



Title	肝細胞癌におけるFatty acid binding protein 5(FABP5)発現による上皮間葉転換に関する研究
Author(s)	大畑, 多嘉宣
Description	配架番号 : 2340
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12836号
Issue Date	2017-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12836
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67441
Type	doctoral thesis
File Information	Takanori_Ohata.pdf



学位論文

肝細胞癌における Fatty acid binding protein
5 (FABP5) 発現による上皮間葉転換に関する研究
(Studies on epithelial-mesenchymal
transition induced by expression of Fatty
acid binding protein 5 (FABP5) for
hepatocellular carcinoma)

2017 年 9 月

北海道大学

大畑 多嘉宣

学位論文

肝細胞癌における Fatty acid binding protein
5 (FABP5) 発現による上皮間葉転換に関する研究
(Studies on epithelial-mesenchymal
transition induced by expression of Fatty
acid binding protein 5 (FABP5) for
hepatocellular carcinoma)

2017 年 9 月

北海道大学

大畑 多嘉宣

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	
1. 免疫組織学的検討	13 頁
2. <i>in vitro</i> における検討	19 頁
3. <i>in vivo</i> における検討	23 頁
4. 遺伝子およびタンパク質発現解析	27 頁
考察	29 頁
総括および結論	31 頁
謝辞	32 頁
引用文献	33 頁

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究は以下の論文に投稿した。

1. Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Moto Fukai, Takeshi Aiyama, Yutaka Hatanaka, Kanako Hatanaka, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Nozomi Kobayashi, Yoshihiro Matsuno, Akinobu Taketomi
Fatty acid-binding protein 5 function in hepatocellular carcinoma through induction of epithelial–mesenchymal transition
Cancer Medicine, 6(5):1049-1061 (2017)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 大畑多嘉宣 横尾英樹 神山俊哉 若山顕治 折茂達也 柿坂達彦
敦賀陽介 蒲池浩文 武富紹信
肝細胞癌における FABP5 の新規バイオマーカーとしての有用性
第 114 回日本外科学会定期学術集会 (2014 年 4 月 5 日 京都)
2. Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi
Clinical significance of Fatty Acid Binding Protein 5 in hepatocellular carcinoma
The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2014 年 9 月 26 日 横浜)
3. Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Takeshi Aiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yousuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, Akinobu Taketomi
Effect of high expression of fatty acid binding protein 5 on prognosis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma
2015 Gastrointestinal Cancers Symposium (2015 年 1 月 17 日 San Francisco, USA)

【緒言】

わが国では過去 30 年にわたり、悪性新生物が死因の第 1 位を占めている。肝がんは 2013 年の主要部位別がん年齢調整死亡率（人口 10 万対）において悪性新生物全体で第 5 位であり、男性では肺がん、胃がん、大腸がんについて第 4 位、女性では大腸がん、肺がん、胃がん、膵がん、乳がんについて第 6 位である。1985 年モデル人口を基準集団とした年齢調整死亡率の年次推移において肝がんは男女とも減少傾向ではあるが、死亡実数は依然として毎年 3 万人（男性：約 2 万人、女性：約 1 万人）を超え、いまだに予後不良な悪性疾患のひとつである¹。

肝細胞癌の再発形式には他の癌と異なり肝内転移再発と多中心性発生再発の 2 種類が存在する。臨床的、分子生物学的にも厳密に 2 つを区別することは困難であるが、臨床的には 2 年以内に再発するものは肝内転移再発の可能性が高いと考えられている。予後向上のためにはこうした外科的切除後におきる多中心性発癌再発の抑制、肝内転移の抑制のほか、転移巣が形成された後の腫瘍増殖を抑制させることも重要である。肝内転移再発は原発巣の腫瘍の悪性度に依存するものであり従来の悪性度マーカーとしては alpha-fetoprotein (AFP), AFPL3, prothrombin induced by vitamin K absence II (PIVKA II) の値などが報告されている²が十分ではない。以前の検討で 9 種類の肝癌細胞株と 4 種類の primary culture の正常肝細胞株を用いたプロテオミクス解析（蛍光 2 次元電気泳動法）により Fatty Acid Binding Protein 5 (FABP5) が非癌部と比較して肝細胞癌に発現していることを世界で初めて報告した³（図 1）。

脂肪酸結合蛋白質である FABP ファミリーは現在 12 種類のアイソフォームがあり、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸といった不飽和脂肪酸に結合・可溶化することにより、脂肪酸の取り込みと代謝、シグナル伝達の制御、転写制御など細胞内の様々な機能に関わっている⁴（図 2）。

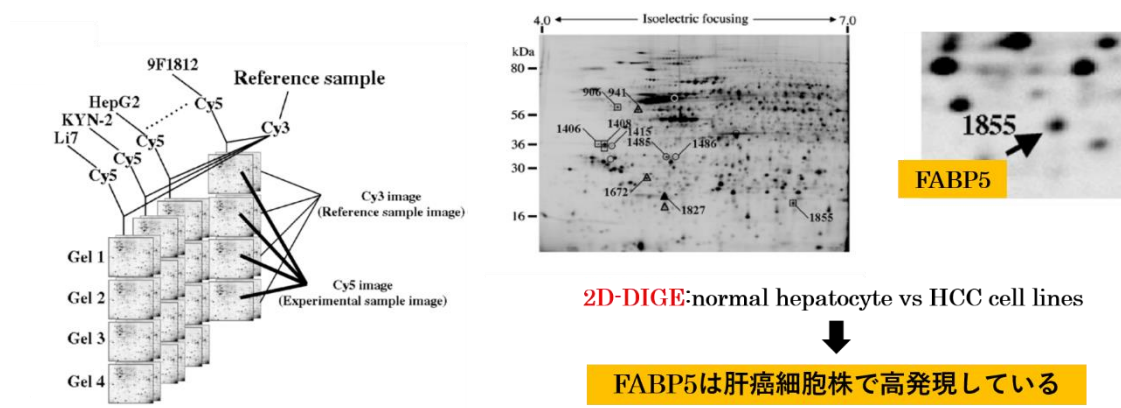


図 1：プロテオミクスによる肝細胞癌バイオマーカーの網羅的探索 (Fujii K et al, Proteomics, 2005)

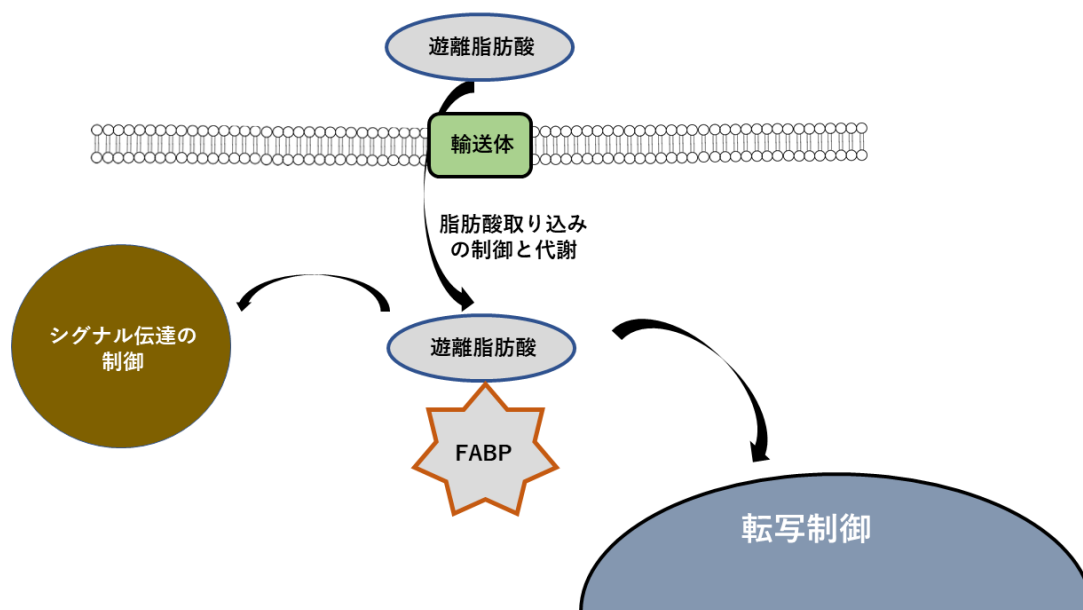


図 2: FABP の機能 (Furuhashi M et al, Nat Rev Drug Discov, 2008 を改変)

そのファミリーの一つである FABP5 はこれまで膵癌⁵、子宮内膜癌⁶、口腔扁平上皮癌⁷、前立腺癌⁸などで報告されており、予後マーカーや腫瘍の増殖、浸潤に関与しているとされている。FABP5 と癌関連分子の発現における関係性については c-Myc や EpCAM の発現を増強させることや、ラット Rama37 モデル細胞を用いた FABP5 遺伝子による転移誘導機構を研究した報告があり⁹、FABP5 形質転換細胞、およびその転移性変異細胞では血管内皮増殖因子 (VEGF) 遺伝子発現が増加しており、VEGF タンパク質も分泌されていたとされる。

また、FABP5 形質転換細胞を移植することにより形成された腫瘍において強い VEGF 染色、及び毛細血管密度増加が認められている。肝細胞癌は多血性の腫瘍であり、VEGF との関連が強く、すでに分子標的治療薬の multikinase inhibitor である sorafenib が臨床応用されており¹⁰ 血管新生抑制、腫瘍増殖抑制の点からその有効性が実証されている。

以上のことから、肝細胞癌に発現している FABP5 が腫瘍の増殖や脈管浸潤、ならびに引き続いて起こる経門脈性肝内転移と関係している可能性が強く、原発巣の免疫組織化学染色強度による悪性度マーカーとしての可能性、さらに FABP5 の増殖、浸潤、転移に関わる新たな下流分子の探索を行うことで分子機構を明らかにすることを目的とする。

略語表

AFP, alpha-fetoprotein

DAB, Diaminobenzidine

DFS, disease-free survival

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium

EMEM, Eagle's Minimum Essential Medium

FABP, fatty acid binding protein

FACS, Fluorescence activated cell sorting

HE, Hematoxylin-Eosin

MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease

NASH, nonalcoholic steatohepatitis

OS, over-all survival

PIVKA II, prothrombin induced by vitamin K absence II

PVDF, Polyvinylidene difluoride

SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis

shRNA, short hairpin RNA

TBS, Tris Buffered Saline

UICC, Union for International Cancer Control

【実験方法】

1. 患者

本実験は北海道大学病院高度先進医療センター自主臨床研究事務局により承認された課題名「肝細胞癌新規悪性度バイオマーカー候補 FABP5 (Fatty Acid Binding Protein 5) の発現、機能解析」(臨床研究番号：自 012-0251) に基づき行われた。対象は 1997 年 1 月から 2006 年 12 月までに北海道大学病院消化器外科 I にて切除された肝細胞癌初回肝切除 243 例である。腫瘍の評価は Union for International Cancer Control (UICC) 分類に基づき病理医によって行われた。臨床病理学的データを表 1 に示す。

2. 免疫組織化学染色

パラフィン包埋切片を 4 μ m に薄切、スライドガラスに固定した後、脱パラフィンを実施、さらに抗原賦活化処理を Pascal・抗原賦活化用プレッシャーチャンバー (DAKO, Glostrup, Denmark) に Target Retrieval Solution, pH 9.0 (DAKO JAPAN) を用いて 125 $^{\circ}$ C 3 分間実施した。その後、処理したスライドガラスを 0.3% H₂O₂ を用いて 5 分間反応させ、一次抗体である 抗 FABP5 抗体 (rabbit polyclonal diluted 1:750; Abcam, Cambridge, United Kingdom) にて室温で 60 分間反応させた。次に二次抗体 EnVisionTM (DAKO, Glostrup, Denmark) を室温で 30 分間反応させ、Tris Buffered Saline (TBS) で洗浄した。処理したスライドガラスを Diaminobenzidine (DAB) Liquid (DAKO, Glostrup, Denmark) にて室温で 5 分間反応させて発色させた。DAB 反応後 TBS で洗浄し、ヘマトキシリンを用いて 10 分間染色を実施し、水洗したのち透徹・封入した。

染色性の評価は 2 人の病理医により実施された。腫瘍細胞の染色強度は Kuppfer 細胞よりも強く染色される腫瘍細胞の比率によって 4 段階にスコア化した (0; 5%以下, 1; 5-20%, 2; 20-60%, 3; 60-100%)。さらに FABP5 発現を FABP5 陰性群 (スコア 0-1)、FABP5 陽性群 (スコア 2-3) の 2 群に分類した。

表 1:肝細胞癌初回肝切除 243 例の臨床病理学的データ

Characteristics	n
Age (years), median (range)	63 (35–82)
Male:female	200:43
Etiology, n (%)	
HBV	98 (40.3%)
HCV	92 (37.9%)
Both HBV and HCV	8 (3.3%)
NonB and NonC	53 (21.8%)
AFP (>20ng/ ml)	51 (20.0%)
PIVKA-II (>40mAU/ml)	102 (42.0%)
Pathological factors	
HCC	
Differentiation (well-mod/por)	184/61
Tumor size (≤ 5 cm/ >5 cm)	173/70
Tumor number (Single/Multinodular)	186/57
Microvascular invasion (negative/positive)	205/38
UICC stage (I/II-IV)	32/211
Noncancerous Liver	
Chirrhosis/Non chirrhosis	87/156

3. 細胞培養

ヒト肝癌細胞株である HLE, JHH5, HuH-7 および HepG2 は JCRB 細胞バンクより、Li-7 は RIKEN BRC CELL BANK より、Hep3B は ATCC より購入した。HLE, HuH-7, HepG2 および Li-7 は 10 % 非働化ウシ胎児血清(FBS: fetal bovine serum, Sigma Chemical Co, MO, United States)を含む Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Co, MO, United States)を用い、Hep3B は 10%FBS を含む Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, 和光純薬工業株式会社、大阪、日本)を用い、JHH5 は 10%FBS を含む Williams's medium (和光純薬工業株式会社、大阪、日本)を用いた。すべての細胞株は CO₂ インキュベーターにて 37°C、5 % CO₂ 下で培養した。各細胞株の浸潤能を以下に示す。

Highly invasive	HLE	Li-7		
Low invasive	JHH5	HuH-7	HepG2	Hep3B

4. FABP5 遺伝子過剰発現株の作成

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した。ヒト FABP5 cDNA をヒト全血より RT-PCR 法にて作成した。FABP5 のプライマー配列は表 2 に示した。cDNA を pLV5IN-IRES-ZsGreen1 vector (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, United States)にクローニング、Lenti-X HTX Packaging System (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, United States)を用いたレンチウイルス上清を作成し HepG2 に導入、FABP5 過剰発現 HepG2 細胞を作成した。Fluorescence activated cell sorting (FACS)を 2 回施行し、発現安定株を樹立した。

表 2 : FABP5 プライマー配列

Name	Sequence
FABP5 F	5'-GGTCCGCGGCCGCATGGCCACAGTTCAGCAG-3'
FABP5 R	5'-CCTGGGCGGCCGCTTATTCTACTTTTTTCATAGATCCG-3'

5. FABP5 遺伝子抑制株の作成

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した。FABP5 遺伝子をターゲットとしたレンチウイルスベースの short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターパーティクル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) を購入し、Li-7 に導入した。Puromycin (2.5 $\mu\text{g/mL}$) および FACS を用いて安定抑制株を樹立した。

6. PCR Array 法

FABP5 の悪性度にかかわる遺伝子発現プロファイリングを解析するために Human Cancer Pathway Finder RT2 Profiler PCR Array (Qiagen, Valencia, CA, United States) を用いた。Fold-change が 1.5 以上の遺伝子を有意差ありとした。

7. Western Blot 法

各培養細胞から Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, United States) を用いて細胞質タンパク質・膜タンパク質・水溶性核タンパク質および細胞骨格タンパク質を抽出した。タンパク質のサンプルに sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) を加え 95°C、5 分間加熱した。続いて Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) に polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。SDS-PAGE 後ゲルから polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) 膜へのタンパク質の転写を以下の方法で行った。PVDF 膜をメタノールにて 5 分間振とうし、振とう後転写装置の陽極側から順に、transfer buffer に浸したスポンジ、ろ紙、PVDF 膜、ゲル、ろ紙、スポンジの順に重ね、90 mA で 60 分間通電した。転写後 1.5% FBS で 60 分間ブロッキングした。TBST で洗浄した後、表 3 に示す 1 次抗体を室温にて 90 分間反応させ、再度 TBST で洗浄後 HRP 標識された二次抗体により反応を行い、ECL 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) により検出を行った。

表 3 : 1 次抗体

Target	species	Dilution	Vendor
FABP5	Rabbit	1:750	Abcam
ZO-1	Rabbit	1:500	Cell Signaling
E-cadherin	Rabbit	1:200	Cell Signaling
N-cadherin	Rabbit	1:200	Cell Signaling
β -catenin	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
GAPDH	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
Snail	Rabbit	1:500	Cell Signaling
LaminB1	Rabbit	1:500	Cell Signaling

8. 細胞浸潤・遊走能アッセイ

浸潤能アッセイ、遊走能アッセイにそれぞれ 24 ウェルの Matrigel invasion chambers (8.0 μ m pore size; Corning, New York, NY, United States) および polyester membrane inserts (8.0 μ m pore size; Corning, NY, United States) を使用した。FBS フリーの培養液に懸濁した 5×10^4 個の肝癌細胞株を upper chamber に撒き、lower chamber に 10%FBS を含んだ培養液を入れ 37°C 下で 48 時間培養した。48 時間の培養後 upper chamber に残存した細胞を綿棒で除去後 Diff-Quik 染色キット (Sysmex, 兵庫、日本) で染色し、染色された細胞数を計測した。

9. 細胞増殖能アッセイ

細胞増殖能は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) kit (Cell Titer 96 AQ, Promega, Madison, WI, United States) を用いて以下の手順で行った。10cm culture plate で培養し、confluent の状態になった肝癌細胞株を Trypsin/EDTA で浮遊させ、96 ウェルの culture plate に 1×10^3 個撒き、10%FBS を含んだ培養液に 37°C、5 % CO₂ 下で培養し、0, 1, 2, 3 および 4 日後に MTS kit を用いて 490nm の吸光度を Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) で測定した。

10. マウス xenograft model の確立

FABP5 による *in vivo* での腫瘍形成能を確認するため以下のマウス xenograft model を作製した。生後 4 週の雄 BALB/cSlc-nu/nu マウス (三共ラボサービス会社、東京、日本)を用い、50 μ l の phosphate buffered saline に懸濁した 1×10^6 個の肝癌細胞株を 50 μ l Matrigel (Corning, NY, United States)と気泡が混ざらないように混合しマウスの肩甲下に皮下注した。腫瘍径を 20 日間以上の期間で 4 日毎に計測した。腫瘍体積は次の近似式を用いて算出した。 $V \text{ (mm}^3\text{)} = W[2] \text{ (mm}^2\text{)} \times L \text{ (mm)}/2$. (V : 体積 W : 短径 L : 長径)。

続いて *in vivo* での肝内転移能、遠隔転移能を確認するために、前述のヌードマウスを用いてそれぞれ経門脈肝内転移モデルおよび経尾静脈肺転移モデルを以下の方法で作製した。各 xenograft モデルは 3 匹ずつ作製した。

① 肝内転移モデル：

ヌードマウスを全身麻酔下で開腹、左右の門脈を確認し、門脈左枝を 6-0 シルクブレード糸で仮結紮し、50 μ l の phosphate buffered saline に懸濁した 1×10^6 個の肝癌細胞株を選択的に門脈右枝に注射した。門脈注射後仮結紮糸を解き閉腹、6-7 週間後にマウスを sacrifice し、肝表面の肝転移巣数を計測した。

② 肺転移モデル：

ヌードマウスの尾静脈に 50 μ l の phosphate buffered saline に懸濁した 1×10^6 個の肝癌細胞株を注射し、尾静脈注射 8 週後にマウスを sacrifice し肺転移巣の有無を確認した。

肝組織および肺組織は 10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し薄切後 Hematoxylin-Eosin(HE)染色にて評価した。

11. 統計解析

統計解析は JMP 11 (SAS Institute, Cary, NC, United States)を用いて行った。カテゴリカルデータの解析には χ^2 検定、2 群間の比較には t 検定を使用した。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用い、群間比較をログランク検定にて行った。

※全ての研究は、北海道大学病院(あるいは北海道大学大学院医学研究科)の自主臨床研究に関する倫理委員会に研究計画書、説明同意書を提出のうえ、承認

された事項のみを実行した。

提供を受けた試料や臨床経過・検査データを含む個人情報 は連結可能匿名化にて情報管理責任者が適切に管理した。相手方の同意・協力を必要とする研究は、担当医師が患者本人と家族に入念に説明し、書面で同意を得たうえで、研究に使用した。研究への協力は患者の自由意思によって決定され、いかなる不利益も被らないことも明記した。

特に患者の切除組織や血液などの試料を用いた研究は、同意を得た研究のみに使用し、患者の個人情報も厳密に管理した。

動物実験では、遺伝子組み換え実験に該当しない動物実験は北海道大学動物実験倫理委員会の承認のもとで、ヘルシンキ条約および北海道大学動物実験指針に従って行い、必要最小限の動物数を使用した。遺伝子組み換え実験に該当する動物実験は遺伝子組み換え実験および動物実験に関する本学の倫理委員会に申請のうえ、承認された事項について、当該の講習を受講した者が法令に従って行い、実験当時稼働していた **P2A** レベルの実験室を使用した。

遺伝子組み換え実験に該当する実験は本学遺伝子組み換え実験倫理委員会に申請のうえ、承認された事項についてのみ施行した。研究当時既に稼働していた **P2** レベルの実験室で、遺伝子組換え実験等に係る講習会を受講した者のみが法令に従って施行した。

【実験結果】

1: FABP5 発現の免疫組織学的検討

① パイロット実験

当初、当科で保存されていた凍結肝癌組織を薄切し、免疫組織化学染色を行ったが、凍結保存状態が良好でなく、抗体自体の染色評価が不可能であった。次に肝癌組織のパラフィン包埋ブロックを用いて再度免疫組織化学染色を行ったところ抗 FABP5 抗体による染色を認めたため、全ての肝組織に対する免疫組織化学染色に対してパラフィン包埋ブロックを使用することとした。

FABP5 はマクロファージで高発現していることが報告されている¹¹ことから、肝類洞内に存在するマクロファージである **Kupffer 細胞** を **internal positive control** とし、まず非癌部肝組織における **Kupffer 細胞** が抗 FABP5 抗体で染色されるか検討した。図 3 の如く染色が確認されたため、全 243 例の肝癌組織に対する免疫組織化学染色を行った。各染色スコアの写真を図 4 に示す。すべての症例において非癌部は FABP5 陰性であった。

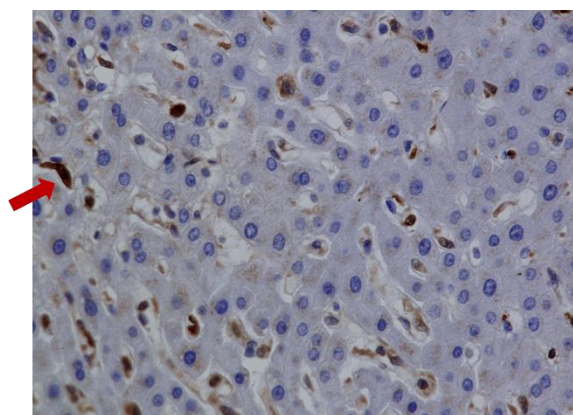


図 3 : Kupffer 細胞における FABP5 の免疫組織化学染色（非癌部）
（赤矢印:Kupffer 細胞, Magnification ×200 ）

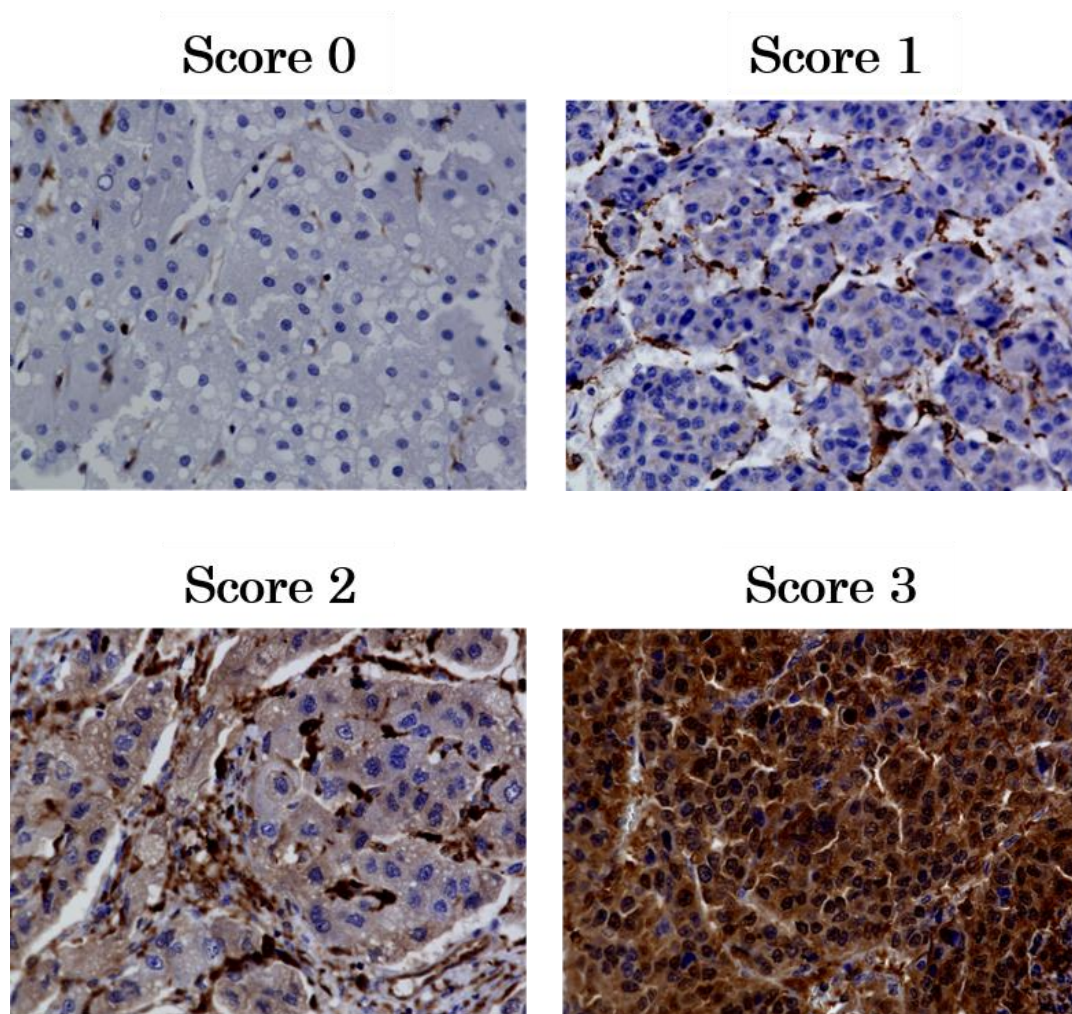


図 4：肝癌組織における FABP5 染色スコア

Score 0: 染色される腫瘍細胞割合 5%以下

Score 1: 染色される腫瘍細胞割合 5-20%

Score 2: 染色される腫瘍細胞割合 20-60%

Score 3: 染色される腫瘍細胞割合 60-100%

Score 0 および 1: FABP5 陰性群 / Score 2 および 3: FABP5 陽性群

(Magnification $\times 200$)

② 肝切除 243 例の検討

全 243 例中 139 例 (57.2%) に FABP5 発現陽性を認めた。

FABP5 陽性群は臨床病理学的因子との相関にて、顕微鏡的脈管侵襲 ($P=0.0001$)、腫瘍分化度 ($P=0.0337$)、腫瘍径 ($P=0.0001$)、血清 AFP 値 ($P=0.0022$)、血清 PIVKA-II 値 ($P=0.0025$) と相関を示した (表 4)。

表 4 : FABP5 発現と臨床病理学的因子との相関関係

FABP5				FABP5			
	positive (n=139)	negative (n=104)	P value		positive (n=139)	negative (n=104)	P value
Age				AFP			
>60 yrs	68	61	0.5924	>20ng/ ml	37	14	0.0022
≤60 yrs	64	50		≤20 ng/ml	94	97	
Sex				PIVKA-II			
Male	107	93	0.5787	>40mAU/ml	67	35	0.0025
Female	25	18		≤40mAU/ml	65	76	
HBV				Tumor size			
positive	60	38	0.0750	>5cm	96	53	0.0001
negative	72	73		≤5 cm	36	58	
HCV				Differentiation			
positive	50	50	0.2583	por	112	82	0.0337
negative	82	61		well-mod	20	29	
AST				Microvascular invasion			
>40 IU/l	78	66	0.9536	positive	32	6	0.0001
≤40 IU/l	54	45		negative	100	105	
ALT				Tumor number			
>40 IU/l	73	60	0.8455	multiple	26	31	0.1315
≤40 IU/l	59	51		single	106	80	
T-bil				UICC			
>1.2mg/dl	12	14	0.3774	I	119	92	0.0955
≤1.2mg/dl	120	97		II-IV	13	19	
Plt				Pathological intrahepatic metastasis			
>1×10 ⁴ /μl	27	26	0.5771	positive	26	22	0.9809
≤1×10 ⁴ /μl	105	85		negative	106	89	
Alb							
>4.0 g/dl	57	38	0.1536				
≤4.0 g/dl	75	73					

また、予後・再発の検討では FABP5 陽性群は FABP5 陰性群と比較して予後（5 年 Overall Survival (OS): 60.6% vs. 90.5%; $P < 0.0001$ ）、無再発生存（5 年 Disease-free Survival (DFS): 24.2% vs. 47.9%; $P < 0.0001$ ）いずれにおいても不良であった（図 5）。

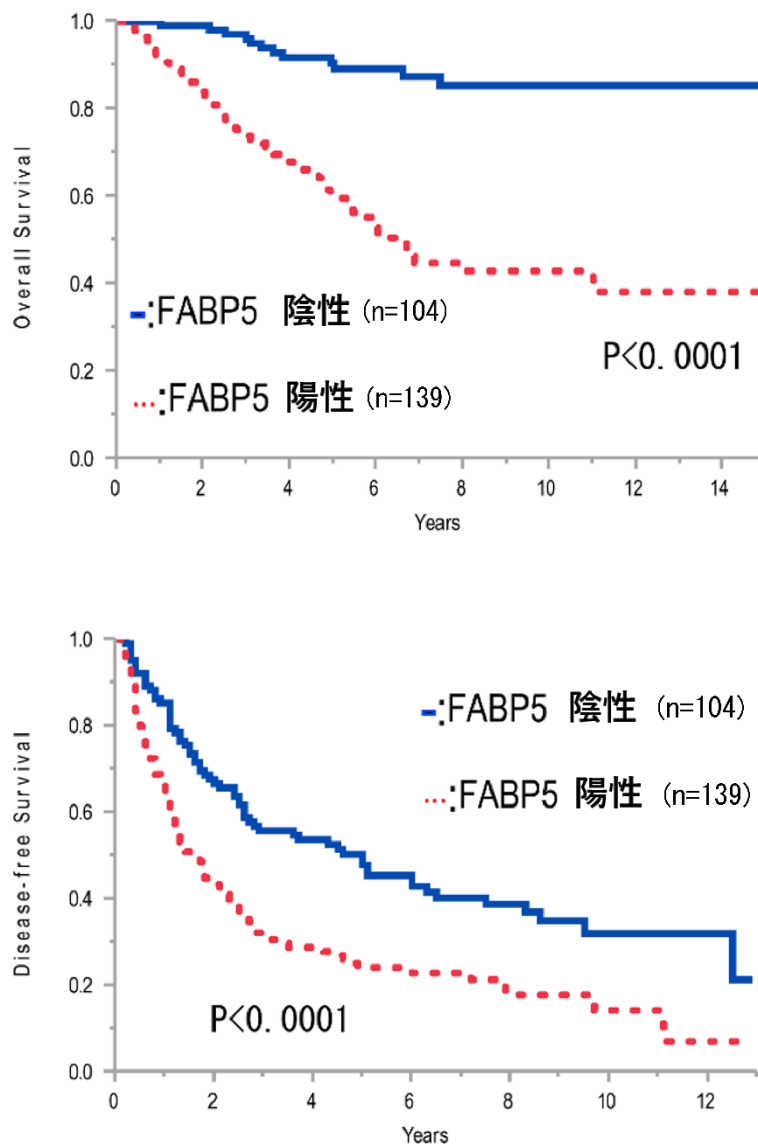


図 5：肝細胞癌における FABP5 発現とその予後再発に対する検討

FABP5 陽性群は FABP5 陰性群と比較し、予後（5 年 OS: 60.6% vs. 90.5%; $P < 0.0001$ ）、無再発生存（5 年 DFS: 24.2% vs. 47.9%; $P < 0.0001$ ）いずれにおいても不良であった。

FABP5 の発現が独立した予後不良因子と成りうるかの検証のため、COX proportional hazards model を用いて OS における単変量解析および、多変量解析を施行した。単変量解析では顕微鏡的脈管侵襲、腫瘍径、FABP5 発現に有意差を認め、多変量解析で FABP5 発現が独立した予後不良因子であることを確認した（表 5）。

表 5：FABP5 発現と単変量解析および多変量解析（OS）

単変量解析				
Variable	n	HR	95%CI	P value
Age (>60 vs ≤60 years)	134/109	1.319	0.791–2.234	0.291
Sex (male vs female)	200/43	1.082	0.587–2.135	0.808
HBV (positive vs negative)	98/145	0.784	0.430–1.427	0.426
HCV (positive vs negative)	92/151	1.456	0.828–2.578	0.192
AFP (>20 vs ≤20 ng/ml)	51/192	1.361	0.846–2.209	0.205
PIVKA-II (>40 vs ≤40mAU/ml)	102/141	1.227	0.725–2.112	0.449
Tumor size (>5 vs ≤5 cm)	70/173	1.159	0.613–2.332	0.659
Differentiation (por vs well-mod)	61/184	1.111	0.586–1.989	0.735
UICC stage (II-IV vs I)	211/32	1.275	0.486–3.747	0.631
Microvascular invasion (positive vs negative)	38/205	2.607	1.474–4.503	0.001
Tumor number (multinodular vs single)	57/186	2.187	1.209–3.875	0.010
FABP5 (positive vs negative)	139/104	4.999	2.713–9.978	<0.0001
多変量解析				
Variable	n	HR	95%CI	P value
Microvascular invasion (positive vs negative)	38/205	2.434	1.398–4.120	0.0021
Tumor number (multinodular vs single)	57/186	2.490	1.454–4.172	0.0012
FABP5 (positive vs negative)	139/104	5.276	2.928–10.347	<0.0001

また、DFS における単変量解析および多変量解析において FABP5 は最も強力な再発因子であることを確認した（表 6）。

表 6：FABP5 発現と単変量解析および多変量解析（DFS）

単変量解析				
Variable	n	HR	95%CI	P value
Age (>60 vs ≤60 years)	134/109	1.223	0.865–1.727	0.253
Sex (male vs female)	200/43	1.053	0.679–1.583	0.811
HBV (positive vs negative)	98/145	1.069	0.703–1.620	0.755
HCV (positive vs negative)	92/151	1.218	0.820–1.819	0.330
AFP (>20 vs ≤20 ng/ml)	51/192	1.142	0.832–1.568	0.411
PIVKA-II (>40 vs ≤40mAU/ml)	102/141	1.032	0.738–1.447	0.854
Tumor size (>5 vs ≤5 cm)	70/173	1.335	0.897–2.029	0.157
Differentiation (por vs well-mod)	61/184	1.323	0.886–2.040	0.175
UICC stage (II-IV vs I)	211/32	1.386	0.892–2.094	0.142
Microvascular invasion (positive vs negative)	38/205	1.148	0.652–2.073	0.636
Tumor number (multinodular vs single)	57/186	1.975	1.356–2.834	0.0005
FABP5 (positive vs negative)	139/104	1.702	1.214–2.403	0.002
多変量解析				
Variable	n	HR	95%CI	P value
Tumor number (multinodular vs single)	57/186	1.947	1.368–2.724	0.0003
FABP5 (positive vs negative)	139/104	1.952	1.428–2.691	<0.0001

2 : in vitro における FABP5 発現の分子生物学的検討

① 肝癌細胞株における FABP5 発現の検討

次に 4 種類の肝癌細胞株を用いて FABP5 発現と悪性度との相関を検討した。Western blot 法では肝癌細胞株のうち高悪性度群 (Li-7, HLE) において FABP5 発現が高く、低悪性度群 (HepG2, Hep3B) において FABP5 発現が低いことが示された。また、比較的悪性度が低いと推察される高分化型肝癌由来の細胞株である JHH5, HuH7 においても高悪性度群と比較して FABP5 の発現が低かった (図 6)。そこで、FABP5 の分子生物学的検討のため、FABP5 が最も高発現していた Li-7 に各々 2 種類の異なった shRNA vector を用いて作成した FABP5 遺伝子発現抑制株 (Li-7KD1, Li-7KD2) を作成、FABP5 が低発現かつ遺伝子導入が Hep3B よりも容易であった HepG2 に対し FABP5 発現過剰発現株 (HepG2-FABP5) および空ベクターを導入したコントロール株 (HepG2 control) を作成し、浸潤・遊走能アッセイを行った。shRNA においては、KD1 と比較し KD2 がより強いノックダウン効果を示した (図 7)。

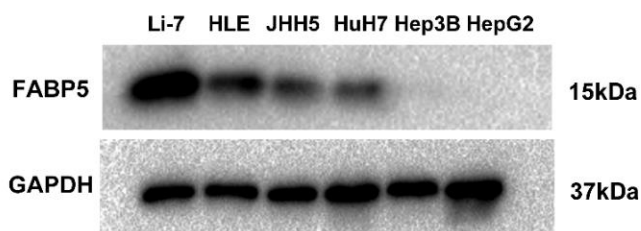


図 6 : 各肝癌細胞株における FABP5 発現

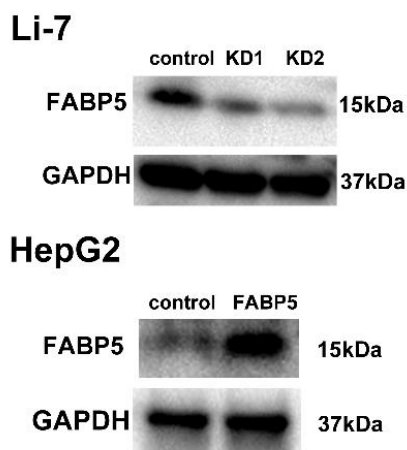


図 7 : 肝癌細胞株における FABP5 遺伝子発現抑制株と FABP5 遺伝子過剰発現株の作成

② 肝癌細胞株における FABP5 発現と浸潤能・遊走能との相関性に対する検討

FABP5 発現が悪性度の指標の 1 つである細胞の浸潤、遊走に関連性があるか検討した。

浸潤能アッセイでは Li-7 において浸潤細胞数が Li-7 control : 57.0 ± 11.0 個, Li-7 KD1 : 26.0 ± 4.0 個, Li-7 KD2 : 12.0 ± 1.5 個と control 群と比較し FABP5 発現抑制株において浸潤能が優位に低下することが確認された (mean $\pm$ SD 個, $P < 0.05$)。一方 HepG2 では、control 群と比較して FABP5 過剰発現である HepG2-FABP5 の浸潤能が優位に亢進する (HepG2 control : 20.0 ± 2.5 個 vs HepG2-FABP5 : 85.0 ± 27.5 個)ことが確認された ($P < 0.05$)。

遊走能アッセイにおいても同様に、遊走細胞数が Li-7 control : 155.0 ± 16.0 個, Li-7 KD1 : 42.0 ± 17.2 個, Li-7 KD2 : 27.0 ± 24.4 個と control 群と比較し FABP5 発現抑制株において遊走能が優位に低下することが確認された ($P < 0.05$)。一方 HepG2 では、control 群と比較して FABP5 過剰発現である HepG2-FABP5 の浸潤能が優位に亢進する (HepG2 control : 11.0 ± 13.6 個 vs HepG2-FABP5 : 79.0 ± 10.3 個)ことが確認された ($P < 0.05$)。(図 8)。

