

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462085

研究課題名(和文) 脂肪肝を背景とする肝細胞癌の発癌および悪性形質獲得における遊離脂肪酸調節の関与

研究課題名(英文) Effects of free fatty acid on malignant potential of hepatocellular carcinoma derived from fatty liver

研究代表者

坂口 孝宣 (Sakaguchi, Takanori)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70313955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタボリックシンドロームと関係する脂肪肝から発生する肝細胞癌は、糖分から過剰に産生される脂肪酸パルミチン酸(PA)による小胞体(ER)ストレスを回避すべく、PAに炭素を2つ伸長する酵素Elovl-6を高発現させてERストレスを回避して生存しやすい環境を作っていることが判明した。この結果は、PAやElovl-6が脂肪肝由来肝細胞癌の治療標的となることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found the following facts: 1) hepatocellular carcinoma (HCC) derived from metabolic syndrome-related fatty liver express high amount of the enzyme Elovl-6. 2) Elovl-6 converts palmitic acid, a strong endoplasmic reticulum stressor, to harmless stearic acid. 3) HCC can survive such stressful condition via high Elovl-6 expression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、Metabolic syndrome 関連疾患として脂肪肝が注目されるようになった。注目すべきは、大量飲酒のない脂肪肝、いわゆる Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)、を持つ患者から発生する肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) が急激に増加している事実である。

よって、HCC の発癌・進展に関連する脂肪酸合成・代謝経路を明らかにすることは NAFLD 由来肝細胞癌の予防、治療に貢献する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NAFLD を背景とした HCC の発癌や進展における脂肪酸合成・代謝経路の関与を明らかにすることである。

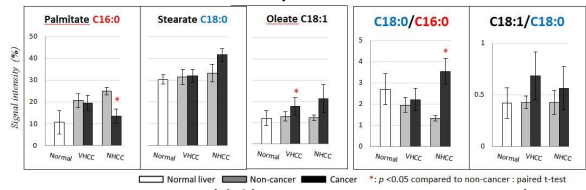
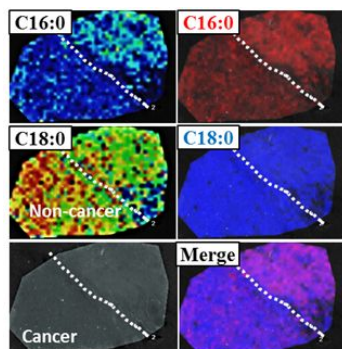
特に、我々は、癌部・非癌部での脂質量の差を同一視野で可視化できる質量顕微鏡解析法をもとに、HCC に特徴的な脂質およびその責任酵素の target を絞る、それらを細胞株実験で検証する、という手法を用いて、上記目的を達成しようと目指した。

3. 研究の方法

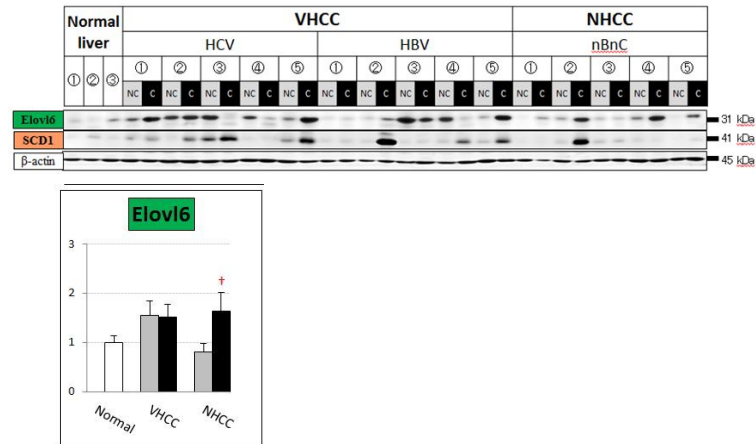
- ・組織採取：本学倫理委員会承認のもと、癌部・非癌部を含んだ肝細胞癌の手術摘出標本を採取。解析までは液体窒素にて保存。
- ・質量顕微鏡解析：組織薄片を作成、質量分析装置 (QSTAR Elite: Applied Biosystems, Ultraflex II: Bruker Daltonics) を用いて質量顕微鏡法により解析。
- ・責任酵素発現解析：癌部・非癌部に差のある脂質、責任酵素を同定。同酵素の mRNA、蛋白質の発現を解析。
- ・肝細胞癌株実験：肝細胞癌株 HpG2, Huh7 を用い、責任酵素遺伝子の siRNA knockdown が細胞増殖・アポトーシスへ与える影響を調べた。

