

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750045

研究課題名(和文)肥満に伴う肝発癌に寄与する脂肪酸組成の同定とその機序の解明

研究課題名(英文) Identification of fatty acid composition in diet related to the liver carcinogenesis.

研究代表者

三宅 映己 (Miyake, Teruki)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80573659

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)：各種脂肪酸が肝発癌に与える影響を解析するために、トランス脂肪酸、オレイン酸、パルミチン酸高含有高脂肪食を用いてマウスを飼育し、脂質代謝の観点から検討を行った。高トランス脂肪酸食群は、他の脂肪酸食群に比べ肝臓内での脂肪量の増加がみられ、脂肪合成に関与する因子や、蓄積に関与する因子の増加がみられた。また、脂肪酸代謝と酸化ストレス産生に関与するミトコンドリアの酸化、ペルオキシゾームの酸化、小胞体の酸化に関与する因子の測定を行ったところ、酸化に関与する因子において増加がみられ、これらの因子が肝発癌に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of fatty acid composition in diet on carcinogenesis in the liver, we analyzed the lipid metabolism in obese mice induced by high fat diet contained high trans fatty acid, oleic acid, or palmitic acid. High trans fatty acid diet-fed mice exhibited increased amount of triglyceride in the liver compared with other groups. In addition, the expression levels of genes related to fatty acid synthesis and fat storage were increased in the liver from high trans fatty acid-fed mice. Moreover, the gene associated with α -oxidation in the endoplasmic reticulum was also increased. These results indicate that composition of fatty acid in diet may alter the fatty acid metabolism and induce carcinoma in the liver.

研究分野：代謝学

キーワード：トランス脂肪酸 肝臓癌

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化と共に急増している生活習慣病の発症には、様々な原因が報告されている。その最も重要な因子の一つとして食習慣が挙げられる。脂肪の過剰摂取は、エネルギー源として直接脂肪を蓄積するだけでなく、脂肪毒性による肝臓や膵臓での細胞障害や末梢組織でのインスリン抵抗性を誘導する。さらに脂肪酸組成の違いは、代謝や免疫能に影響を与える。高脂肪食誘導肥満マウスでは、長期間の飼育により、高率に肝臓での発癌が確認でき、高脂肪食摂取が発癌に関与することが確認された。さらに、高脂肪食の脂肪酸組成を調整したトランス脂肪酸、パルミチン酸、オレイン酸高含有高脂肪食をそれぞれマウスに給餌した結果、トランス脂肪酸高含有食で最も高率に発癌することが確認できた。しかしながら、高トランス脂肪酸食により誘導された発癌メカニズムについての検討は十分ではなく、発癌に関与する key molecule はわかっていない。トランス脂肪酸の肝臓での発癌メカニズムを解明することは、急増している脂肪性肝疾患からの発癌だけでなく、脂肪の過剰摂取が関与する発癌に対する有効な治療法、発癌予防につながる可能性があり、脂肪の加工食品を使用する国々において重要である。

2. 研究の目的

本研究ではトランス脂肪酸により誘導された肝臓での発癌メカニズムを、高脂肪食誘導肥満マウスモデルと、肝細胞癌株を用いて検討し、日常生活で使用するトランス脂肪酸の安全性を検証するための足がかりとする。

- (1) トランス脂肪酸がアディポカイン、サイトカイン、酸化ストレス産生に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) トランス脂肪酸が肝代謝へ及ぼす影響を明らかにする。
- (3) 肝発癌を誘導するメカニズム (key molecule) を明らかにする。

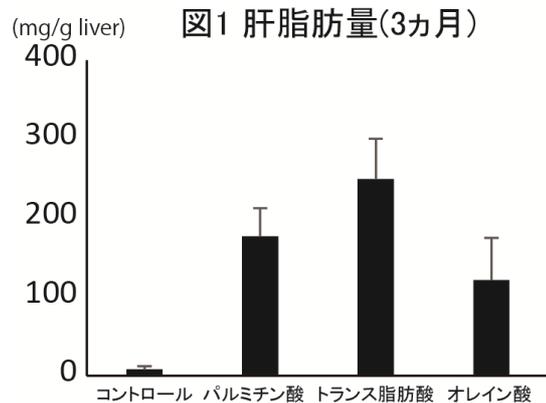
3. 研究の方法

- (1) 各種脂肪酸高含有高脂肪食と通常食でマウスを飼育し、各群のマウスの血清、肝臓を経時的に採取する。
- (2) 各群の血清を用いて肝機能検査、サイトカイン、酸化ストレスの測定を行う。
- (3) 各群の肝臓を用いて、脂肪量の定量、組織の確認を行う。脂質代謝関連因子、アディポカイン、サイトカインを RT-PCR、Western blot を用いて測定する。酸化ストレスマーカーを、免疫染色、ELISA を用いて測定を行う。
- (4) マウスの肝臓で行った実験で得られた結果が脂肪酸の直接的な影響であるかどうかを検証するため、肝細胞株を用いて実験を行う。トランス脂肪酸(エライジン