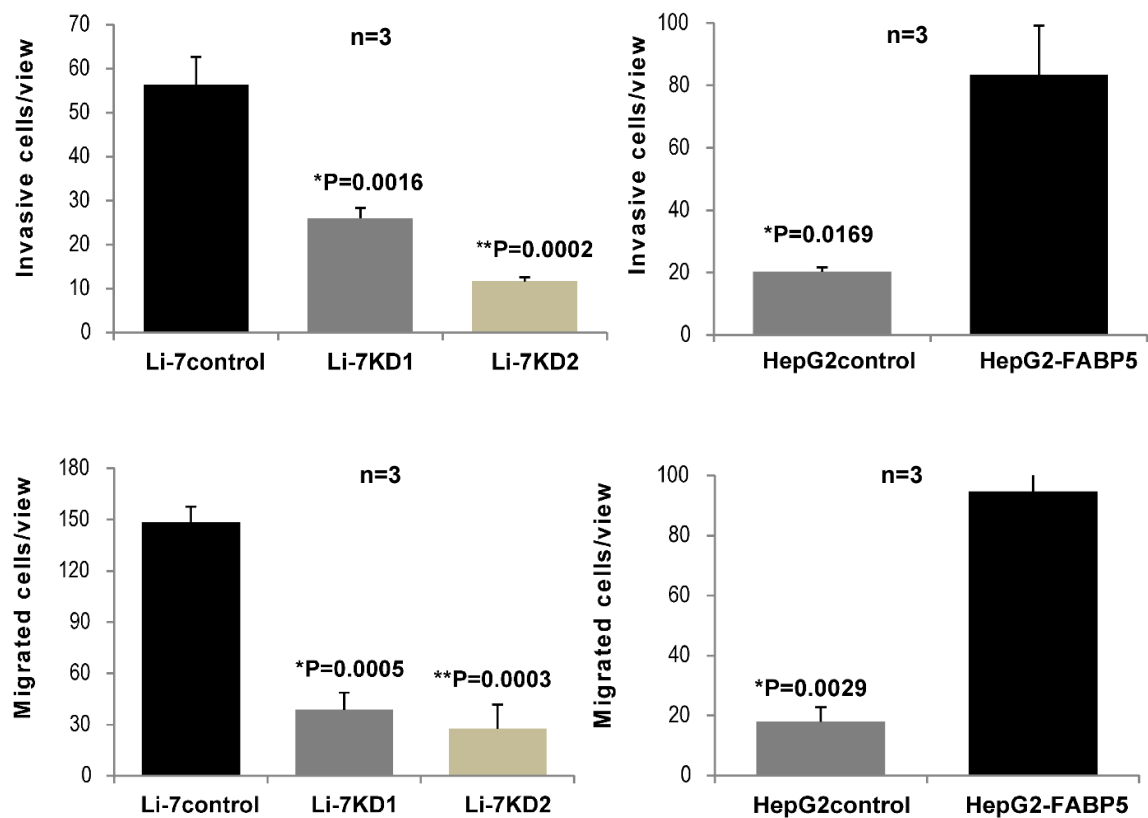


図 8 : FABP5 発現における浸潤能・遊走能に対する検討

Li-7, HepG2 双方とも FABP5 低発現株(Li-7KD1,KD2 および HepG2control)と比較して FABP5 高発現株 (Li-7control, HepG2-FABP5) で優位に浸潤能、遊走能が亢進することが確認された(P<0.05)。

③ FABP5 発現は肝癌細胞株において細胞増殖能を制御する

MTS kit において、Li-7 は FABP5 発現を抑制することによって増殖能が低下し($P<0.05$)、HepG2 は FABP5 を過剰発現することにより増殖能が亢進する($P<0.05$)ことが確認された(図 9)。

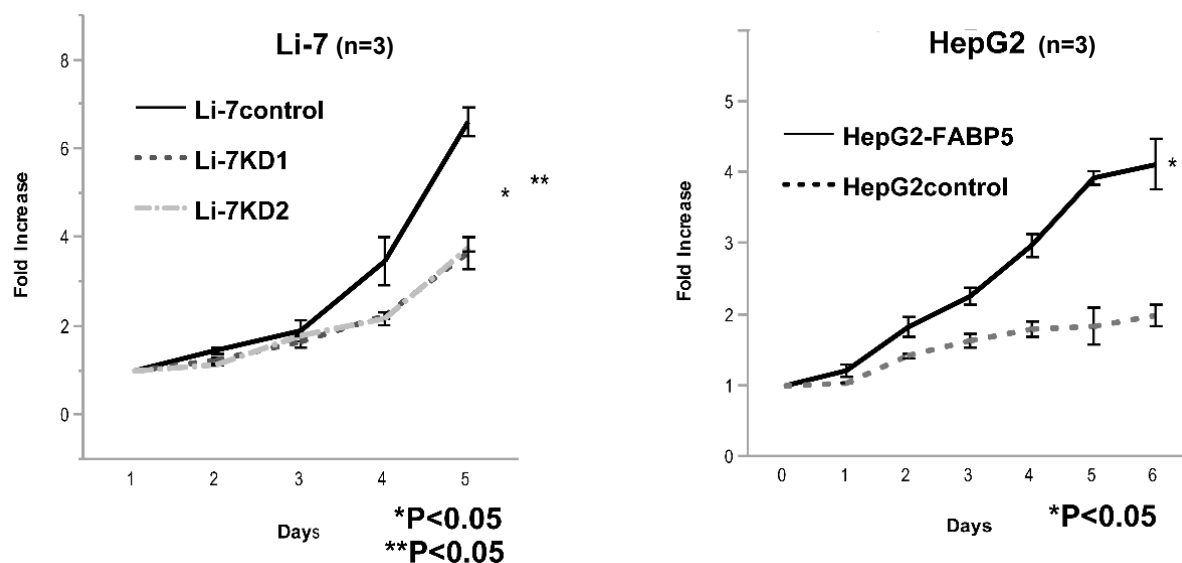


図 9 : FABP5 発現における細胞増殖能に対する検討

Li-7, HepG2 いずれにおいても、FABP5 低発現株(Li-7KD1,KD2 および HepG2control)と比較して FABP5 高発現株 (Li-7control, HepG2-FABP5) で優位に増殖能が亢進することが確認された($P<0.05$)。

以上より、in vitro において FABP5 は細胞の浸潤・遊走・増殖に重要な役割を果たしていることが判明した。

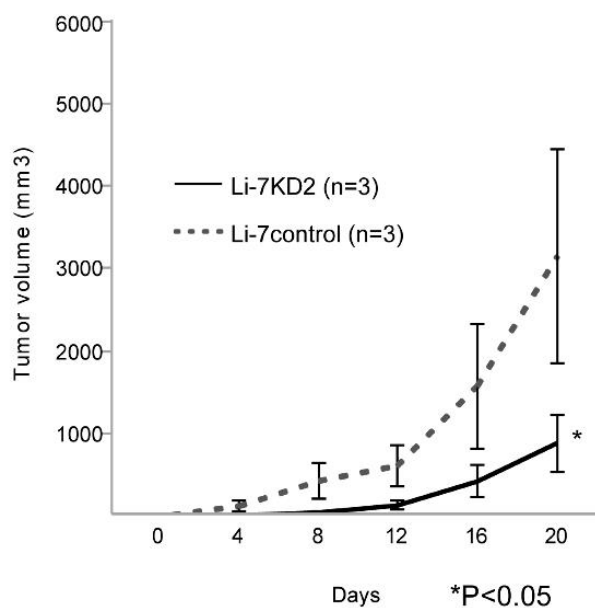
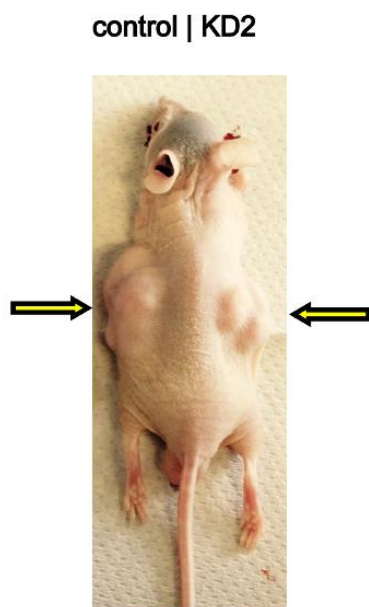
3 : in vivo における FABP5 発現の分子生物学的検討

更なる検討としてマウス xenograft model を用いて in vivo における FABP5 の悪性度に対する検討を行った。まずパイロット実験として FABP5 が高発現している Li-7 と HLE の 2 種類の細胞株をヌードマウスの皮下に移植したところ、HLE では生着を認めなかったため、以後の検討において Li-7 を使用することとした。Li-7 遺伝子抑制株においては、特に発現抑制効果を強く認めた Li-7KD2 を用いた(図 7 参照)。

① FABP5 は in vivo において腫瘍形成を促進する

マウス皮下注モデルにおいて皮下注後 20 日目の腫瘍体積(mean±SD mm³)を比較検討したところ、Li-7 において Li-7 control 群: 3034.4±1597.2 mm³ vs Li-7 KD2 群: 894.8±599.9 mm³ (p<0.05), HepG2 において HepG2-FABP5 群: 1651.2±272.2 mm³ vs HepG2 control 群: 537.9±272.2 mm³ (p<0.05) と FABP5 高発現株による腫瘍体積が FABP5 低発現株による腫瘍体積よりも優位に大きいことが確認された(図 10)。

Li-7



HepG2

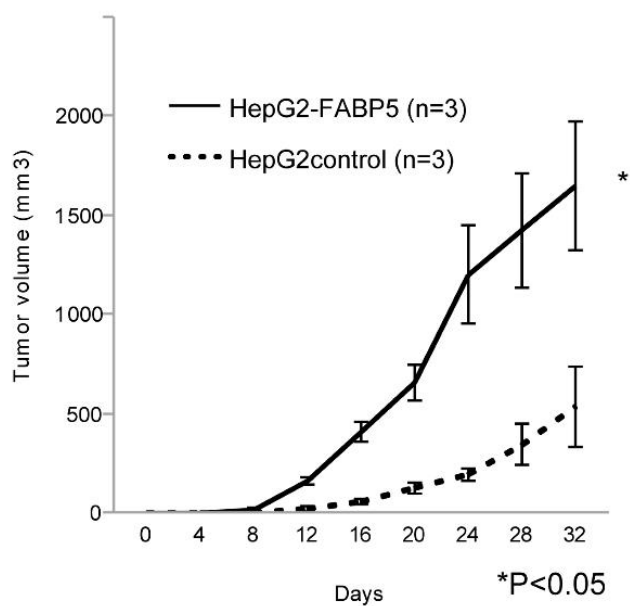
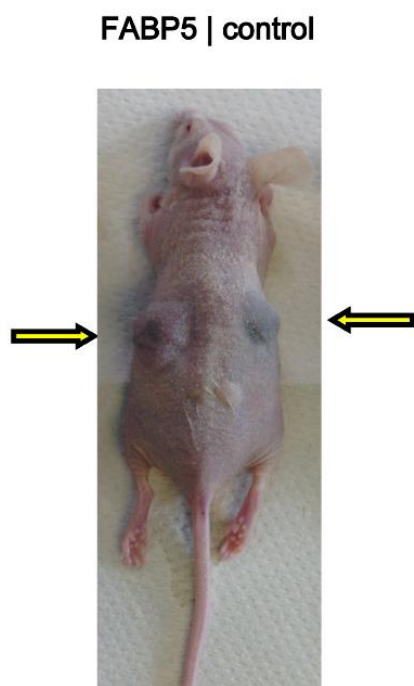


図 10:マウス皮下注モデルにおける FABP5 による腫瘍形成能に対する検討
マウス皮下注モデルにおいて、FABP5 高発現株 (Li-7control, HepG2-FABP5) による腫瘍が FABP5 低発現株(Li-7KD2, HepG2control)による腫瘍よりも優位に体積が大きいことが確認された(P<0.05)。

② FABP5 は in vivo において遠隔転移巣形成に関与する

マウス肝転移モデルにおいて FABP5 低発現群 (Li-7KD2, HepG2control) では肝表面に明らかな結節を視認できなかった。一方で FABP5 高発現群 (Li-7control, HepG2-FABP5) では、Li-7 control: 6.0 ± 1.5 個, HepG2-FABP5: 7.0 ± 0.6 個 と肝表面の結節を視認できた (mean $\pm$ SD 個, $p < 0.05$)。肝表面の結節は HE 染色で肝転移であることを確認した (図 11)。

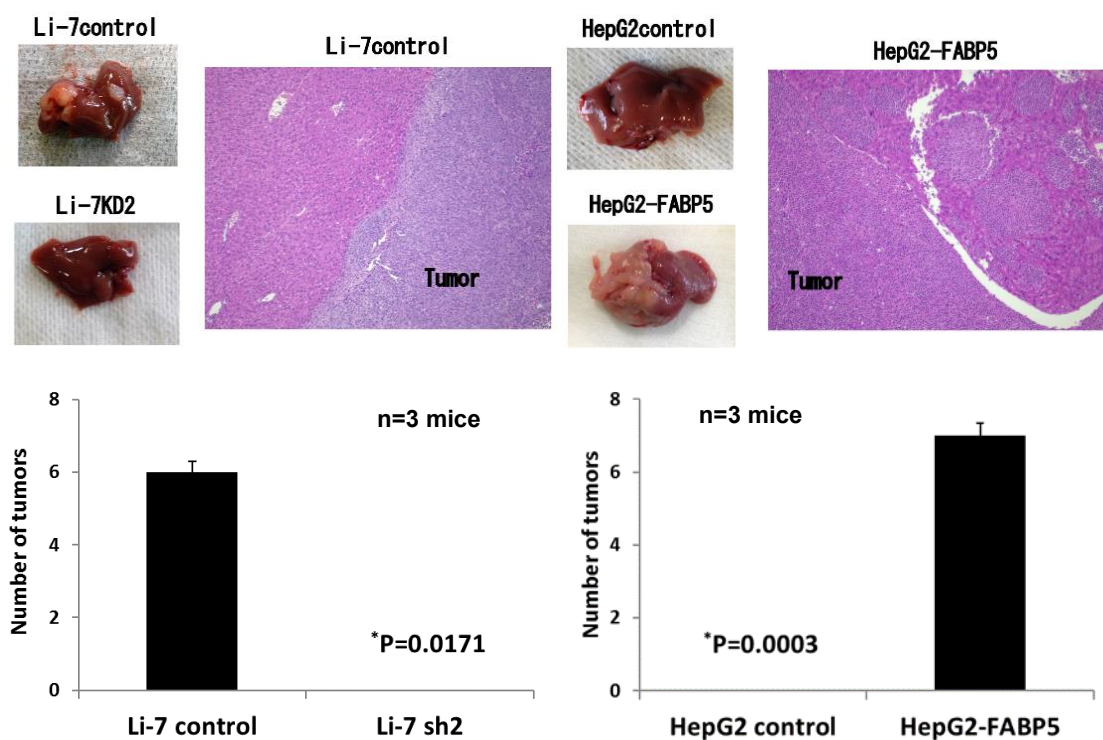


図 11：マウス肝転移モデル

Li-7, HepG2 いずれにおいても高発現群 (Li-7 control, HepG2-FABP5)において肝転移巣を認めたが、低発現群 (Li-7 sh2, HepG2 control)では肝転移巣を認めなかった($p < 0.05$)。

マウス肺転移モデルにおいて、FABP5 低発現群、FABP5 高発現群双方において肺結節は視認できなかったが、顕微鏡下において Li-7 control: 2.0 ± 0.6 個, HepG2-FABP5: 2.0 ± 1.2 個 と FABP5 高発現群で肺転移を形成していることが確認された(図 12, mean $\pm$ SD 個, $p < 0.05$)。