4. 研究成果

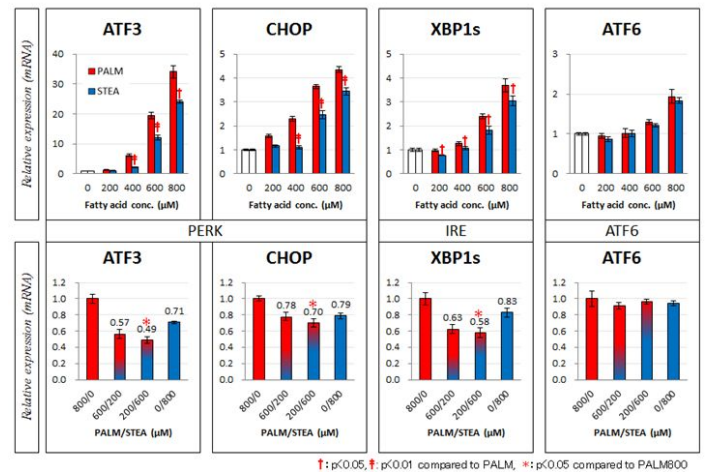
1) 質量顕微鏡による脂肪酸分布の検討では、ウイルス肝炎由来 HCC 検体の癌部非癌部間で palmitic acid (PA, C16:0、炭素原子 16 個の飽和脂肪酸) や stearic acid (SA, C18:0) の量に差を認めなかったが、NAFLD-HCC 癌部では非癌部に比べて PA が有意に少なかった。



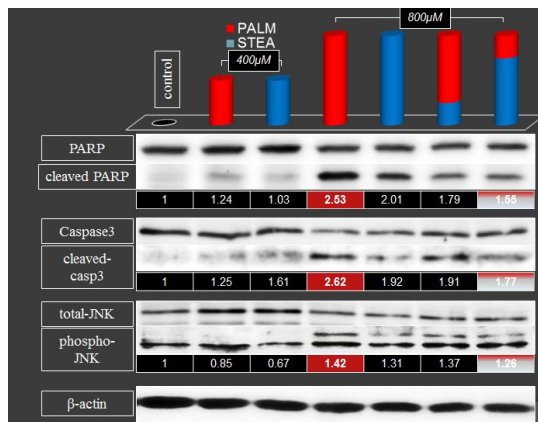
2) NAFLD-HCC 検体では、PA から SA へ炭素を伸長する酵素 Elovl6 の蛋白が癌部で増加していた。



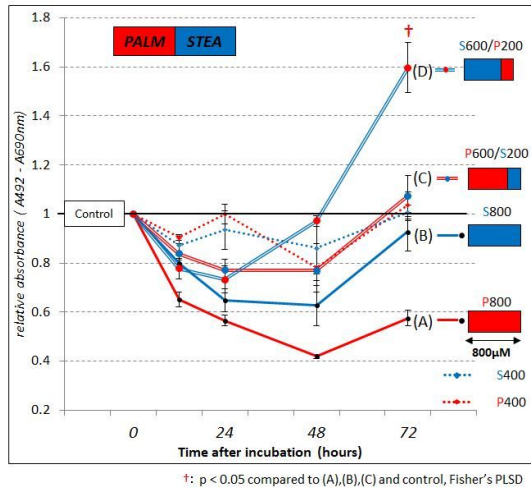
3) 小胞体 (ER) stressor である PA の細胞培養液添加刺激ではアポトーシス関連遺伝子及び蛋白である ATF3, CHOP mRNA、cleaved caspase-3 蛋白が増加した。



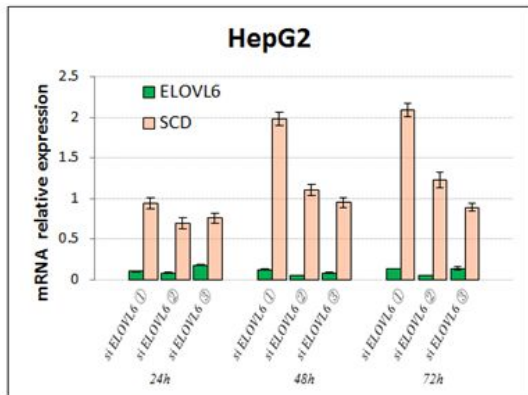
†: p<0.05, ‡: p<0.01 compared to PALM, *: p<0.05 compared to PALM800



