

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16739

研究課題名(和文) NAFLDから発生した肝細胞癌の生物学的特徴の解明と新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Investigation of the biological characteristics of hepatocellular carcinoma arising from NAFLD and searching for novel therapeutic targets.

研究代表者

武田 真 (Takeda, Makoto)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50839157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝細胞癌株(HLE, HepG2, HuH7)のS1PR2発現をwestern blot法で確認した。S1PR2発現はHLE = HepG2 > HuH7であった。S1P添加実験ではS1PR2を発現細胞のHLEが有意に増殖し、S1PR2阻害剤：JTE013によりその増殖が抑制された。S1PR2ノックダウンではS1Pによる細胞増殖の抑制を確認した。オレイン酸(OA)添加時のJTE013添加、S1PR2KDによりOAにより誘導された増殖が抑制された。培養上清液中のS1PはS1PR2KDにより上昇した。NAFLDを背景とするHCCの増殖機構にS1P-S1PR2 pathwayが関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、メタボリックシンドロームに伴う非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)を背景とするHCCが増加してきており、その生物学的特徴の解明は急務である。本研究成果は、その生物学的特徴を脂質の観点から解明したものであり、新たな治療展開を期待できるものと考えられる。同時に、HCCだけではなく他癌種においても脂質が治療標的となる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：S1PR2 expression in three human hepatocellular carcinoma lines (HLE, HepG2, and HuH7) was confirmed by western blot analysis, and S1PR2 expression was HLE=HepG2>HuH7. S1PR2 knockdown demonstrated inhibition of cell proliferation by S1P. OA-induced proliferation was inhibited by the addition of JTE013 and S1PR2KD when oleic acid (OA) was added. S1P in the culture supernatant fluid was increased by S1PR2KD, indicating that the S1P-S1PR2 pathway is involved in the proliferation mechanism of HCCs in the background of NAFLD.

研究分野：肝胆膵悪性腫瘍

キーワード：肝細胞癌 非アルコール性脂肪肝疾患 スフィンゴシン1リン酸 S1PR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Metabolic syndromeに伴う Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) / Non-alcoholic steatohepatitis (NASH)を背景とする肝細胞癌(HCC)が増加しているが、その生物学的特徴は解明されていない。そこで、背景肝に豊富に存在する脂質が NAFLD-HCC の発癌や悪性化にどう関与するか明らかにすることを本研究の目的とした。以前の我々の遺伝子網羅的解析で、スフィンゴ脂質代謝物 sphingosine-1 phosphate (S1P)の受容体 S1PR2 (Sphingosine-1 phosphate receptor 2)が NAFLD-HCC で高発現していたことから、**“NAFLD-HCC は S1P-S1PR2 経路により細胞増殖を誘導する”**という仮説を立てた。現在まで、種々の癌での S1P-S1PR2 経路活性化の報告はあるが (FEBS J 2013) その詳細な機構および HCC と同経路の関与を示す報告はない。S1P-S1PR2 経路を介した HCC 悪性形質獲得の詳細な解明は、脂質メディエーターを癌治療標的とする新たな治療展開につながる。

2. 研究の目的

高カロリー・脂肪過多食生活下にある現在、メタボリックシンドロームと関連が強い NAFLD は増加傾向にあり、それらを背景とする HCC の発生は激増している。本研究の目的は NAFLD-HCC の生物学的特徴を解明し、その細胞増殖や遊走・浸潤能など悪性度に関連する因子を同定することで治療への臨床応用を目指すことである。

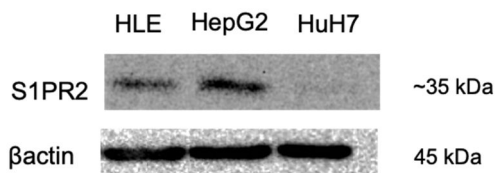
3. 研究の方法

ヒト肝細胞癌株 3 種 (HLE、HepG2、HuH7) を用いた。培養液中に、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P)、オレイン酸を添加し細胞増殖を解析した。S1PRs 阻害剤 (JTE013、FTY720)、S1PR2 ノックダウンにより、S1P、オレイン酸により誘導された細胞増殖の変化を解析。培養上清中の S1P 濃度を測定するために ELISA 法を用いた。

4. 研究成果

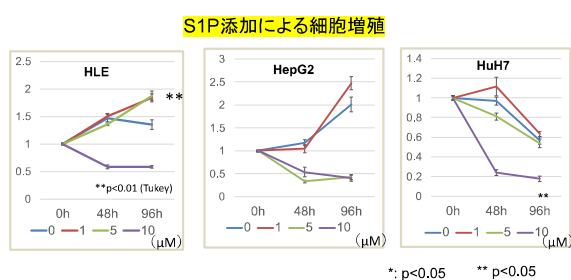
NAFLD-HCC の増殖機構に関して S1P-S1PR2 pathway に着目し研究を進めた。

(1) ヒト肝細胞癌株 3 種 (HLE、HepG2、HuH7) における S1PR1・2・3 (S1PRs) の発現。Western blot 法で S1PR2 の発現は HLE = HepG2 > HuH7 であった。



(2) S1P 添加実験、S1PRs 阻害剤添加実験

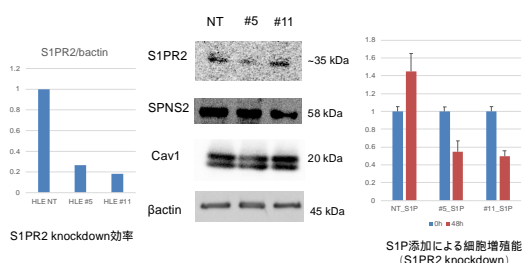
S1PR2 を発現している HLE が S1P 添加により有意に増殖した。



S1P で誘導された増殖能は S1PR2 阻害剤である JTE013 により、抑制された。一方、S1PR1/R3 の阻害剤である FTY720 では増殖能の抑制は示されなかった。

(3) S1PR2 ノックダウン実験

S1P で誘導された増殖能は S1PR2 のノックダウンにより抑制された。

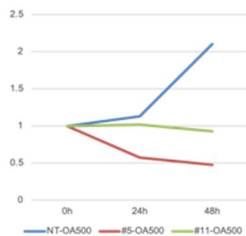


* S1P-S1PR2 pathway による細胞増殖が誘導されることが示された。

これまでに NAFLD 環境を模倣したオレイン酸(OA)添加実験で HLE、HepG2、HuH7 の中で HLE のみが細胞増殖を示すことを報告した。オレイン酸添加により細胞内で S1P 産生が誘導され、autocrine により S1P-S1PR2 pathway により細胞増殖が誘導されるという仮説をたてた。

(4) オレイン酸添加実験

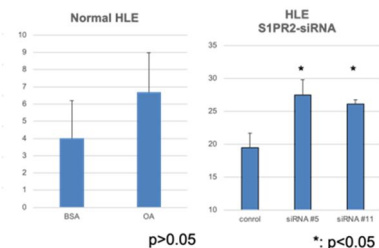
HLE においてオレイン酸(OA)添加により誘導された細胞増殖、S1PR2 阻害剤添加(JTE013)、S1PR2 ノックダウンによりその増殖が抑制された。



オレイン酸添加による細胞増殖能 (S1PR2 knockdown)

(5) 培養上清中の S1P 濃度測定 (ELISA 法)

OA 添加培養上清液中の S1P を ELISA 法で測定したところ、S1P 濃度は S1PR2 ノックダウンにより有意に上昇した。



オレイン酸含有培地におけるS1P濃度(培養上清)

* これまでの研究成果では NAFLD を背景とする HCC は豊富に存在するオレイン酸から S1P を産生し、S1P-S1PR2 pathway により細胞増殖を誘導していることが示された。脂質メディエーターによる増殖機構の解明により、NAFLD を背景とする HCC のみならず、脂質メディエーターが他癌種において治療標的となり得る可能性が示唆されたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 武田真 |
| 2. 発表標題 Significance of S1P-S1PR2 pathway in hepatocellular carcinoma from NAFLD |
| 3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 武田真 |
| 2. 発表標題 Caveolin-1 expression and S1P-S1PR2 pathway contribute cell proliferation in hepatocellular carcinoma from NAFLD |
| 3. 学会等名 日本癌学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|