

令和元年6月7日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08616

研究課題名(和文)トランス脂肪酸毒性によるC型肝炎関連肝癌増悪機構の解明と予防法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism on hepatitis C-related liver cancer exacerbation by trans-fatty acid toxicity and development of preventive method

研究代表者

青山 俊文 (AOYAMA, Toshifumi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：50231105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルスコア蛋白を発現するトランスジェニックマウスは生後18か月頃に、約30-35%の頻度で小型肝癌の発生を呈する。12-13カ月齢の本マウスにトランス脂肪酸を含む飼料を5カ月間与えた結果、すべてのマウスに肝腫瘍が発生し、トランス脂肪酸が強い肝発癌促進作用をもつことが分かった。トランス脂肪酸食を与えたマウスの肝臓非腫瘍部には著明な脂肪肝炎および線維化がみられ、炎症シグナル活性化、酸化ストレス増加、小胞体ストレス増加、細胞増殖亢進などを介して肝発癌に至ったと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの加工食品に含まれるトランス脂肪酸は、健常人に対して、LDLコレステロールの増加に伴う心血管疾患のリスクを増加させ、また、肥満・アレルギー性疾患・認知症等を誘発する毒性を示すことが知られている。しかし、肝発癌に与える影響は明らかにされていない。本研究から、トランス脂肪酸がHCV関連肝癌の発症リスクを高める可能性が初めて示唆された。HCV持続感染者ではトランス脂肪酸の摂取量を制限することが肝発癌抑制に有効である可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Transgenic mice expressing the hepatitis C virus core protein develop liver cancer at a frequency of about 30-35% at around 18 months of age. We fed 12-13-month-old male transgenic mice with a diet containing trans-fatty acids for 5 months and found liver tumors in all of these mice, demonstrating the strong liver tumorigenic effect of trans-fatty acids. These transgenic mice fed a trans-fatty acid-rich diet also showed marked hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis in their non-tumorous liver tissues, which accompanied with activated inflammatory signaling, increased oxidative and endoplasmic reticulum stress, and accelerated cell proliferation. These changes likely contributed to promotion of liver tumorigenesis by trans-fatty acid-rich diet.

研究分野：脂質代謝制御学

キーワード：HCV トランス脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の慢性肝疾患において、C型肝炎ウイルス(HCV)持続感染に起因する慢性肝炎・肝硬変・肝細胞癌(HCC)は大きな割合を占めている。抗ウイルス療法の進歩はHCV駆除を70~80%程度可能にしたものの、その副作用や耐性ウイルスの出現や経済的負担から大きな問題点を包含している。加えて、感染期間中のダメージがウイルス除去後の病状進展に与える影響についてはほとんど理解が進んでいない。HCV感染に伴う一連の肝疾患の病態解析とそれに基づいた安全で経済的負担の少ない肝硬変・肝細胞癌発症予防法の開発は焦眉の急である。HCV感染の病態解析の試みとして、HCV構成蛋白の一つであるコア蛋白を肝臓で持続的に発現させたトランスジェニックマウスが作製された。このマウスは通常食投与で脂肪肝を呈し、20ヶ月前後でHCCを約30%の頻度で発症する(Moriya K et al. Nat Med, 1998)。我々は本マウスの肝臓において、核内受容体の一種である型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)の持続的活性化が肝癌発症の必須因子であることを発見した(Tanaka N et al. J Clin Invest, 2008; Tanaka N et al. Int J Cancer, 2008)。

一方、多くの加工食品に含まれるトランス脂肪酸は、健康人に対して、LDLコレステロールの増加に伴う心血管疾患のリスクを増加させ、また、肥満・アレルギー性疾患・認知症等を誘発する毒性を示すことが知られている。しかし、特定の既往症を有する人々に対する毒性に関するデータは少なく、未知の研究領域である。

我々は従来の研究過程において、HCVコア蛋白発現トランスジェニックマウスに食品中に含まれる様々な脂質を長期間摂食させる予備実験を行ってきた。その結果、0.7%トランス脂肪酸含有食または0.5%コール酸含有食摂取が肝細胞癌発症頻度を著しく高めることを見出した。トランス脂肪酸に焦点を絞り、14ヵ月齢のマウスに6ヵ月間摂食させ、20ヵ月齢で解剖する大規模実験を行った(脂質過剰とならないように、AIN93G粉末食の脂肪成分は7%に調整した)。HCVコア蛋白発現トランスジェニックマウスに0.7%トランス脂肪酸含有食を与えた場合、全てのマウスが非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を呈し、強烈的な肝細胞癌発症促進作用が見出された。そこで、肝細胞癌発症促進作用の分子機構を明らかにする本研究計画の着眼に至った。

2. 研究の目的

上記の肝細胞癌発症促進作用の機構を下記の様々な観点から解析し、解明する。(1)我々が以前に提唱した核内受容体PPARの持続的活性化(Tanaka N et al. J Clin Invest, 2008; Tanaka N et al. Int J Cancer, 2008)の更なる強化を介した発癌促進機構(2)組織学的異常の亢進を介した機構(3)DNAマイクロアレイ解析等に基づく細胞周期調節因子・癌抑制遺伝子等の発現変動を介した機構(4)メタボロミクス(リポミクス)解析に基づく胆汁酸誘導体・特異的フォスホリピドの作用を介した機構(5)脂質代謝関連の核内蛋白の作用変動を介した機構(6)老化関連分泌表現型(SASP)の誘発を介した機構(7)炎症・線維化関連蛋白の発現変動を介した機構 加えて、図1・2の実験条件下で、発癌促進作用を阻止できる予防法を開発する。

3. 研究の方法

12-13ヵ月齢のHCVコア蛋白発現トランスジェニックオスマウス(C57BL/6 genetic background)を無作為に2群に分け、コントロール食(n=17)とトランス脂肪酸含有食(n=21)で5ヵ月間飼育した。飼料はリサーチダイエツ社から購入した。コントロール食(D10012G)には7%の割合で大豆油が配合されており、このうちの6/7を精製ショートニング(Primex®)に置き換えた飼料をトランス脂肪酸含有食(D14020301)として使用した。マウスを上記の期間飼育した後、6時間の絶食を行い、二酸化炭素過剰吸入により安楽死させ、血液・肝臓などを回収した。肝臓の表面および切断面における腫瘍の数・サイズを計測し、単離した腫瘍の組織学的解析を行い、腫瘍の評価を行った。肝臓は腫瘍を可能な限り取り除いた後、-80度で凍結保存した。この肝臓を用いて実験を進めた。

4. 研究成果

トランス脂肪酸食はHCVコア蛋白発現トランスジェニックマウスの肝発癌を促進する

5ヵ月間の飼育の後、コントロール食を与えたトランスジェニックマウスは約40%が肝発癌を示した。一方、トランス脂肪酸食を与えたマウスではすべての個体が肝発癌を示した。腫瘍の数と大きさはグループ間で有意な差はなかったが、トランス脂肪酸群ではこれらの値は増加傾向を示し、直径3mm以上の腫瘍が高頻度に見られた(図1A)。また、トランス脂肪酸群ではコントロール群に比べて、肝臓重量、肝臓中のトリグリセリド・遊離脂肪酸・コレステロール含量、血清ALT値、および、血糖値が顕著に増加した(図1B)。肝臓の組織学的解析から、トランス脂肪酸群には大滴性の脂肪沈着および炎症性細胞浸潤がみられた(図1C)。従って、本トランスジェニックマウスでは、トランス脂肪酸食は脂肪肝炎の発生を強く誘導し、肝発癌を促進させることが分かった。

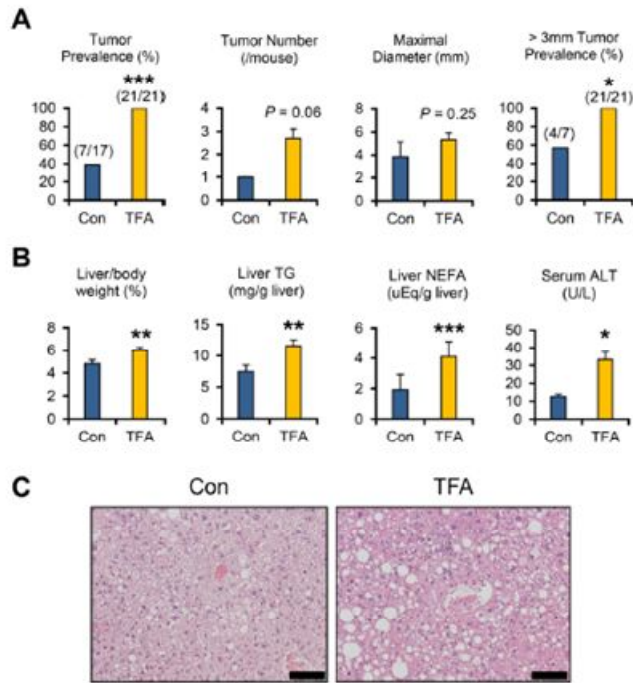


図1 .トランス脂肪酸食による肝発癌促進作用

(A) 肝腫瘍の発生頻度、発生数、最大直径、および、直径 3 mm 以上の腫瘍発生頻度

(B) 肝臓 / 体重比、肝臓トリグリセリド含量、肝臓遊離脂肪酸含量、および、血清 ALT 値

(C) 肝臓組織切片の HE 染色。スケールバー 100 μm

トランス脂肪酸食の肝発癌促進作用に PPARα 活性化は寄与しない

我々は以前、HCV コア蛋白発現トランスジェニックマウスの肝発癌に核内受容体 PPARα の持続的活性化が必須因子であることを報告した (Tanaka N et al. J Clin Invest, 2008 ; Tanaka N et al. Int J Cancer, 2008)。そこで、トランス脂肪酸食により PPARα 活性化が更に強化され、肝発癌が強く誘導された可能性を検証した。代表的な PPARα ターゲット遺伝子として *Acox1*, *Acadl*, *Acadm* などの脂肪酸代謝関連分子の発現変化を調べた結果、コントロール群とトランス脂肪酸群の間に有意な差は検出されず、トランス脂肪酸食の肝発癌促進作用に PPARα 活性化の更なる強化が寄与した可能性は否定された。

トランス脂肪酸食による肝脂質代謝への影響

トランス脂肪酸群の肝臓では、脂肪酸合成に関わるアセチル CoA カルボキシラーゼ (*Acaca*) および不飽和化酵素 (*Scd1*)、脂肪酸輸送体 (*CD36*)、コレステロール合成酵素 (*Sqle*) の遺伝子発現が亢進しており、脂肪肝形成に寄与した可能性が示唆された。

トランス脂肪酸食は Toll-like receptors および inflammasomes を介する機構により、NF-κB 活性化をもたらす

トランス脂肪酸食による肝炎の発生に関与した分子を調べた。図 2 に示したように、トランス脂肪酸群では複数種の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現増加、NF-κB の核内蓄積、Toll-like receptors 経路の活性化、インフラマソームの構成因子の発現増加ならびに活性化が顕著に生じていた。

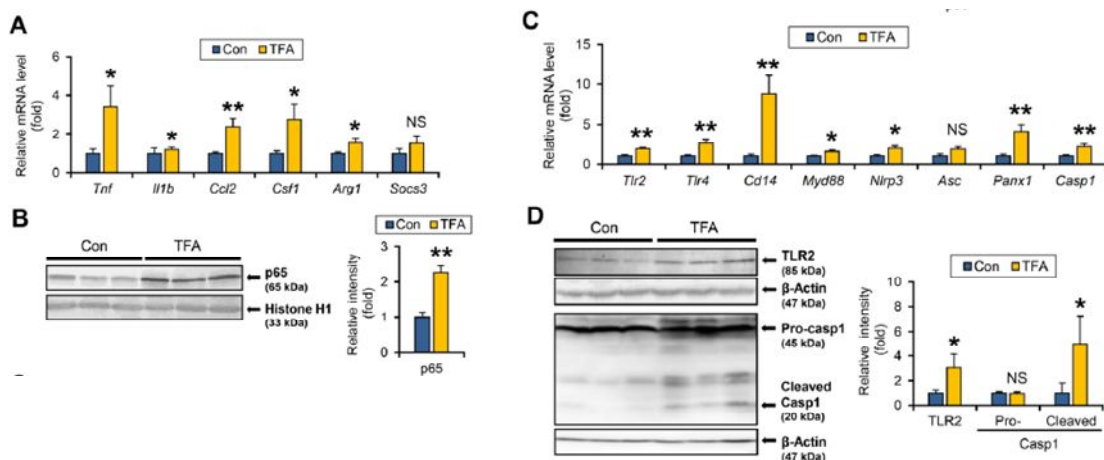


図 2 . トランス脂肪酸食による炎症関連分子への影響

(A) 炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現量、(B) NF-κB サブユニットの核内含量、(C) Toll-like receptors 関連因子およびインフラマソーム構成因子の遺伝子発現変化、(D) TLR2 およびカスパーゼ 1 のタンパク質発現変化

トランス脂肪酸食は酸化ストレス・小胞体ストレスをもたらす

過度な酸化ストレスや小胞体ストレスは DNA 損傷を引き起こし、発癌に寄与する。トランス脂肪酸群の肝臓では過酸化脂質の蓄積、Nrf2 発現増加および活性化、小胞体ストレスマーカー (Ddit3, Chop) の発現増加、p62 発現増加がみられ、酸化ストレスや小胞体ストレスが亢進していることが分かった。

トランス脂肪酸食は線維形成を促進する

トランス脂肪酸群の肝臓には線維化、ヒドロキシプロリン蓄積、線維化マーカーの上昇がみられ、繊維形成が促進していることが分かった (図 3)。

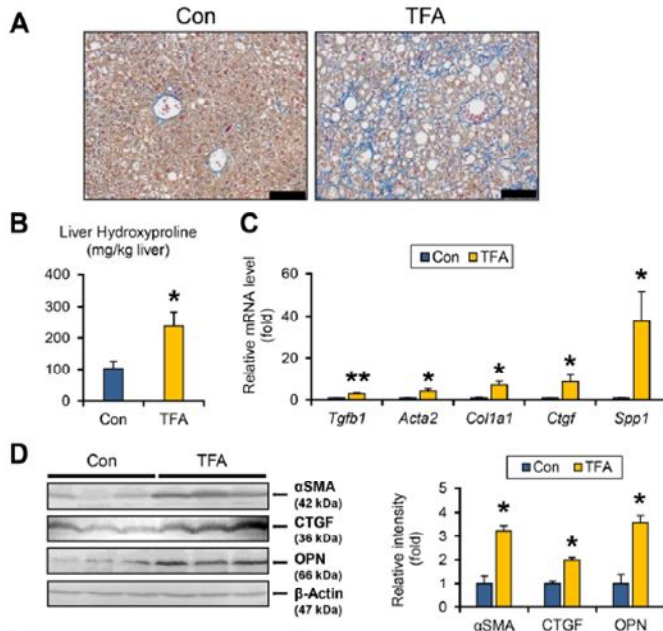


図 3 . トランス脂肪酸食による肝線維化への影響

(A) 肝臓組織切片の Azan-Mallory 染色。スケールバー 100 μ m

(B) 肝臓のヒドロキシプロリン含量

(C、D) 線維化マーカーの発現変化

トランス脂肪酸食は肝細胞増殖を促進する

トランス脂肪酸群の肝臓では、cell cycle accelerators である cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4, c-myc, pcna の発現量が顕著に増加しており、細胞増殖反応が亢進していると考えられた。また、MAP kinase の一種である ERK 1/2 のリン酸化レベルが上昇していたことから、ERK 活性化により細胞増殖が誘導された可能性が示唆された。

トランス脂肪酸食は Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を活性化する

Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の制御異常は発癌に寄与することが知られている。トランス脂肪酸群では c-myc の遺伝子発現が顕著に誘導されており、Wnt/ β -catenin 経路の活性化が示唆された。そこで、トランス脂肪酸による Wnt/ β -catenin 経路への影響を調べた結果、トランス脂肪酸群の肝臓では β -catenin の遺伝子発現レベルおよび核内蛋白レベルの顕著な増加、ならびに、 β -catenin 標的遺伝子 (Tcf1, Axin2) の発現増加が検出された (図 4 A, B) 。また、 β -catenin 陽性肝細胞の著明な増加が確認された (図 4 C) 。加えて、トランス脂肪酸群の肝臓において腫瘍部と非腫瘍部間で β -catenin 経路の活性化状態を比較したところ、腫瘍部では β -catenin や Tcf1 の発現レベルが更に上昇しており (図 4 D) 、非腫瘍肝に比べて Wnt/ β -catenin 経路がより強く活性化していることが分かった。従って、トランス脂肪酸食は Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化を引き起こし、これが肝癌発症に寄与したと考えられた。

