肝組織中とも各群間で差はなかった.  $\beta$ -ムリコール酸はグリシン抱合型が3群の肝組織中で, 1群と比較し有意に増加していた( $p < 0.05$ , 表3). ウルソデオキシコール酸は1群と比較し, 2群では血清中で遊離型が4.0倍, 肝組織中でタウリン抱合型が5.5倍, 3群では血清

表1. 体重, 肝重量, 肝体重比

週数	群	体重 (g)	肝重量 (g)	肝体重比 (%)
5	1	293 ± 5	9.6 ± 0.7	3.28 ± 0.06
	2	284 ± 4	9.1 ± 0.4	3.19 ± 0.06
	3	283 ± 3	8.8 ± 0.4	3.13 ± 0.04*
10	1	328 ± 6	10.4 ± 0.3	3.15 ± 0.06
	2	314 ± 5*	9.3 ± 0.1*	2.98 ± 0.04
	3	308 ± 3*	9.1 ± 0.2*	2.96 ± 0.05*
18	1	335 ± 6	11.0 ± 0.3	3.19 ± 0.06
	2	342 ± 5	11.0 ± 0.3	3.20 ± 0.05
	3	336 ± 4	10.7 ± 0.3	3.21 ± 0.06

Mean ± SEM. \*: p < 0.05.

表2. 肝機能検査の変動

週数	群	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)
5	1	239 ± 42	105 ± 21	466 ± 6
	2	148 ± 28	75 ± 11	436 ± 8
	3	106 ± 8*	57 ± 3	473 ± 13
10	1	140 ± 13	85 ± 10	392 ± 8
	2	131 ± 8	69 ± 5	353 ± 10
	3	126 ± 13	73 ± 6	324 ± 7*
18	1	173 ± 26	91 ± 15	343 ± 8
	2	176 ± 28	91 ± 16	353 ± 17
	3	199 ± 38	98 ± 17	332 ± 15

Mean ± SEM. \*: p < 0.05.

中, 肝組織中それぞれ遊離型が5.7倍と25.5倍, タウリン抱合型が12.5倍, 13.9倍と有意に増加していた(p < 0.05). ヒオデオキシコール酸は血清中, 肝組織中とも各群間で差はなかった. コール酸は肝組織中でタウリン抱合型が1群と比較し, 3群で有意に低かった(p < 0.05). ケノデオキシコール酸は肝組織中でタウリン結合型が1群と比較し, 3群で有意に増加していた(p < 0.05). デオキシコール酸は血清中で1群と比較し, 2群で遊離型, 3群でタウリン結合型が有意に増加してい

た(p < 0.05). リトコール酸は1群と比較し3群で, 血清中では遊離型, 肝組織中ではタウリン抱合型が有意に増加していた(p < 0.05). 総胆汁酸は肝組織中で, 1群と比較し3群で有意に増加していた(p < 0.05).

