

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500977

研究課題名(和文)劣化脂質による胆道がん発症機構とその制御に関する検討

研究課題名(英文)Biliary carcinogenesis based upon degraded phospholipids

研究代表者

田妻 進 (Tazuma, Susumu)

広島大学・大学病院・教授

研究者番号：80201614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満などの生活習慣病と発がん(および癌死)の関連性が注目されている。本研究では変性脂質の胆道発がんへの関与を検討した。リソリン脂質は胆管上皮細胞のG2A発現を増加させるとともにアポトーシスを惹起した。さらにその変化は劣化脂肪酸の共存によりsynergisticに増強した。さらに、LPCは胆管上皮細胞に対し酸化ストレスを介して細胞老化を誘導し、SASP因子の産生により周囲の微小環境に影響を与えて発癌に寄与することが示された。以上より、肝内結石症、原発性硬化性胆管炎、膵胆管合流異常症では持続する胆道炎における胆汁脂質メディエーターの関与が胆道発がんに関与することが推察された。

研究成果の概要(英文)：In biliary diseases, biliary lysophosphatidylcholine (LPC) level is increased, LPC exhibited cytotoxicity with significant induction of apoptosis. Here, the influence of LPC on cholangiocytes was focussed in the light of cellular senescence and its contribution to carcinogenesis. Treatment of human cholangiocytes with LPC demonstrated cytotoxicity with significant ROS generation. In keeping with this change, LPC provoked oxidative DNA injury while the gene expressions of DNA repair enzyme remained unchanged. Microarray analysis identified differentially regulated genes in response to LPC, which included the components of senescence-associated secretory phenotype (SASP). Based upon these data, cholangiocyte senescence and SASP caused by LPC via induction of oxidative stress are an important pathogenic mechanism in the development of biliary tract cancer.

研究分野：Hepatobiliary diseases

キーワード：Bile Bile duct phospholipids lysolecithin apoptosis SASP hepatolithiasis

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の根源とされる肥満と発がん(および癌死)については米国の疫学研究がその関連性を示唆されていた。男性では肝臓がん、膵がん、女性では子宮がん、膵がん、腎がん、胆嚢がんが癌死リスクとして際立っていた。一方、胆道がんのリスクファクターに慢性胆管障害・炎症があり、肝内結石症、原発性硬化性胆管炎、膵胆管合流異常症が関連すると理解されていた。その背景には胆汁中 phospholipase A2(PLA2)の上昇がある。前二者では慢性炎症に基づくアラキドン酸代謝系賦活、後者では膵由来 PLA2 の増加である。PLA2 は胆汁中や生体膜の主要成分である phosphatidylcholine (PC) の 2 位のアシル鎖を加水分解して、遊離脂肪酸(FFA)と LPC を産生する。そこで我々は肝内結石症、胆道炎での胆汁 LPC 濃度上昇とその胆道組織障害への関与から LPC の脂質メディエーターとしての病的関与に注目して本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では脂質成分(特に劣化脂質)と発がんの因果関係に着目して、脂質に豊富な胆汁に曝露される胆道(胆嚢・胆管)発がんへの劣化脂質の関与を検討し、その調節による予防的治療戦略を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

研究期間は3年間として、胆道疾患患者胆汁の劣化脂質分析、劣化脂質曝露による胆道上皮細胞傷害とそのメカニズム、劣化脂質をリガンドとする脂質代謝関連遺伝子発現プロファイリングの評価、その防御機構となる生体成分の拾い上げとメカニズム、さらに食生活への介入による劣化脂質吸収抑制の有効性を検討した。臨床的には、1)胆道疾患患者胆汁をドレナージおよび経鼻内視鏡的に採取して劣化脂質分析を施行してその病的意義を検討し、2)その腸管吸収抑制介入による制御による治療的意義を検証した。基礎的検討として、3)劣化脂質曝露による胆道上皮細胞アポトーシスと、脂質分子をリガンドとする G2A などの脂質代謝関連遺伝子発現プロファイリングを評価し、4)防御機構となる生体成分の拾い上げとそのメカニズムを解析して臨床応用(摂取調節や当該薬物介入)の提案を目指した。

4. 研究成果

胆道疾患患者胆汁をドレナージおよび経鼻内視鏡的に採取して劣化脂質分析を施行してその病的意義を検討すべくサンプルの集積を遂行した。一方、基礎的検討として、劣化脂質曝露による胆道上皮細胞アポトーシスと、脂質分子をリガンドとする Gタンパク共役型受容体 G2A などの脂質代謝関連遺伝子発現プロファイリングの評価と、防御機構と

なる生体成分の拾い上げを開始した。まず、ヒト胆管癌細胞 Hucct-1、正常ヒト胆管上皮細胞に LPC 1~100 μ M、9-HODE (G2A リガンド) 0.1~10 μ M、LPC+9HODE を添加し、1) G2A 発現を Western blot、2) 細胞障害を MTT assay (細胞数カウント)、LDH assay (生存細胞機能確認)、3) アポトーシスを 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 染色による形態評価、Annexin-V/PI 二重染色によるフローサイトメトリー法、Caspase 活性 (Caspase-3, -8, -9) Assay にて評価した。その結果、リソリン脂質は胆管上皮細胞の G2A 発現を増加させるとともにアポトーシスを惹起した。さらにその変化は劣化脂肪酸の共存により synergistic に増強した。

そこで、次にヒト不死化胆管上皮細胞株 MMNK-1 に LPC を添加し、細胞増殖能、ROS 産生、脂質過酸化、8-OHdG 発現定量による酸化 DNA 傷害、DNA メチル化を評価するとともにマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。細胞老化は p16, p21 の発現と SA- β -gal 活性で評価し、SASP 因子は qPCR, cytokine assay にて遺伝子・蛋白発現を解析した。その結果、LPC は胆管上皮細胞に対し細胞障害作用を示し、抗酸化剤 N-acetylcysteine(NAC)の併用で細胞生存率は有意に改善した。さらに LPC は濃度・時間依存的に ROS 産生を誘導し、これらは NAC の併用で抑制された。また malondialdehyde の有意な増加を認めたことから、これらの酸化ストレスに伴い、8-OHdG の産生も有意に増加し、酸化 DNA 傷害が惹起されることが示唆された。さらにトータルゲノムの DNA メチル化は胆管癌細胞株である HucCT-1 と同程度まで低下していた。マイクロアレイによる遺伝子発現変化の検討では、LPC 刺激により IL-8, IL-6 をはじめとする SASP 因子の発現誘導を認めた。このため、LPC による細胞老化を評価したところ SA- β -gal 活性の有意な上昇を認め、p16, p21 の遺伝子発現も有意な発現誘導を認めた。さらに代表的な SASP 因子の発現・分泌を検討したところ、有意な誘導が認められた。

以上より、LPC は胆管上皮細胞に対し酸化ストレスを介して細胞老化を誘導し、SASP 因子の産生により周囲の微小環境に影響を与えることで発癌に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計16件)

1. Shimizu R, Kanno K, Sugiyama A, **Tazuma S**. Cholangiocyte senescence caused by lysophosphatidylcholine as a potential implication in carcinogenesis. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2015 Apr 28.

doi: 10.1002/jhbp.256. [Epub ahead of print](査読有)

2 . Miyazaki M, Ohtsuka M, Miyakawa S, Nagino M, Yamamoto M, Kokudo N, Sano K, Endo I, Unno M, Chijiwa K, Horiguchi A, Kinoshita H, Oka M, Kubota K, Sugiyama M, Uemoto S, Shimada M, Suzuki Y, Inui K, **Tazuma S**, Furuse J, Yanagisawa A, Nakanuma Y, Kijima H, Takada T. Classification of biliary tract cancers established by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery: 3(rd) English edition. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2015 Mar;22(3):181-96. doi: 10.1002/jhbp.211. Epub 2015 Feb 17. (査読有)

3 . **Tazuma S**, Kanno K, Kubota K, Tsuyuguchi T, Kamisawa T, Isayama H, Nakagohri T, Inui K; Academic Committee of the Japan Biliary Association. Report on the 2013 national cholelithiasis survey in Japan. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2015 May;22(5):392-5. (査読有)

4 . Gooijert KE, Havinga R, Wolters H, Wang R, Ling V, **Tazuma S**, Verkade HJ. The mechanism of increased biliary lipid secretion in mice with genetic inactivation of bile salt export pump. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015 Mar 1;308(5):G450-7. (査読有)

5 . Tanaka A, **Tazuma S**, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Takikawa H. Clinical profiles of patients with primary sclerosing cholangitis in the elderly. J Hepatobiliary

Pancreat Sci. 2015 Mar;22(3):230-6. (査読有)

6 . Kishikawa N, Kanno K, Sugiyama A, Yokobayashi K, Mizooka M, **Tazuma S**. Clinical evaluation of ezetimibe on bile lithogenicity in humans: Use of transnasal endoscopy for bile sampling. Hepatol Res. 2014;45(6):693-7. (査読有)

7 . Yokobayashi K, Matsushima M, Watanabe T, Fujinuma Y, **Tazuma S**. Prospective cohort study of fever incidence and risk in elderly persons living at home. BMJ Open. 2014, Jul 9;4(7):e004998.. (査読有)

8 . **Tazuma S**, Igarashi Y, Inui K, Ohara H, Tsuyuguchi T, Ryozaawa S; The BTI Therapy Research Group. Clinical efficacy of intravenous doripenem in patients with acute biliary tract infection: a multicenter, randomized, controlled trial with imipenem/cilastatin as comparator. J Gastroenterol. 2014;50(2):221-9. (査読有)

9 . Tanaka A, **Tazuma S**, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Takikawa H. Nationwide survey for primary sclerosing cholangitis and IgG4-related sclerosing cholangitis in Japan. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014;21:43-50. (査読有)

10 . Fujita K, Sugiyama A, Otoshi K, Taogoshi T, Kimura Y, Kishikawa N, Kodama M, Kanno K, Kihira K, **Tazuma S**. Partial characterization of proapoptotic action of biliary deteriorated lipids on biliary epithelial cells in pancreaticobiliary

diseases. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014,21:212-8. (査読有)

1 1 . Naito T, Mizooka M, Mitsumoto F, Kanazawa K, Torikai K, Ohno S, Morita H, Ukimura A, Mishima N, Otsuka F, Ohyama Y, Nara N, Murakami K, Mashiba K, Akazawa K, Yamamoto K, Senda S, Yamanouchi M, **Tazuma S**, Hayashi J. Diagnostic workup for fever of unknown origin: a multicenter collaborative retrospective study. BMJ Open. 2013, Dec 20;3(12):e003971 (査読有).

1 2 . **Tazuma S**, Kanno K, Sugiyama A, Kishikawa N. Nutritional factors (nutritional aspects) in biliary disorders: bile acid and lipid metabolism in gallstone diseases and pancreaticobiliary maljunction. J Gastroenterol Hepatol. 2013,;28 Suppl 4:103-7. (査読有)

1 3 . Suzuki Y, Sugiyama M, Inui K, Igarashi Y, Ohara H, **Tazuma S**, Tsuji T, Miyakawa H, Atomi Y. Management for pancreatolithiasis: a Japanese multicenter study. Pancreas. 2013,42:584-8. (査読有)

1 4 . Ohara H, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Kawa S, Kamisawa T, **Tazuma S**, Uchida K, Hirano K, Yoshida H, Nishino T, Ko SB, Mizuno N, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Nakazawa T, Nakanuma Y, Takikawa H; Research Committee of IgG4-related Diseases; Research Committee of Intractable Diseases of Liver and Biliary Tract; Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan; Japan Biliary Association. Clinical diagnostic criteria of IgG4-related

sclerosing cholangitis 2012. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2012,19:536-42. (査読有)

1 5 . Ikegami T, Hyogo H, Honda A, Miyazaki T, Tokushige K, Hashimoto E, Inui K, Matsuzaki Y, **Tazuma S**. Increased serum liver X receptor ligand oxysterols in patients with non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol. 2012,47:1257-66. (査読有)

1 6 . Ikuta T, Kanno K, Arihiro K, Matsuda S, Kishikawa N, Fujita K, **Tazuma S**. Spontaneously hypertensive rats develop pronounced hepatic steatosis induced by choline-deficient diet: Evidence for hypertension as a potential enhancer in non-alcoholic steatohepatitis. Hepatol Res. 2012,42:310-20. (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田妻 進 .
広島大学・大学病院・教授

研究者番号 : 80201614

(2)研究分担者 : なし

(3)連携研究者 : なし