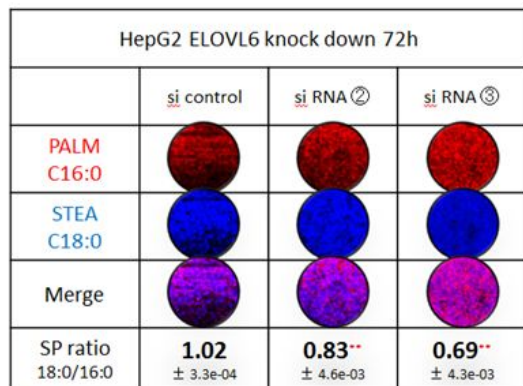
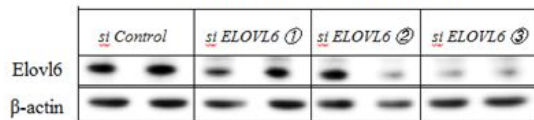
4) 培養液中高濃度 PA、SA の存在は、細胞増殖能低下をもたらし、PA、SA 混合状態では、PA/SA 比が低い方が増殖能が高かった。



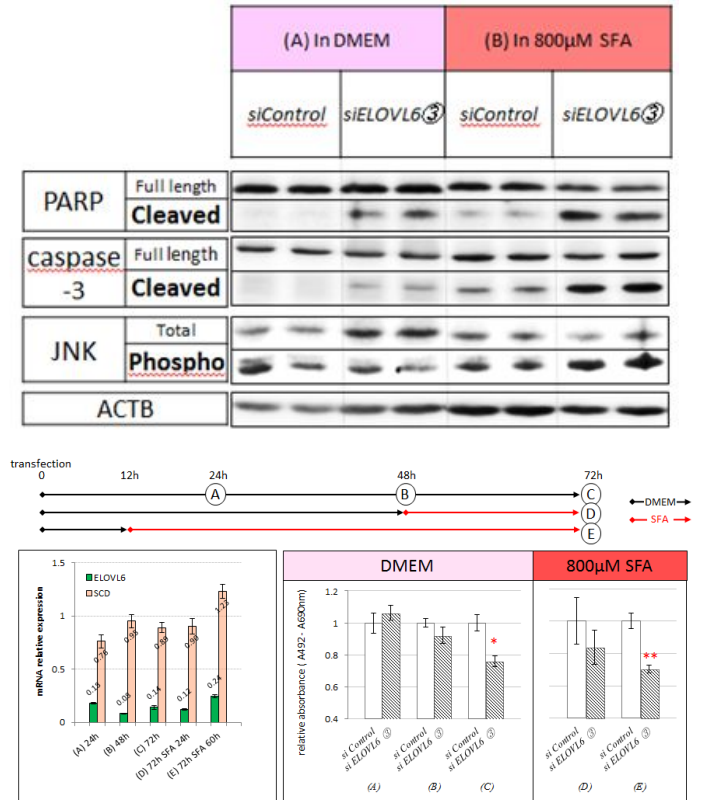
5) Elov1-6 の siRNA による knockdown は 3 clone を用意、うち、No. 3 が Elov1-6 蛋白の有効な減少、通常培養状態での細胞内 PA 増加、SA 減少 (すなわち、PA/SA 比増加) をもたらした。以下の実験は clone No.3 を使用した。



Western blotting HepG2 at 72 hours after transfection



6) 培養液中 PA 非存在下での Elov16 knockdown は ER stress をおこし、更に PA:SA=600:200 の状況では更に ER stress を増強させ、細胞増殖能を低下させた。



以上の結果より、我々は以下の結論を導き出した。

解糖系で生じる物質から最初に産生される脂肪酸 PA は強力な ER stressor である。脂肪新生の亢進した NAFLD 状態で発生した HCC は、PA による ER stress を回避するため、Elov16 を用いて過剰な PA を SA に変換し、適切な PA/SA 比に調節し、ER stress を弱めている、と考えられる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)
現在、論文投稿準備中

〔学会発表〕(計3件)

・柴崎泰、坂口孝宣、木内亮太、武田真、平出貴乗、森田剛文、ら：nonB nonC 肝細胞癌における飽和脂肪酸組成変化 第114回日本外科学会定期学術集会 2014

・柴崎泰、坂口孝宣、木内亮太、武田真、平出貴乗、森田剛文、ら：NBNC 肝細胞癌における飽和脂肪酸代謝 第56回日本消化器病学会大会(JDDW2014) 2014

・柴崎泰、坂口孝宣、木内亮太、武田真、平出貴乗、森田剛文、ら：nonB nonC 肝細胞癌における飽和脂肪酸組成変化 第115回日本外科学会定期学術集会 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕
ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂口 孝宣 (SAKAGUCHI TAKANORI)
浜松医科大学・医学部・附属病院・講師
研究者番号：70313955

(2)研究分担者

森田 剛文 (MORITA YOSHIFUMI)
浜松医科大学・医学部・附属病院・助教
研究者番号：60464129

(3)連携研究者

なし