

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17395

研究課題名（和文）腸内細菌由来物質である短鎖脂肪酸/GPR41を用いた新規肝細胞癌治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapy for hepatocellular carcinoma using short-chain fatty acids/GPR41 derived from intestinal bacteria

研究代表者

西川 雄大（Nishikawa, Yudai）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・医員

研究者番号：30835773

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）：本研究の目的は短鎖脂肪酸/GPR41のシグナル伝達による抗腫瘍効果の分子メカニズムを解明することである。肝癌培養細胞であるHepG2細胞に、各種短鎖脂肪酸を添加して、上清のLD濃度を測定した。その結果、酪酸ナトリウムで有意な上昇がみられた。また、cleaved caspase3の有意な上昇は、プロピオン酸ナトリウム、酪酸ナトリウムで確認出来た。さらに、酪酸ナトリウムの添加でp38、JNKのリン酸化の有意な上昇が確認出来た。以上の結果から、酪酸ナトリウムによるアポトーシスはMAPKinase経路を介して誘導されることが推定出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢より産生され、体内に生理的に存在する短鎖脂肪酸が、肝癌培養細胞において抗腫瘍効果を発揮し、そのアポトーシス作用はMAPKinase経路を介して誘導されることが示唆された。これより腸内細菌叢への介入が肝細胞癌に対する新規治療法の一つとなる可能性を考えた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism of the antitumor effect of short-chain fatty acids/GPR41 signaling. HepG2 cells, cultured hepatocellular carcinoma cells, were treated with various short-chain fatty acids, and LD concentrations in the supernatant were measured. The results showed that sodium butyrate significantly increased the LD levels in the supernatant. Significant increases in levels of cleaved caspase 3 were also observed with sodium propionate and sodium butyrate. In addition, significant increases in p38 and JNK phosphorylation were observed with sodium butyrate. These results suggest that sodium butyrate induces apoptosis via the MAPKinase pathway.

研究分野：消化器内科

キーワード：短鎖脂肪酸 プロピオン酸 酪酸 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には、人体を構成する 37 兆個の体細胞数をはるかに凌ぐ、100 兆個にも及ぶ腸内細菌が息をし腸内細菌叢を形成する。近年、脳を介さない全身の各臓器間ネットワークの存在が注目されている。腸内細菌叢と全身の細胞間コミュニケーションの手段の一つに、短鎖脂肪酸とその受容体である GPR41 が知られている。短鎖脂肪酸は、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの炭素数 6 以下の脂肪酸であり、難消化性成分である多糖類から腸内細菌による分解・発酵で生じる。GPR41 は脂肪酸受容体ファミリーに属する 7 回膜貫通型 G 蛋白共役受容体で、2003 年に短鎖脂肪酸によって活性化される受容体として同定された。リガンドの活性強度はプロピオン酸 > 酪酸 > 酢酸の順である。GPR41 は主に交感神経節に存在し、摂食時に腸内細菌叢より産生される短鎖脂肪酸を介して交感神経を活性化し代謝を促進することで、体内エネルギーの恒常性維持に関与していることが報告された (Kimura.et al. *PNAS* 2011)。

近年、腸内細菌叢の構成の違いでプラチナ系抗癌剤の効果に差があること、肥満による腸内細菌叢の偏移で肝細胞癌の発症が促進されること (Yoshimoto.et al. *Nature* 2013)、が報告されている。我々の研究グループはこの原因が、「腸内細菌叢の偏移による短鎖脂肪酸濃度の違いによる GPR41 の活性度の違いである」という仮説のもと、ヒト肝細胞癌における GPR41 を介するアポトーシス作用を検討した。そこで我々は、肝細胞癌培養細胞である HepG2 を用いて代表的な抗癌剤である cisplatin によるアポトーシス誘導作用を短鎖脂肪酸であるプロピオン酸が有意に増強することを、FACS 分析および caspase-3 タンパク質の断片化/活性化効果で確認し、ヌードマウスを使用した xenograft モデルでの腫瘍増殖抑制効果で証明し報告した (Kobayashi.et al. *Oncotarget* 2018)。さらに、このアポトーシス増強機序の一つが、プロピオン酸/GPR41 を介する HDAC 阻害作用による TNF- α の発現上昇であることを解明し報告した。しかし、それ以外の分子メカニズムは解明出来ておらず、更なる短鎖脂肪酸のアポトーシス誘導機序の解明が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は短鎖脂肪酸/GPR41 のシグナル伝達による抗腫瘍効果の分子メカニズムを解明することである。生理的に存在する短鎖脂肪酸のなかで、特に抗腫瘍に關与する短鎖脂肪酸を検討し、それにより GPR41 のリガンドである短鎖脂肪酸濃度は腸内細菌叢の偏移により変動するため、腸内細菌叢への介入による肝細胞癌に対する新規治療法という新たな癌治療戦略の確立の可能性を検討することを目標とするものである。

3. 研究の方法

(1) HepG2 細胞に短鎖脂肪酸を添加し、上清の LD 濃度を測定する。

コンフルエントに培養した、HepG2 細胞に短鎖脂肪酸である、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酪酸ナトリウムを 0.5, 1.0, 2.5 mM の濃度で添加し、48 時間後の上清の LD 濃度を測定する。LD は細胞傷害マーカーであり、アポトーシスの指標として使用する。また LD は当院検査部の協力のもと、測定した。