#### 肝腫瘍の発生

大きさ1 mm以上の結節を算出した. 発生した腫瘍は結節型で, 組織型は索状型肝細胞癌であった(図2). 5週では腫瘍発生を認めなかったが,

表3. 5週での胆汁酸分析

胆汁酸	抱合	1群		2群		3群	
		血清 (nmol/mL)	肝組織 (nmol/g)	血清 (nmol/mL)	肝組織 (nmol/g)	血清 (nmol/mL)	肝組織 (nmol/g)
$\alpha$ -ムリコール酸	フリー	0	0.08 ± 0.08	0	0.10 ± 0.07	0.01 ± 0.01	0
	グリシン抱合型	0	0.10 ± 0.10	0.16 ± 0.09	0.25 ± 0.16	0.17 ± 0.12	0.31 ± 0.17
	タウリン抱合型	0.89 ± 0.30	14.71 ± 1.99	0.87 ± 0.12	16.60 ± 1.27	0.68 ± 0.13	15.03 ± 1.38
$\beta$ -ムリコール酸	フリー	0.37 ± 0.13	0.82 ± 0.24	0.60 ± 0.14	0.82 ± 0.12	0.44 ± 0.07	0.98 ± 0.21
	グリシン抱合型	0.09 ± 0.09	0.74 ± 0.22	0.15 ± 0.08	1.32 ± 0.27	0.28 ± 0.13	6.21 ± 1.29*
	タウリン抱合型	3.76 ± 2.29	98.55 ± 9.58	1.85 ± 0.42	99.04 ± 8.59	1.60 ± 0.26	94.32 ± 6.99
ウルソデオキシコール酸	フリー	0.29 ± 0.17	0.08 ± 0.08	1.17 ± 0.34*	0.36 ± 0.18	1.66 ± 0.32*	2.04 ± 0.36*
	グリシン抱合型	0	0	0.04 ± 0.03	0.08 ± 0.08	4.46 ± 4.22	7.30 ± 1.90
	タウリン抱合型	0.19 ± 0.14	11.12 ± 4.29	0.65 ± 0.19	60.66 ± 7.55*	2.38 ± 0.82*	154.72 ± 12.50*
ヒオデオキシコール酸	フリー	0.80 ± 0.16	0.09 ± 0.09	1.35 ± 0.20	0.08 ± 0.08	1.18 ± 0.25	0.46 ± 0.18
	グリシン抱合型	0.08 ± 0.08	0.44 ± 0.44	0.19 ± 0.16	0.20 ± 0.20	0.21 ± 0.09	2.01 ± 0.84
	タウリン抱合型	1.72 ± 0.28	45.77 ± 3.72	1.88 ± 0.13	49.45 ± 5.38	1.50 ± 0.24	37.39 ± 4.34
コール酸	フリー	1.21 ± 0.39	0.84 ± 0.39	1.95 ± 0.79	0.25 ± 0.25	0.42 ± 0.19	0.16 ± 0.11
	グリシン抱合型	0.08 ± 0.05	1.71 ± 0.65	0.45 ± 0.21	1.90 ± 0.55	2.25 ± 1.93	3.86 ± 1.10
	タウリン抱合型	4.87 ± 1.43	138.23 ± 11.82	4.03 ± 0.63	124.22 ± 9.59	2.48 ± 0.64	66.95 ± 7.00*
ケノデオキシコール酸	フリー	0.46 ± 0.32	0	0.29 ± 0.11	0	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.08
	グリシン抱合型	0.07 ± 0.05	0	0.07 ± 0.06	0	2.37 ± 2.29	0.58 ± 0.23
	タウリン抱合型	0.53 ± 0.20	7.64 ± 1.07	0.50 ± 0.09	12.20 ± 1.10	1.33 ± 0.66	15.20 ± 1.71*
デオキシコール酸	フリー	0.38 ± 0.08	0	0.74 ± 0.11*	0.11 ± 0.11	0.39 ± 0.06	0.40 ± 0.25
	グリシン抱合型	0.04 ± 0.03	0.67 ± 0.61	0.08 ± 0.05	0.24 ± 0.13	0.28 ± 0.14	1.73 ± 0.54
	タウリン抱合型	0.58 ± 0.11	21.07 ± 2.26	0.96 ± 0.15	27.54 ± 2.18	1.01 ± 0.13*	23.90 ± 2.23
リトコール酸	フリー	0	0	0.23 ± 0.16	0.74 ± 0.41	0.93 ± 0.16*	0.19 ± 0.13
	グリシン抱合型	0	0.16 ± 0.09	0.03 ± 0.03	0	0.06 ± 0.06	0.28 ± 0.28
	タウリン抱合型	0	4.40 ± 3.66	0	1.14 ± 0.33	0.14 ± 0.09	6.41 ± 0.68*
合計		16.41 ± 5.19	355.12 ± 28.86	18.23 ± 2.60	458.85 ± 33.81	26.36 ± 12.12	580.40 ± 42.26*

Mean ± SEM. \*:  $p < 0.05$ .

10週では1群30%, 2群20%, 3群0%であり, 1群と3群間で有意差があった( $p < 0.05$ ). 18週では1群100%, 2群90%, 3群50%であり, 1群と3群間で有意差があった( $p < 0.05$ ). 平均腫瘍個数についてみると, 10週では1群0.4個に対し, 2群0.2個, 3群0個と少なく, また, 18週では1群5.6個に対し, 2群1.4個, 3群0.7個と有意差があった( $p < 0.05$ , 図3). GST-P陽性細胞率は5週では1群の平均0.6%に対し, 2群0.4%, 3群0.4%であり, 10週では1群の平均1.8%に対し, 2群1.5%, 3群1.3%と各群間で差はなかった. 18週になると1群の平均5.0%に対し, 2群1.6%, 3群1.5%であ

りUDCA投与群で有意に低値となった( $p < 0.05$ , 図4, 図5).

#### マイトーシスとアポトーシス

マイトーシスとアポトーシスをGST-P陰性領域とGST-P陽性領域に分け検討すると, GST-P陰性領域でのPCNA陽性細胞率は, 10週では1群と比較し2群, 3群で有意に低かった( $p < 0.05$ ). 一方, アポトーシス細胞は5週で1群の平均0.04%に対し, 2群0.16%, 3群0.16%と有意に増加していた( $p < 0.05$ , 図6, 図7). 10週でも同様の傾向を示した. GST-P陽性領域でのPCNA陽性細

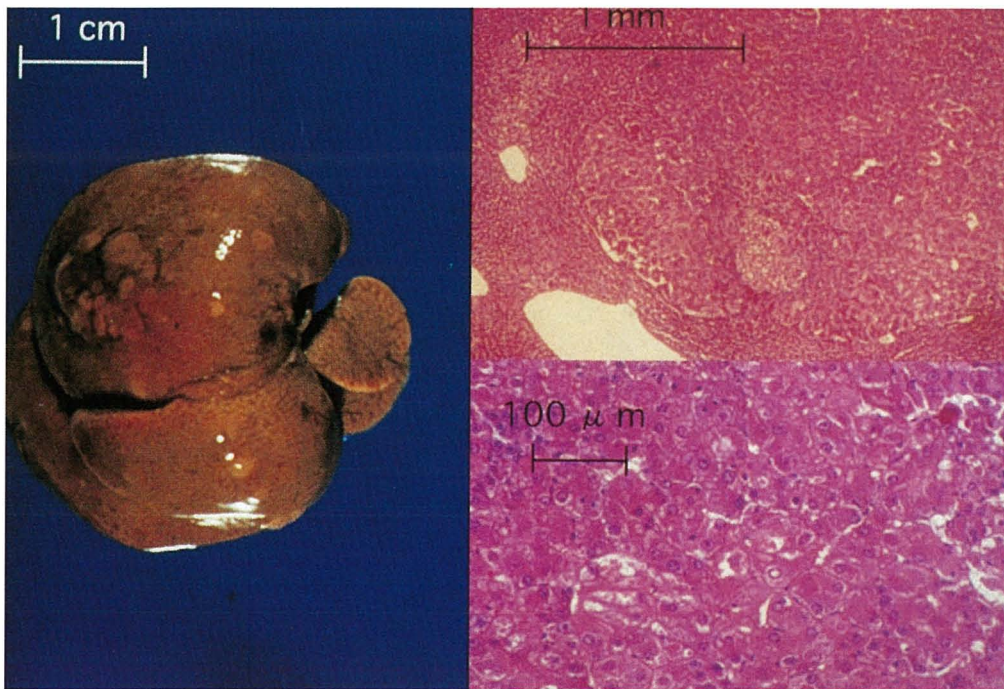


図2. 発生した肝腫瘍. 18週1群ラットの肝臓. 左側は肉眼像, 右上段は結節形成像 (ヘマトキシリンエオジン染色), 右下段は索状型肝細胞癌像 (ヘマトキシリンエオジン染色).

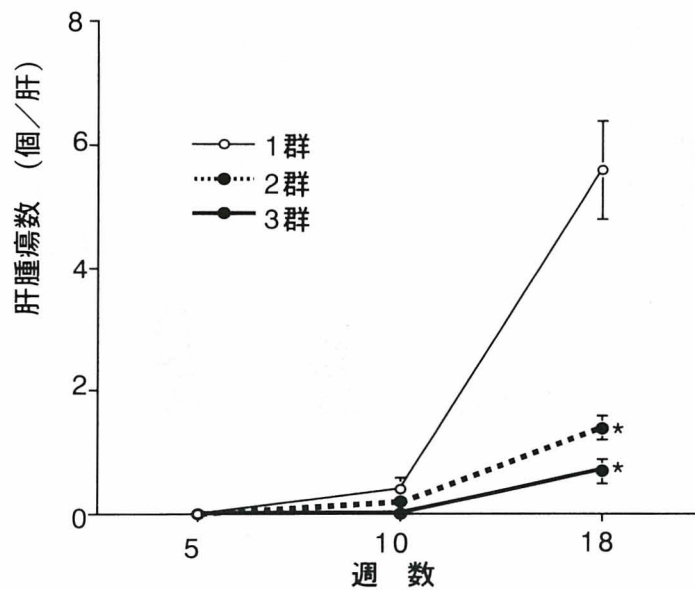


図3. 肝腫瘍発生の経時的推移. Mean ± SEM. \*:  $p < 0.05$ .

胞率は各週で群間に有意差はなかった. また, アポトーシス細胞は5週, 10週では差はなかったが, 18週では1群の平均0.16%に比較し, 2群0.29%, 3群0.54%と3群で有意差があった ( $p < 0.05$ ).

bax陽性細胞は, GST-P陰性領域では, 5週で1群の平均スコア0.1に比較して, 2群, 3群では各

々平均スコアが1.4, 1.1と有意に増加していた ( $p < 0.05$ , 表4, 図8). GST-P陽性領域では, 5週で差はなかったが, 10週および18週では, 1群と比較して2群, 3群で発現頻度の増加傾向が見出された. bcl-2陽性細胞は, GST-P陰性領域および陽性領域ともに, 2群, 3群で1群に比較し高値



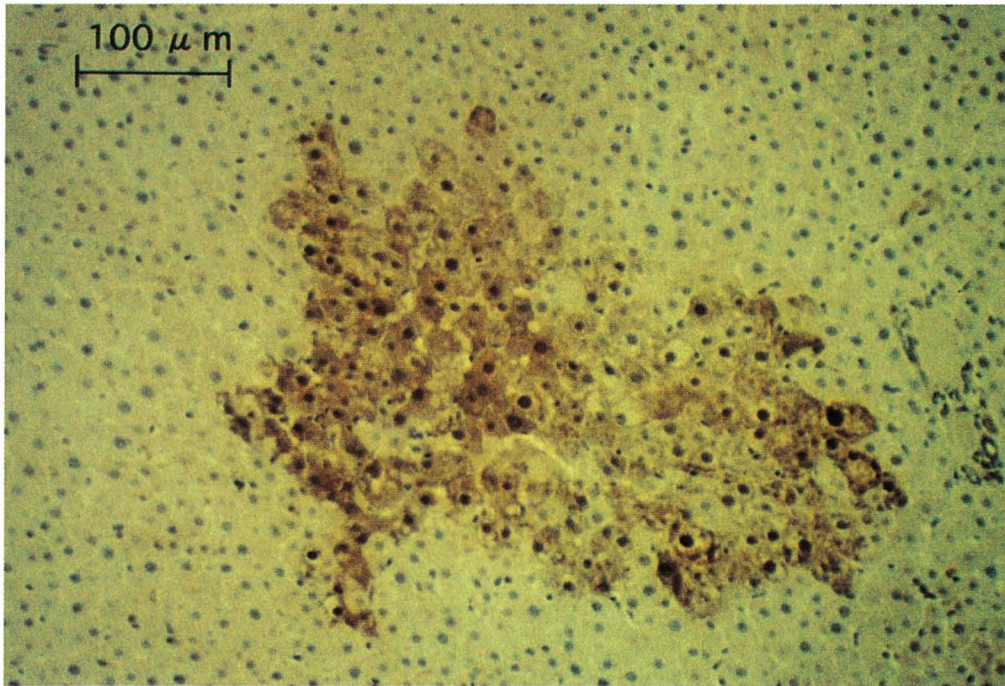


図4. GST-P染色. 5週1群ラット.

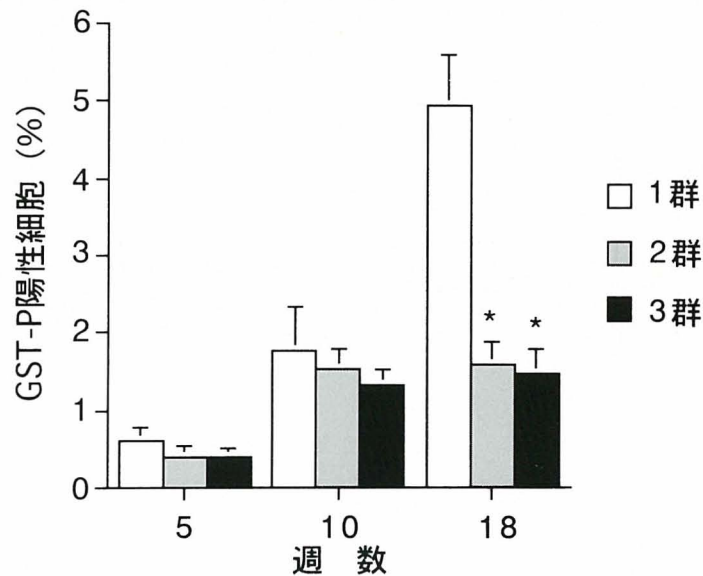


図5. GST-P陽性細胞の変動. Mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ .

を示したが、有意な差はなかった(表4).

#### 考 察

化学肝発癌はイニシエーション、プロモーションおよびプログレッションの三つの過程より成立する。ファーストヒットによりイニシエートされた前癌状態にある肝細胞は、種々の発癌プロモーターによるプロモーション作用を受けて増殖し、同一な細胞集団であるクローンを形成する。次

に、クローンのいずれかの細胞はセカンドヒットによるプログレッション作用を受け、新たなクローンとなり、これらの細胞が増殖進展し、癌へ進行すると理解されている<sup>10)</sup>。細胞集団の増殖は、個々の細胞の増殖活性と細胞脱落の総和の差異により決定される。前者はミトーシス、後者はアポトーシスに代表される。最近では発癌過程でアポトーシスの抑制が重要視されつつある。一次胆汁酸であるコール酸が腫瘍部でのアポトーシ

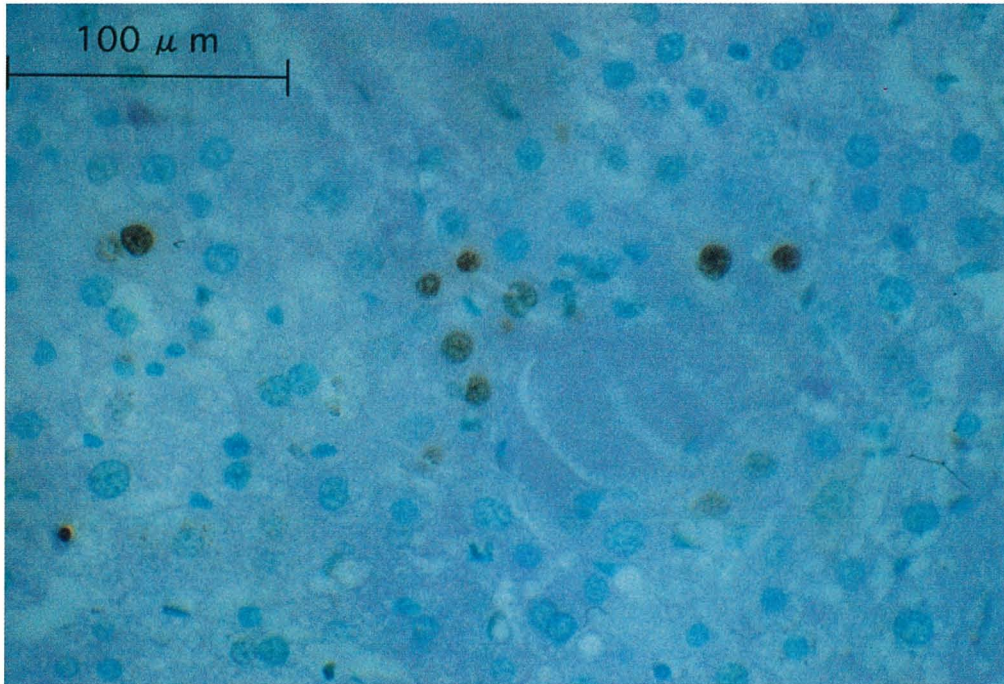


図6. タネル法によるアポトーシス細胞の可視化.

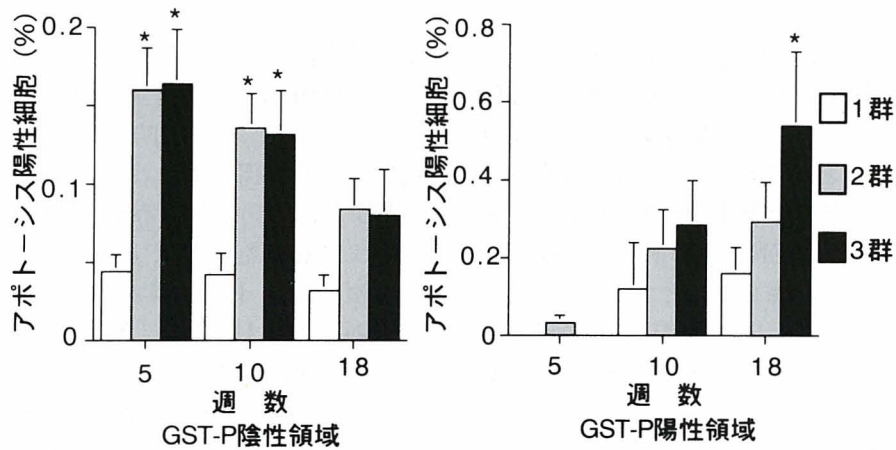


図7. アポトーシス陽性細胞数の変動. Mean ± SEM. \*: p < 0.05.

表4. bax, bcl-2陽性頻度スコア

週数	GST-P陰性領域			GST-P陽性領域			
	1群	2群	3群	1群	2群	3群	
bax	5	0.1 ± 0.1	1.4 ± 0.3*	1.1 ± 0.2*	0	0	0
	10	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3
	18	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.5
bcl-2	5	0.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0	0	0
	10	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.3
	18	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.4

スコア：陽性細胞なし，0点；10%未満，1点；10%以上50%未満，2点；50%以上，3点。  
Mean ± SEM. \*: p < 0.05.



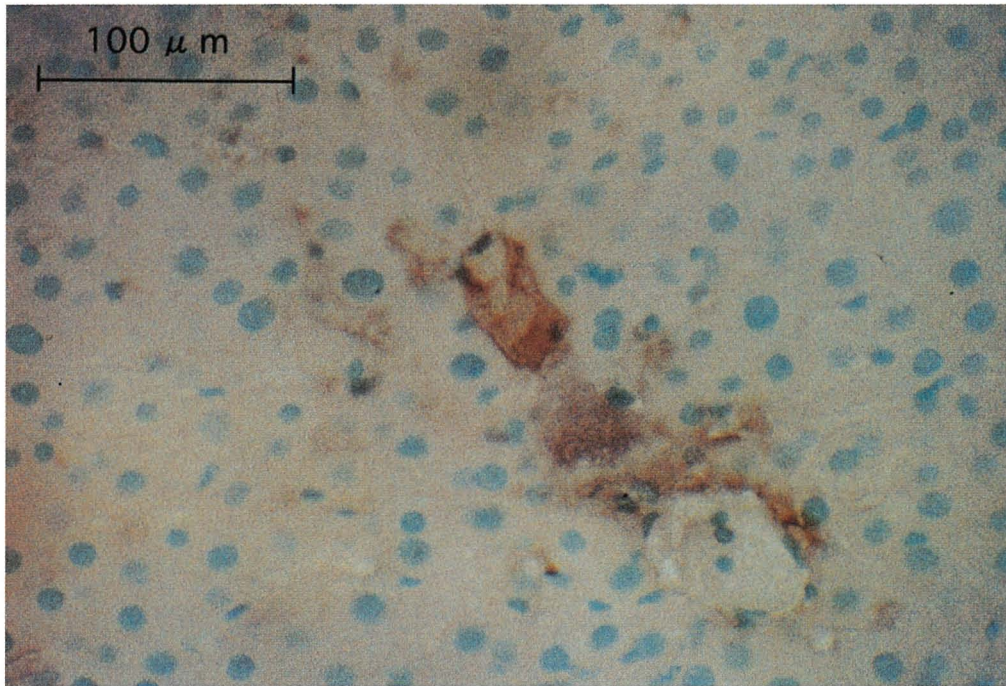


図8. bax染色. 5週3群ラットの肝臓.

スを抑制することにより肝発癌を促進するという報告<sup>11)</sup>や、肝庇護薬であるグリチルリチンが非腫瘍部においてアポトーシスを誘導することにより肝発癌を抑制するという報告<sup>5)</sup>などは、肝発癌におけるアポトーシスの重要性を示唆している。また、本研究で用いたDENによる肝化学発癌モデルがウイルス性肝細胞癌を主体とするヒト肝細胞癌モデルとなりうるかという議論については、ウッドチャック肝炎で肝臓のnitrateやnitrosamineの合成が著増することが示されており<sup>12)</sup>、ウイルス性肝発癌の一モデルとしてある程度有用と考えられる。

UDCAは経口投与されると腸管で吸収され、大部分が肝臓に取り込まれる。主にグリシン抱合された後、腸肝循環を繰り返して糞便中に排泄される。一部はリトコール酸、ケノデオキシコール酸に代謝され体外に排泄される。胆汁酸の細胞毒性はその疎水性に依存すると考えられており、疎水性の強い胆汁酸ほど細胞障害が強くなる。一方、UDCAに代表される親水性胆汁酸は、細胞障害が少ないのみならず、疎水性胆汁酸による細胞障害に対して保護作用を有している。事実、疎水性胆汁酸であるデオキシコール酸やリトコール酸は、既知の発癌物質によるイニシエーション成立後に投与された場合、肝臓における発癌を増強

すると報告されている<sup>13, 14, 15)</sup>。本研究で明らかとなったUDCAによる肝発癌抑制のメカニズムとしてアポトーシスの関与が挙げられる。UDCA投与により腫瘍発生数およびGST-P陽性細胞数が減少し、肝発癌抑制効果が認められた。前癌細胞および癌細胞に及ぼすUDCAの効果を検討するため、GST-P陽性領域とGST-P陰性領域に分けて検討した。UDCAによりGST-P陰性領域でPCNA陽性細胞数は減少しており、両領域でアポトーシス陽性細胞数が増加していた。2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin肝発癌モデルでは、アポトーシス陽性細胞数の変化は正常領域に比較してGST-P陽性領域で著明であると報告されているが<sup>16)</sup>、今回の検討でもGST-P陽性領域での変化が著明であり、UDCAが前癌細胞および癌細胞に直接作用している可能性が推測された。

bcl-2ファミリーはミトコンドリア外膜に存在し、チトクロームCの細胞質内への流入をbcl-2が抑制し<sup>17)</sup>、baxが促進している<sup>18)</sup>。bcl-2ファミリーは肝再生過程で変動することが報告されており<sup>19)</sup>、肝細胞の増殖制御に重要である。デオキシコール酸やエタノールによりミトコンドリアが障害された場合、UDCA投与によりミトコンドリア内膜の透過性が正常化し、アポトーシスは抑制されるという報告がある<sup>20, 21)</sup>。これらの報告は本

研究の結果と矛盾するようと思われるが、アセチルアミノフルオレン肝発癌においてはミトコンドリア膜透過性の抵抗が増加し、アポトーシスが抑制される<sup>22)</sup>。今回用いたDENでも同様にアポトーシスが抑制され、UDCAはミトコンドリア膜の透過性に影響し、アポトーシスの抑制を解除する方向に働いた可能性が考えられる。

HepG2ヒト肝癌細胞やMCF-7ヒト乳癌細胞を用いた*in vitro*の検討では、UDCAあるいはその誘導体がアポトーシスを誘導すると報告されている<sup>23, 24, 25)</sup>。HuH7肝癌細胞やFao肝癌細胞を用いた3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assayでは、UDCA濃度250  $\mu$ Mより肝癌細胞数は減少し、この効果はUDCA濃度に依存性であった(未発表データ)。こうした検討ではDNAの断片化が起こり、特にUDCA濃度750  $\mu$ MではDNAのラダー形成を認め、肝癌細胞を直接アポトーシスへ誘導したと考えられた。以前、我々はコール酸によるアポトーシス抑制と肝発癌促進を報告したが<sup>11)</sup>、ほぼ同濃度のコール酸によるMTT assayでは肝癌細胞のアポトーシスは認めておらず、今回検討したUDCAの作用は胆汁酸の非特異的作用でないと推測された。

#### おわりに

ラット肝化学発癌モデルにおいて、UDCAはbax遺伝子発現増加を介してアポトーシスの抑制を緩和し、肝発癌を抑制していた。したがって、UDCAが肝細胞癌発生の化学予防剤となり得ることが示唆された。

稿を終えるにあたり終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部内科学第二教室川崎寛中教授、また御校閲を賜りました同医動物学教室平井和光教授ならびに同病理学第一教室井藤久雄教授に深謝いたします。また協力いただきました同内科学第二教室教室員各位に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 清澤研道. (1999) 日本の肝がんの特徴 - 世界の肝がんにおける位置付け - 日本肝臓学会編, 平成11年度肝がん白書, pp. 5-9. 日本肝臓学会, 東京.
- 2) Oka, H., Yamamoto, S., Kuroki, T., Harihara, S., Marumo, T., Kim, S. R., Monna, T., Kobayashi, K. and Tango, T. (1995) Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with Sho-saiko-to (TJ-1). *Cancer* **76**, 743-749.
- 3) Tatsuta, M., Ishii, H., Baba, M., Nakaizumi, A. and Uehara, H. (1991) Inhibition by Xiao-Chai-Hu-Tang (TJ-9) of development of hepatic foci induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Jpn J Cancer Res* **82**, 987-992.
- 4) Arase, Y., Ikeda, K., Murashima, N., Chayama, K., Tsubota, A., Koida, I., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M. and Kumada, H. (1997) The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer* **79**, 1494-1500.
- 5) Shiota, G., Harada, K., Ishida, M., Tomie, Y., Okubo, M., Katayama, S., Ito, H. and Kawasaki, H. (1999) Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice. *Carcinogenesis* **20**, 59-63.
- 6) Renner, E. L., Lake, J. R., Cragoe, E. J. Jr., Van Dyke, R. W. and Scharschmidt, B. F. (1988) Ursodeoxycholic acid choleresis: relationship to biliary HCO<sub>3</sub> and effects of Na<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> exchange inhibitors. *Am J Physiol* **254**, G232-241.
- 7) Pitot, H. C. (1998) Hepatocyte death in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **28**, 1-5.
- 8) Narisawa, T., Fukaura, Y., Terada, K. and Sekiguchi, H. (1998) Prevention of N-methylnitrosourea-induced colon tumorigenesis by ursodeoxycholic acid in F344 rats. *Jpn J Cancer Res* **89**, 1009-1013.
- 9) Sakakura, H., Suzuki, M., Kimura, N., Takeda, H., Nagata, S. and Maeda, M. (1998) Simultaneous determination of bile acids in rat bile and serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **621**, 123-131.
- 10) Pitot, H. C. and Dragan, Y. P. (1994) Chemical induction of hepatic neoplasia. *The Liver Biology and Patho-biology*, 3rd ed.,

- pp. 1467-1498, Raven Press, New York.
- 11) Shiota, G., Oyama, K., Noguchi, N., Takano, Y., Ito, H. and Kawasaki, H. (1999) Oral administration of cholic acid promotes growth of liver tumors initiated by diethylnitrosamine in rats. *Int J Oncol* 15, 259-265.
  - 12) Liu, R. H., Baldwin, B., Tennant, B. C. and Hotchkiss, J. H. (1991) Elevated formation of nitrate and N-nitrosodimethylamine in woodchucks (*Marmota monax*) associated with chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Cancer Res* 51, 3925-3929.
  - 13) Cameron, R. G., Imaida, K., Tsuda, H. and Ito, N. (1982) Promotive effects of steroids and bile acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine. *Cancer Res* 42, 2426-2428.
  - 14) Tsuda, H., Masui, T., Imada, K., Fukushima, S. and Ito, N. (1984) Promotive effect of primary and secondary bile acids on the induction of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase-positive liver cell foci as a possible endogenous factor for hepatocarcinogenesis in rats. *Gann* 75, 871-875.
  - 15) Hiasa, Y., Konishi, Y., Kamamoto, Y., Watanabe, T. and Ito, N. (1971) Effect of lithocholic acid on DL-ethionine carcinogenesis in rat liver. *Gann* 62, 239-245.
  - 16) Stefan, S., Albrecht, B., Karl, W. B. and Michael, S. (1995) Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumor promotion in rat liver. *Carcinogenesis* 16, 1271-1275.
  - 17) Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. and Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
  - 18) Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J. C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4997-5002.
  - 19) Betsy, T. K., Janeen, H. T., Stanislaw, K., Timothy, W. B., John, C. R. and Clifford, J. S. (1996) Modulation of apoptosis-associated genes bcl-2, bcl-x, and bax during rat liver regeneration. *Cell Growth & Differ* 7, 1633-1642.
  - 20) Cecilia, M. P. R., Guangsheng, F., Xiaoming, M., Betsy, T. K. and Clifford, J. S. (1998) A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 101, 2790-2799.
  - 21) Neuman, M. G., Shear, N. H., Bellentani, S. and Tiribelli, C. (1998) Role of cytokines in ethanol-induced cytotoxicity in vitro in HepG2 cells. *Gastroenterology* 115, 157-166.
  - 22) Peter, C. K., Annette, B. and Hans, G. N. (1998) Mitochondrial permeability transition is altered in early stages of carcinogenesis of 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis* 19, 1185-1190.
  - 23) Yoo, H. P., Jung, A. K., Jin, H. B., Eun, J. J., Tae, H. K., Hongsuk, S., Myung, H. P. and Kyu, W. K. (1997) Induction of apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells by a novel derivative of Ursodeoxycholic acid (UDCA). *Arch Pharm Res* 20, 29-33.
  - 24) Jin, H. B., Jung, A. K., Chang, M. K., Yong, S. L. and Kyu, W. K. (1997) Induction of apoptosis by bile acids in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 1, 107-115.
  - 25) Eun, O. I., Sungeun, L., Hongsuk, S., Kyu, W. K., Young, T. B. and Nam, D. K. (1999) A novel Ursodeoxycholic acid derivative induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Pharm Pharmacol Commun* 5, 293-298.