酸)、パルミチン酸、オレイン酸を肝細胞株に添加し、肝臓を用いて得られた結果をもとに、トランス脂肪酸食が影響を及ぼした可能性のある因子 RT-PCR、Western blot を用いて測定する。

4. 研究成果

(1) マウスの体重、肝内脂肪量、血液検査
各種脂肪酸高脂肪食開始後 3 ヶ月で高脂肪食を与えたマウスはコントロールマウスに対し有意に体重の増加がみられた。各脂肪酸群の体重変化は、ほぼ同等であった。肝臓内での脂肪量を確認するため、中性脂肪を抽出し測定したところ、高トランス高含有高脂肪食において増加がみられた(図 1)。



血液検査では、脂質代謝マーカーはほぼ同等であったが、高トランス脂肪酸含有食群で肝機能酵素の上昇がみられた。

(2) 肝臓内の脂質合成・代謝

トランス脂肪酸高含有高脂肪食群での脂肪肝悪化の原因検索のため、3 ヶ月のマウスの肝臓を用い、RT-PCR で脂肪酸の取り込み、合成、蓄積に関与する因子の測定を行った。脂肪酸の取り込みにおいては、CD36 の増加がみられた。また、脂肪合成に関与する FAS の増加、蓄積に関与する GPAT-1 の上昇がみられた。

更にこれらの変化がトランス脂肪酸の直接的な作用であるかどうかを確認するために、肝細胞株にエライジン酸、パルミチン酸、オレイン酸を直接添加し、トランス脂肪酸高含有高脂肪食で飼育したマウスの肝臓で確認された因子を RT-PCR で測定を行った。その結果、FAS の上昇と、GPAT-1 の上昇が確認された。さらに、二つの因子を Western blot を用いてタンパクの発現量を測定したところ、GPAT-1 の上昇がみられた。

次に、肝臓内の脂肪酸代謝、ミトコンドリアの酸化、ペルオキシゾームの酸化、小胞体の酸化に関わる因子の測定を行った。酸化に関与する因子においては各種高脂肪酸群間で差はみられなかったが、酸化に関

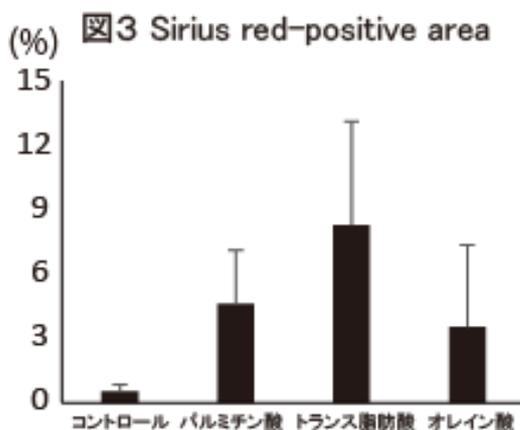
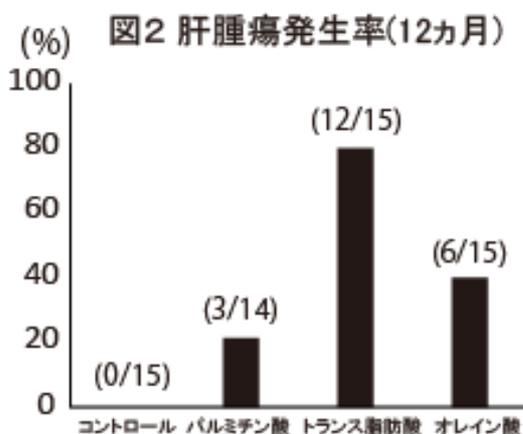
わる因子において有意な増加がみられた。アディポカイン、サイトカインは明らかな差がみられなかった。

(3) 肝臓内の酸化ストレス

肝臓内の酸化ストレスを確認するために、肝臓を用いて 8-OHdG の免疫染色と、肝臓を破碎し酸化ストレスマーカーである HNE の測定を行った。その結果、免疫染色ではトランス脂肪酸高含有高脂肪食群で、8-OHdG の増加と肝臓内の HNE の産生量の亢進がみられた。

(4) 肝組織の評価

高脂肪食開始後 12 ヶ月での肝組織の評価を行った。トランス脂肪酸高含有高脂肪食群では、肝臓内の腫瘍性病変の出現率が高いだけでなく(図 2)、定量化した線維化の程度(図 3)、NAS score の増悪がみられた。



4. 今後の展望

トランス脂肪酸が影響を及ぼす可能性のあるいくつかの key factor が絞り込まれている。今後は、これらの key factor の上流にある因子や、これらをブロックすることで脂肪肝を抑制することができるか、さらには線維化や発癌を抑制することができるか研究を行っていきたい。また、食事に対する介入へ発展させ、脂肪酸組成の組み合わせをにより、現在問題となっている非アルコール性脂肪性肝疾患の病態の改善に取り組みたい。

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 8 件)

Association between *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. *J Gastroenterol*. 2014 (in press). 査読あり