(2) HepG2 細胞に短鎖脂肪酸を添加し、48 時間後の断片化/活性化 caspase3 を測定する。

(1)と同様に、各種短鎖脂肪酸で刺激後、48 時間後の細胞から蛋白を抽出し、アポトーシスの指標である、断片化/活性化 caspase3 を、ウエスタンブロッティング法を用いて調べる。

(3) 短鎖脂肪酸によるアポトーシス誘導の分子機構の解明。

上記(1),(2)で得られた結果から、最適な短鎖脂肪酸とその濃度で、アポトーシス誘導に關与すると考えられる、分子機序を調べる。

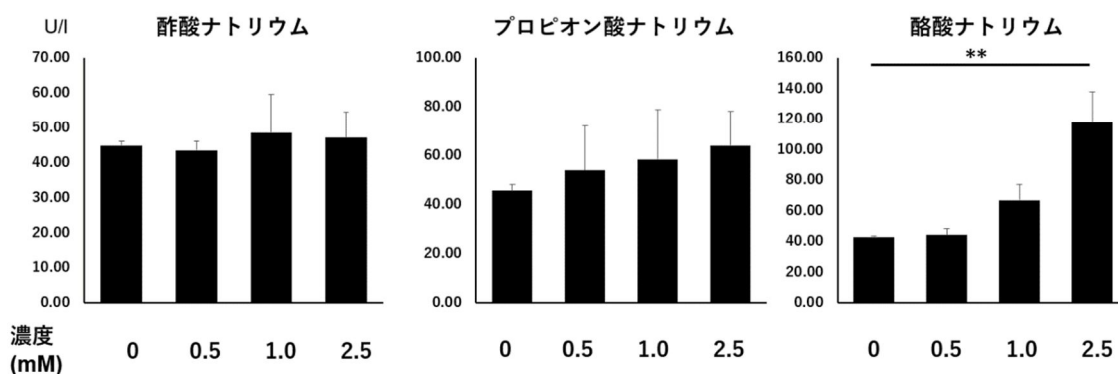
4. 研究成果

(1) HepG2 細胞に短鎖脂肪酸を添加し, 上清の LD 濃度を測定する.

酢酸ナトリウム, プロピオン酸ナトリウムでは, コントロール群と比較しての有意な LD の上昇は見られなかったが, 酪酸ナトリウムでは, 2.5 mM で有意な LD の上昇が確認された. コントロール群と比較して約 3 倍の LD の上昇が確認された (Fig.1).

Fig. 1

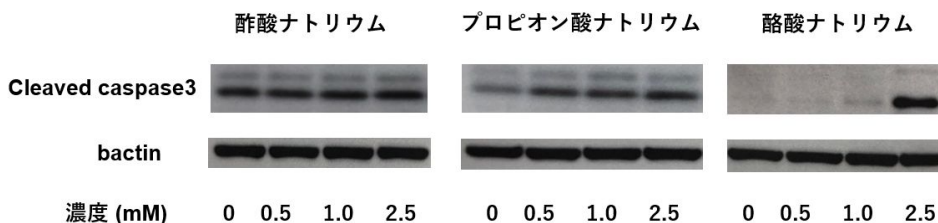
HepG2細胞に種々の短鎖脂肪酸を添加し,48時間後の上清のLD濃度



(2) HepG2 細胞に短鎖脂肪酸を添加し, 48 時間後の断片化/活性化 caspase3 を測定する. 次に, (1)の条件下での, アポトーシス誘導の指標である, 断片化/活性化 caspase3 を, ウェスタンブロッティングを用いて確認した. 酢酸ナトリウムでは断片化/活性化 caspase3 の有意な上昇は見られなかった. プロピオン酸ナトリウムでは 0.5 mM でもコントロールと比して, 有意な上昇がみられた. 酪酸ナトリウムでは, 2.5 mM で有意な上昇がみられた. 種々の短鎖脂肪酸で(1)の LD と概ね相関した変動がみられた (Fig.2).

Fig. 2

HepG2細胞に種々の短鎖脂肪酸添加48時間後の断片化/活性化caspase3

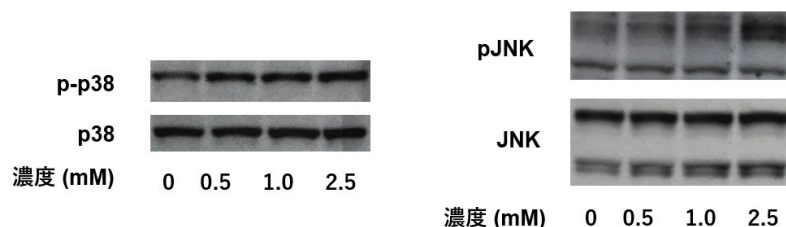


(3) 短鎖脂肪酸によるアポトーシス誘導の分子機構の解明.

次に, (2)の結果より, 酪酸ナトリウム 2.5 mM を用いて, MAPKinase である, p38 と JNK のリン酸化を検討した. p38 のリン酸化は酪酸ナトリウムでは 0.5 mM でコントロールと比して有意な上昇がみられ. JNK のリン酸化も 1.0, 2.5 mM で有意な上昇がみられた. 以上の結果から, MAPKinase の経路を介するアポトーシス誘導の経路が推定された (Fig.3).

Fig. 3

HepG2細胞に酪酸ナトリウムを添加48時間後のp-p38/p38, pJNK/JNK



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------