以上をまとめると、本研究から、トランス脂肪酸食は HCV コア蛋白発現トランスジェニックマウスにおける肝発癌を促進させることが分かった。トランス脂肪酸食を与えたマウスの肝臓 (非腫瘍部) には著明な脂肪肝炎および線維化がみられた。これらの病的変化は炎症性サイトカイン・ケモカインの増加、NF- κ B 活性化、Toll-like receptors 経路の活性化、インフラマソーム活性化、過酸化脂質蓄積、NRF2 活性化、p62/Sqstm1 発現増加、ヒドロキシプロリン蓄積、繊維形成因子の誘導、cell cycle accelerators の誘導、ERK 活性化、Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化などを伴っていた。従って、トランス脂肪酸食の長期摂取によって炎症シグナル活性化、酸化ストレス増加、小胞体ストレス増加、細胞増殖亢進などが生じた結果、肝発癌が促進されたと考えられた (図 4 E、論文投稿中)。

本研究から、トランス脂肪酸を豊富に含む食事を日常的に摂取することによって、HCV 関連肝癌の発症リスクが高まる可能性が示唆された。HCV 持続感染者ではトランス脂肪酸の摂取量を制限することが肝発癌抑制に有効である可能性が期待される。

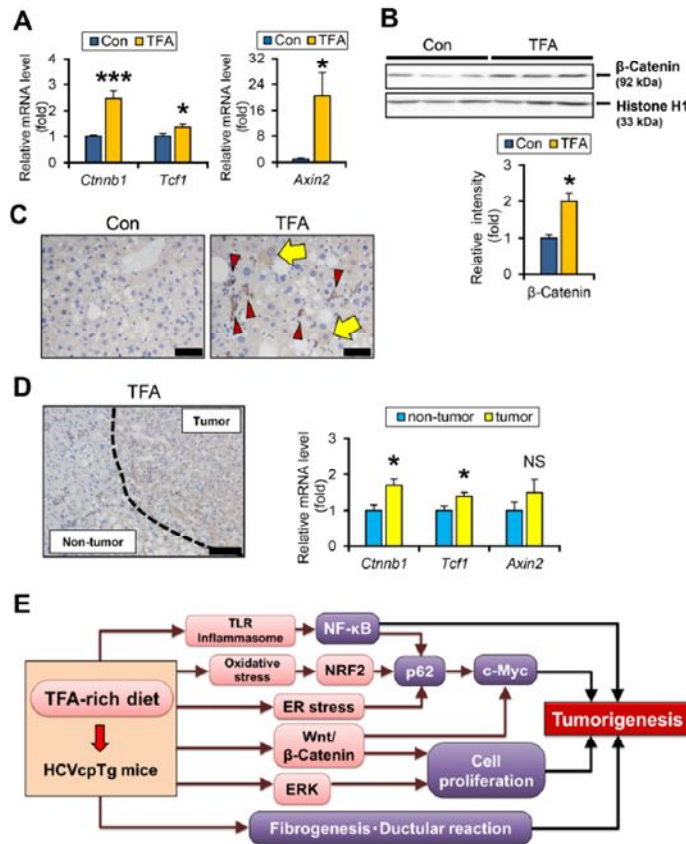


図4 . トランス脂肪酸食による Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路への影響

(A) β -catenin とターゲット遺伝子発現量

(B) β -catenin 核内含量

(C) β -catenin 免疫染色。矢印は陽性細胞

(D) β -catenin 免疫染色(左) β -catenin シグナル関連遺伝子の発現変化(右)

(E) 本研究で明らかになったトランス脂肪酸食による肝発癌促進機構

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Wang X, Tanaka N, Hu X, Kimura T, Lu Y, Jia F, Sato Y, Nakayama J, Moriya K, Koike K, Aoyama T. A high-cholesterol diet promotes steatohepatitis and liver tumorigenesis in HCV core gene transgenic mice. Arch Toxicol. 2019 in press. doi: 10.1007/s00204-019-02440-7.
2. Hu X, Tanaka N, Guo R, Lu Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR α protects against trans-fatty-acid-containing diet-induced steatohepatitis. J Nutr Biochem. 2017, 39: 77-85. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.09.015.
3. Tian Y, Yang Y, Zhang X, Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Kamijo Y, Lu Y, Moriya K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. Age-dependent PPAR α activation induces hepatic sulfatide accumulation in transgenic mice carrying the hepatitis C virus core gene. Glycoconj J. 2016, 33(6): 927-936. DOI: 10.1007/s10719-016-9703-1

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：田中 直樹

ローマ字氏名：(TANAKA, Naoki)

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80419374

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。