Diminished immune response to vaccinations in obesity: role of myeloid-derived suppressor and other myeloid cells. Chen S, Akbar SM, Miyake T, Abe M, Al-Mahtab M, Furukawa S, Bunzo M, Hiasa Y, Onji M. *Obes Res Clin Pract*. 2015;9:35-44.doi:10.1016/j.orcp.2013.12.006. 査読あり

Nonalcoholic fatty liver disease: portal hypertension due to outflow block in patients without cirrhosis. Hirooka M, Koizumi Y, Miyake T, Ochi H, Tokumoto Y, Tada F, Matsuura B, Abe M, Hiasa Y. *Radiology*. 2015;274:597-604. doi:10.1148/radiol.14132952. 査読あり

Short sleep duration reduces the risk of nonalcoholic fatty liver disease onset in men: a community-based longitudinal cohort study. Miyake T, Kumagi T, Furukawa S, Hirooka M, Kawasaki K, Koizumi M, Todo Y, Yamamoto S, Tokumoto Y, Ikeda Y, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y. *J Gastroenterol*. 2015;50:583-9.doi:10.1007/s00535-014-0989-0. 査読あり

Significance of exercise in nonalcoholic fatty liver disease in men: a community-based large cross-sectional study. Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Furukawa S, Kawasaki K, Koizumi M, Todo Y, Yamamoto S, Nuno H, Tokumoto Y, Ikeda Y, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y. *J Gastroenterol*. 2015;50:230-7.doi:10.1007/s00535-014-0959-6. 査読あり

Hyperuricemia is a risk factor for the onset of impaired fasting glucose in men with a high plasma glucose level: a community-based study. Miyake T, Kumagi T, Furukawa S, Hirooka M, Kawasaki K, Koizumi M, Todo Y, Yamamoto S, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y. *PLoS One*.

2014;9:e107882.doi:10.1371/journal.pone.0107882. 査読あり

Association between subclinical hypothyroidism and diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. Furukawa S, Yamamoto S, Todo Y, Maruyama K, Miyake T, Ueda T, Niiya T, Senba T, Torisu M, Kumagi T, Miyauchi S, Sakai T, Minami H, Miyaoka H, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M, Tanigawa T. *Endocr J*. 2014;61(10):1011-8. 査読あり

非アルコール性脂肪性肝疾患発症において BMI は有効な予測因子である。三宅映己, 日浅陽一. *消化器内科* 58 巻: Page630-633, 2014. 査読なし.

〔学会発表〕(計 8 件)

Yamamoto Y, Utsunomiya H, Miyake T, Kawasaki K, Nunoi H, Mori K, Ikeda Y, Hiasa Y. Branched-chain amino acids improve intestinal malabsorption of dietary long-chain fatty acids and preserve intestinal fatty acid transporters in liver cirrhosis. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2014.11.7-11., Boston,USA)

Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein as a predictor of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2014.11.7-11., Boston,USA)

三宅映己,熊木天児,藤堂裕彦,山本 晋,古川慎哉,新谷哲司,上田晃久,宮内省蔵,南 尚佳,酒井武則,宮岡弘明,谷口嘉康,恩地森一,日浅陽一,松浦文. 男性の短時間睡眠は NAFLD 発症に影響を及ぼす. 第 52 回日本糖尿病学会中国四国地方会総会. (2014.10.24-25.,リーガロイヤルホテル広島(広島県広島市))

三宅映己,藤堂裕彦,山本 晋,古川慎哉,新谷哲司,上田晃久,宮内省蔵,南 尚佳,酒井武則,宮岡弘明,谷口嘉康,恩地森一,松浦文三,日浅陽一. 検診受診者を対象とした生活習慣が非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)へ及ぼす影響の検討. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会(2014.5.22-24.,大阪国際会議場(大阪府大阪市))

Koizumi Y, Hirooka M, Ochi H, Tada F,

Miyake T, Tokumoto Y, Hiraoka A, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y. Portal hypertension due to outflow block in non-cirrhotic patients with nonalcoholic fatty liver disease. The International Liver Congress 2014, 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. (2014.4.9-13., London,UK)

清家祐子,永井祥子,松竹幸子,青木孝文,竹島美香,井上可奈子,久保田紘代,隅田有公子,山田佐奈江,利光久美子,三宅映己,山本 晋,藤堂裕彦,徳本良雄,阿部雅則,松浦文三,日浅陽一. NASH 患者における栄養調査. 第 17 回日本病態栄養学会年次学術集会(2014.1.11-12.,大阪国際会議場(大阪府大阪市))

Miyake T, Hirooka M, Tokumoto Y, Watanabe T, Kumagi T, Abe M, Furukawa S, Onji M, Matsuura B, Hiasa Y. Composition of serum fatty acids may be associated with the antiviral effects of interferon-based therapy in patients with hepatitis C virus infection. 64th Annual Meeting of American Association for the Study of the Liver. (2013.11.1-5., Washington DC,USA)

松浦文三,三宅映己,恩地森一. 非アルコール性脂肪肝に対する□-クリプトキサンチン含有果汁飲料の有用性の検討. 第 55 回日本消化器病学会大会(JDDW2013). (2013.10.9-12 グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区))

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等:特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 映己 (Miyake, Teruki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 80573659

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし