

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07383

研究課題名(和文) 食事中トランス脂肪酸による肝発癌促進機構の解明と予防法の開発

研究課題名(英文) Elucidating the impact of dietary trans fatty acids on hepatocarcinogenesis and developing strategies for preventing hepatocarcinogenesis

研究代表者

田中 直樹 (Tanaka, Naoki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：80419374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食事中のトランス脂肪酸と、肝臓病との関連は十分調べられていない。我々は、トランス脂肪酸置換餌・チオアセタミドをマウスに30週投与し、肝腫瘍が生じることを見出した。そのメカニズムとして、トランス脂肪酸食による肝臓での小胞体ストレスの増加、 β -cateninの核内安定化、c-Mycの活性化、が考えられた。本研究を通して、トランス脂肪酸の多い食事が肝発癌に与える影響の一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランス脂肪酸は虚血性心疾患との関連が長く取りざたされてきたが、癌や肝臓病との関連は十分調べられてこなかった。本研究を通して、トランス脂肪酸に富む食事は、チオアセタミドによる肝炎・小胞体ストレスを増大させ、肝発癌を促進させる可能性が示唆された。トランス脂肪酸摂取による肝臓への影響、特に肝発癌を促進させるメカニズムの一端が解明できたことは、肝臓病学の領域にとどまらず、社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：The association between trans fatty acid-rich diet and liver disease has not been investigated. We co-administered thioacetamide and a diet replacing most of fatty acid to trans fatty acid to mice for 30 weeks and found the emergence of liver tumors. The mechanisms considered to be an increase in hepatic endoplasmic reticulum stress by trans fatty acid-rich diet, nuclear stabilization of β -catenin, and ensuing activation of oncogene c-Myc. This study partially clarified the influence of a trans fatty acid-rich diet on hepatocarcinogenesis, and further experiments are required to verify the results obtained in this study.

研究分野：肝臓病学、栄養学、腫瘍学、実験病理学

キーワード：食事中脂質 トランス脂肪酸 肝癌 小胞体ストレス カテニン c-Myc 肝線維化 脂肪肝炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) トランス脂肪酸は、構造中にトランス型の炭素二重結合を持つ不飽和脂肪酸である。水素を添加した硬化油の製造過程で生成され、その代表的物質であるショートニングはスナック菓子等に多量に含まれている。揚げ物や電子レンジでの調理など、日常生活でもトランス脂肪酸が生成されるため、ハンバーガーやドーナツ、フライドポテトなどのファーストフードにもトランス脂肪酸が多く含まれている。トランス脂肪酸は、我が国では頻繁に食する脂肪酸といえる。

(2) 2003年、WHOはトランス脂肪酸による虚血性心疾患の発症・認知能低下のリスクを警告した。これを受け、米国では食品中のトランス脂肪酸量の Nutritional Fact への明示が義務付けられた。そして2018年6月より硬化油の使用規制が一段と強化され、現在米国ではトランス脂肪酸の食品中含量がほぼ0となっている。一方、我が国ではトランス脂肪酸の健康に与える影響は不確実とされ、またトランス脂肪酸の摂取量が基本的に少ないという理由から、規制には至っていない。

(3) トランス脂肪酸の健康に与える影響は本当に不確実なのだろうか。Wangらは30年間にわたり生活習慣と健康に関する追跡調査を実施した(JAMA Intern Med 2016)。健康・寿命に及ぼす影響が最も深刻だった栄養素は、コレステロールでも炭水化物でもなく、トランス脂肪酸であった。トランス脂肪酸摂取が2%増加すると早死リスクが16%上昇した。トランス脂肪酸は虚血性心疾患との関連が長く取りざたされてきたが、心疾患以外、特に癌や肝臓病との関連は調べられてこなかった。

(4) 我々はトランス脂肪酸の肝臓への影響を調べるために、ほとんどの脂肪酸をトランス脂肪酸に置換した餌を独自に作成し、マウスに投与した。トランス脂肪酸に富む餌は脂肪酸合成酵素を上昇、脂肪分解酵素を抑制させ、肝臓への脂肪蓄積を増加させた(Hu and Tanaka et al., J Nutr Biochem 2017)。また予備的検討として、トランス脂肪酸置換餌を肝線維化誘発剤であるチオアセタミドと共投与したところ、約半数のマウスに肝腫瘍(肝癌)が発生した。通常餌+チオアセタミド投与では肝線維化を引き起こすものの、腫瘍は生じない。よってチオアセタミドによる線維化が進行しつつある状況で、食事中的トランス脂肪酸が肝癌の発生を促進させている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

上述の結果は、食事中的大量のトランス脂肪酸が肝臓に極めて重篤な影響を与えている可能性を示唆している。そこで本研究では、以下の2点を明らかにすることを目的とした。

(1) 食事中的トランス脂肪酸は本当に肝腫瘍の発生を促進させるのか。

(2) もしそうだとしたら、そのメカニズムは何か。腸管から吸収されたトランス脂肪酸が肝臓の様々な細胞に直接作用し、肝腫瘍発生を促進させるのか。あるいは腸内細菌やその代謝物を介した作用なのか。

3. 研究の方法

(1) 我々が独自に開発したトランス脂肪酸置換餌・チオアセタミド共投与実験系を用いて、定量PCR、ウェスタンブロット、ELISAなどで以下の肝発癌促進因子を評価する： 微小炎症、線維化、細胞ストレス、アポトーシス、細胞周期、オートファジー、p62/Nrf2、Hippo/Yap、Notch/Hedgehog 経路、など。

(2) 食事中的トランス脂肪酸による腸内細菌叢の変化を、メタゲノム解析にて明らかにする。引き続いて、盲腸内容物の代謝物変化をメタボロミクスで解析する。

(3) トランス脂肪酸置換餌による肝発癌に最も強力に関与する経路を探索する。そしてその経路を抑制することで、食事中トランス脂肪酸による肝発癌促進作用を予防できるか、確認する。

4. 研究成果

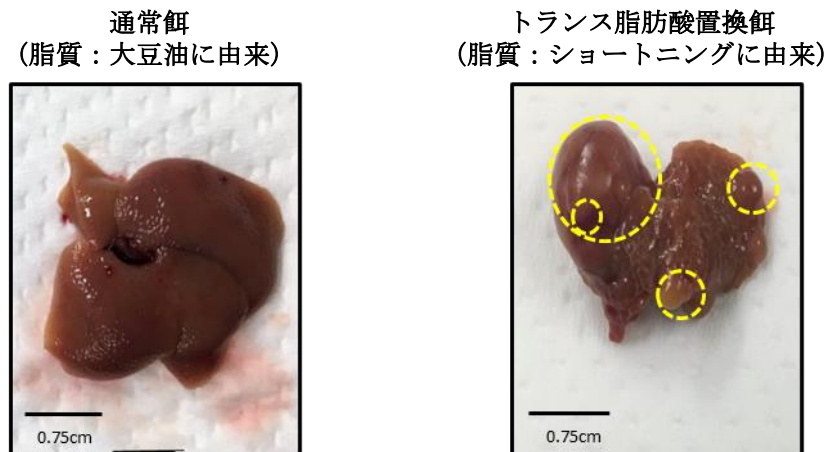
(1) トランス脂肪酸に富む餌は、チオアセタミド投与マウスでの肝腫瘍発生を促進させる

予備実験では、マウスにチオアセタミドを投与し、トランス脂肪酸置換餌を併用すると、高率に肝腫瘍が出現した。我々が独自に作成したトランス脂肪酸置換餌について、簡単に説明したい。マウスの通常餌の脂質は大豆油に由来しており、シス型の1価、2価不飽和脂肪酸が大半を占めている。この大豆油をショートニングに置き換えると、餌のカロリー量を変えずに、トランス型不飽和脂肪酸がほとんどを占める、トランス脂肪酸に富む餌が出来上がる。通常餌に単純にトランス脂肪酸を加えてしまうと、餌の総カロリーも増えてしまうため、肝臓に変化が生じて、トランス脂肪酸の影響か、カロリー過多の影響か、不明瞭となる。

本研究では、最初にこのトランス脂肪酸置換餌を用いて、チオアセタミド共投与時の肝腫瘍発生の再現性を確認することとした。通常餌・チオアセタミドを30週投与したマウスでは、肝腫瘍は全く発生しなかった。一方、カロリーが同一のトランス脂肪酸置換餌・チオアセタミドを30週投与すると、70%のマウスで肝腫瘍が出現した(図1)。顕微鏡で見ると、腫瘍は腺腫~様々な分化度の癌と判断された。またトランス脂肪酸置換餌のマウスでは、通常餌群に比べ、血清AST・ALTの有意な上昇、アルブミンの有意な低下を認め、肝細胞の傷害がより高度であることが示唆された。

図1 チオアセタミドを30週投与したマウスの肝臓

通常餌(左)では肝臓の線維化を反映して、表面の不整を認めるが、肝腫瘍は見られない。一方、トランス脂肪酸置換餌(右)では、肝臓の萎縮が著明で、肝腫瘍(点線)を認めた。



(2) トランス脂肪酸に富む餌は、チオアセタミドによる肝炎を悪化させる

肝細胞傷害の原因となる炎症は、線維化を介して、肝発癌に大きく関与している。定量PCRやウェスタンブロット法を用いて、炎症に関連する経路を調べた。トランス脂肪酸置換餌を投与すると、肝臓における炎症惹起物質(Tnf, Ccl2, Spp1)の発現が有意に増加していた。トランス脂肪酸置換餌は、Tnfなどの上流に位置する炎症制御因子であるnuclear factor kappa B、インフラマソームを活性化させた。一方、もう一つの重要な炎症制御因子であるToll-like receptor系には、ほとんど影響を与えなかった。以上より、トランス脂肪酸を多く含む食事は、肝毒性物質(ここではチオアセタミド)による肝障害を悪化させ、より強い肝炎を惹起することが判明した。

肝臓の線維化に関する遺伝子(Tgfb1, Col1a1, Ctgf)の発現には有意差を認めなかったが、星細胞活性化マーカーである α -SMAはトランス脂肪酸置換餌群で有意に増加していた。

(3) トランス脂肪酸に富む餌は、小胞体ストレス・p62・c-Mycを増加させる

細胞傷害や発癌に関与している酸化ストレスと小胞体ストレスを、マウスの肝臓を用いて測定した。酸化ストレスマーカーである過酸化脂質4-Hydroxynonenalは、トランス脂肪酸置換餌群で増加傾向であったが、酸化ストレスがかかった時に誘導されるNQO1、小胞体ストレスマーカーであるCHOPの蛋白量は、トランス脂肪酸置換餌群で著明に増加していた。小胞体ストレスは、p62-NRF2を介して、癌遺伝子c-Mycを誘導することが知られている。トランス脂肪酸置換餌を投与したマウスでは、p62・c-Mycの蛋白量が著明に増加していた。以上より、炎症、小胞体ストレス、p62、c-Mycがこの肝発癌モデルの主要因子であることが示唆された。

(4) トランス脂肪酸に富む餌は、 β -catenin の核内安定化を助長する

小胞体ストレスと c-Myc を結ぶ因子として、p62 以外では β -catenin が有名である。 β -catenin は翻訳後に核内へと移行し、c-Myc などの癌遺伝子の転写活性を増加させる。 β -catenin の細胞核内での増加、 β -catenin 遺伝子の変異は肝癌で高率に観察される。肝細胞全体、肝細胞の核内の β -catenin 発現量をウエスタンブロット法で検討したところ、トランス脂肪酸置換餌群で核内のリン酸化 β -catenin (Ser675) が著明に増加していた。リン酸化された β -catenin は分解されにくいことが知られている。小胞体ストレスにより生じる核内リン酸化 β -catenin の増加は、c-Myc などの β -catenin 下流を活性化させ、トランス脂肪酸置換餌による肝癌を促進させていると考えられた。

(5) トランス脂肪酸に富む餌を投与すると、「小胞体ストレス \rightarrow β -catenin の核内安定化 \rightarrow c-Myc の活性化」が生じる

上述の変化は、トランス脂肪酸置換餌を 30 週という長期間にわたり投与した結果であり、本当にトランス脂肪酸置換餌の肝癌促進機構をとらえているのか、という疑問が生じた。そこで、マウスにトランス脂肪酸置換餌とチオアセタミドを 10 週投与し、肝癌が見られない状況で、同様の現象が生じているか確認した。興味深いことに、小胞体ストレスの増加、核内のリン酸化 β -catenin (Ser675) の増加、c-Myc の増加は全く同じように確認されたが、p62 の増加は見られなかった。短期投与の検討により、「食事中トランス脂肪酸 \rightarrow 肝細胞での小胞体ストレス増加 \rightarrow β -catenin の核内安定化 \rightarrow c-Myc の亢進 \rightarrow 肝癌」という経路が今回の肝癌機構の本筋であることが理解できた。また現象の再現性も確認できた。

(6) トランス脂肪酸に富む餌を投与すると、腸内細菌のプロファイルが変化する

盲腸内容物における腸内細菌叢検索では、トランス脂肪酸置換餌に特有の変化が認められた。腸内細菌のプロファイル変化に伴い、肝癌に関連する代謝物が盲腸内で増加していることが期待されたが、メタボロミクスでは有意な変化は見られなかった。

(7) 小胞体ストレスを減らす薬剤、 β -catenin を阻害する薬剤は、トランス脂肪酸・チオアセタミド投与マウスでの肝腫瘍発生を抑制するか？

「食事中トランス脂肪酸 \rightarrow 肝細胞での小胞体ストレス増加 \rightarrow β -catenin の核内安定化 \rightarrow c-Myc の亢進 \rightarrow 肝癌」というメカニズムが本当に正しいか、阻害剤を用いて検証したいと考えた。つまり、今回のトランス脂肪酸置換餌による肝癌モデルに、小胞体ストレスを軽減させる分子シャペロンや β -catenin 阻害剤を共投与し、肝腫瘍発生率が低下するか、確かめる実験を行った。小胞体ストレスを軽減させる分子シャペロンとして、生体内に存在し毒性の少ないフェニル酪酸を選択したが、短鎖脂肪酸のため、生体内に投与すると速やかに分解されてしまう。半減期を伸ばし、肝臓への移行率を高めるため、フェニル酪酸をナノ粒子化し、投与することとした。6 か月以上かかる実験であったが、 β -catenin 阻害剤の共投与にて肝腫瘍の発生頻度が低下する傾向が認められた。まだ解析マウス数が少ないため、引き続き研究を遂行していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fangpin Jia, Xiao Hu, Takefumi Kimura, Naoki Tanaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Impact of Dietary Fat on the Progression of Liver Fibrosis: Lessons from Animal and Cell Studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10303 ~ 10303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Pan Diao, Fangping Jia, Xiaojing Wang, Xiao Hu, Takefumi Kimura, Takero Nakajima, Toshifumi Aoyama, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike, Naoki Tanaka	4. 巻 7(12)
2. 論文標題 Mechanisms of Steatosis-Derived Hepatocarcinogenesis: Lessons from HCV Core Gene Transgenic Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Engineering	6. 最初と最後の頁 1797-1805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長屋 匡信 (Nagaya Tadanobu) (00718033)	信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・准教授 (13601)	
研究分担者	中村 浩蔵 (Nakamura Kozo) (20345763)	信州大学・学術研究院農学系・准教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------