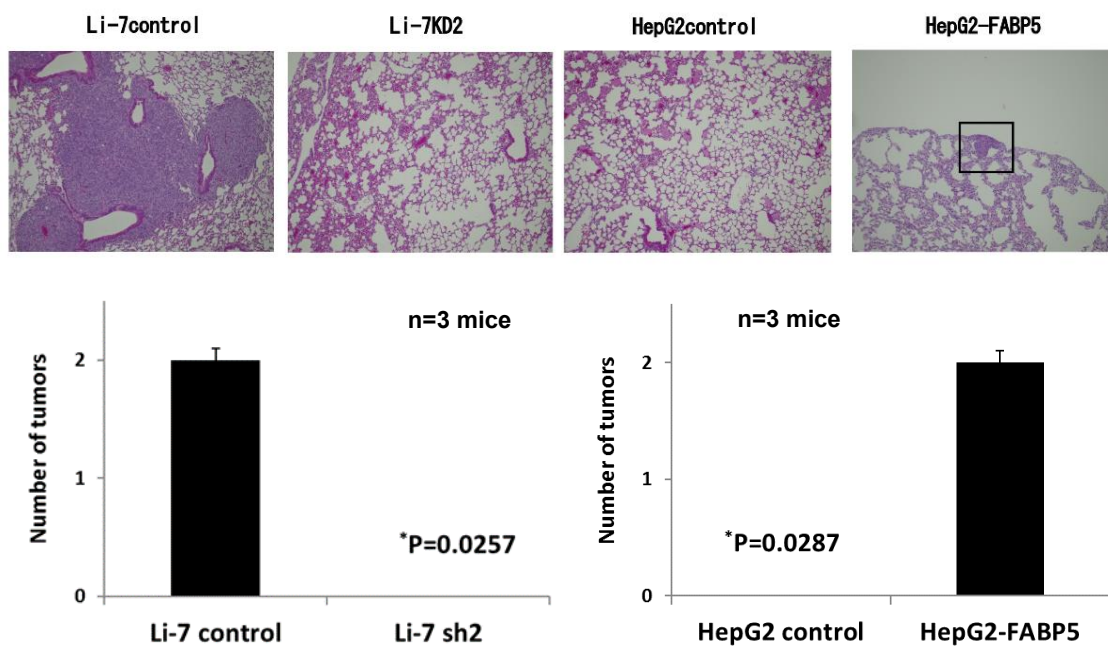


図 12：マウス肺転移モデル

Li-7, HepG2 いずれにおいても高発現群 (Li-7 control, HepG2-FABP5)において肺転移巣を形成したが、低発現群 (Li-7 sh2, HepG2 control)では肺転移巣を形成しなかった($p < 0.05$)。

以上より、肝細胞癌において FABP5 発現が腫瘍形成ならびに転移促進に重要な役割を果たしていることを *in vivo* で確認した。

4: FABP5 は上皮間葉転換を引き起こす

続いて FABP5 が肝細胞癌の悪性度に関わる遺伝子発現に寄与するか検討するために、HepG2 と HepG2-FABP5 を用いて Human Cancer Pathway Finder RT2 Profiler PCR Array を行った。結果として、HepG2-FABP5 において上皮間葉転換に関わる遺伝子である Snail の発現が亢進していることを確認した(図 13, 表 7)。

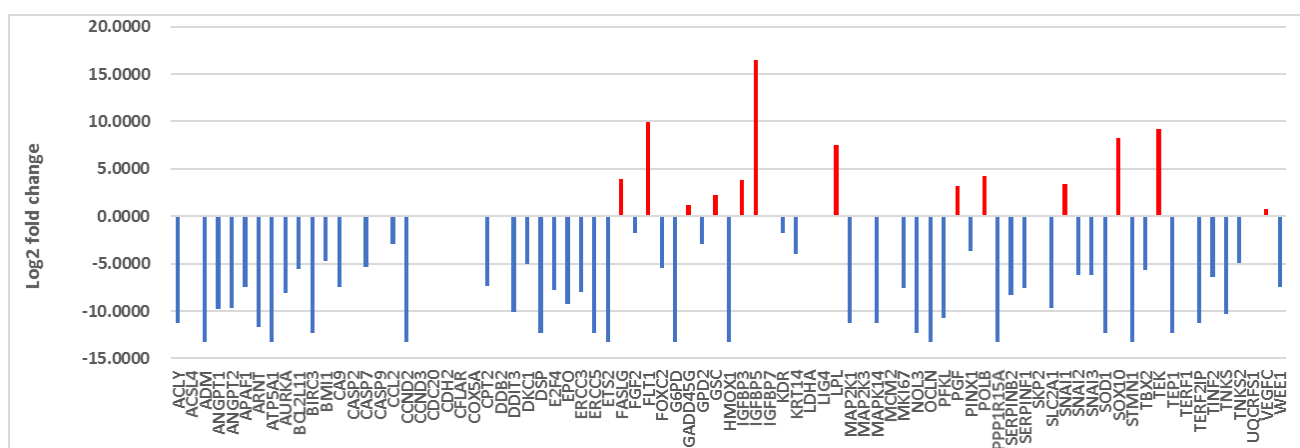


図 13: PCR アレイによる網羅的遺伝子解析

表 7: FABP5 により発現が亢進した遺伝子

Function	Symbol	Name of Gene	Refseq	Fold Change
Angiogenesis	PGF	Placental growth factor	NM_002632	9.35
	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial	NM_000459	590.44
	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	NM_005429	1.70
EMT	SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)	NM_005985	10.45
	SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10	NM_006941	297.96
Apoptosis				
	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	NM_000639	15.21

上皮間葉転換に FABP5 発現が実際に関与しているのか、Western Blot 法にて FABP5 の発現と上皮マーカーである E-cadherin と ZO-1、間葉マーカーである N-cadherin 発現の関連性を検討した。結果として Li-7 において FABP5 発現を抑制することで E-cadherin と ZO-1 の発現が亢進し、N-cadherin の発現が抑制することを確認した。また、Snail 発現と β -catenin の核内移行も抑制されることが確認された。一方 HepG2 において FABP5 の発現亢進により Li-7 とは逆の現象を引き起こすことも確認した (図 14)。

以上より、FABP5 が上皮間葉転換に非常に重要な役割を果たしていることを確認した。

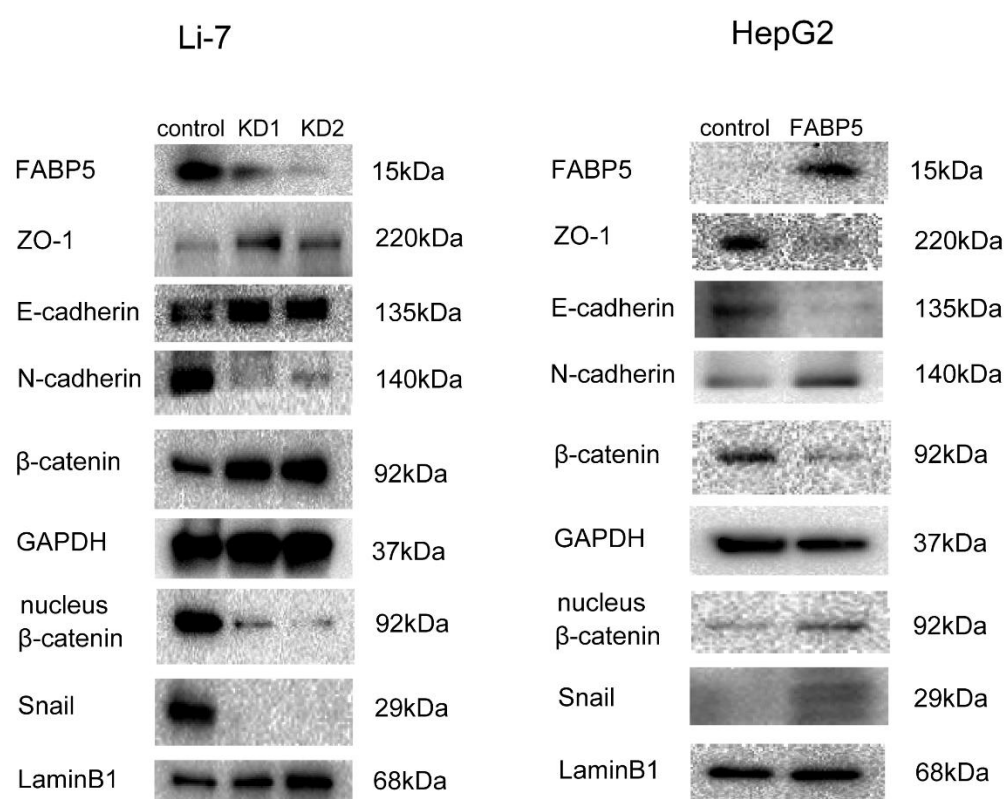


図 14 : FABP5 は上皮間葉転換に深く関与する

【考察】

本研究において FABP5 の発現が肝細胞癌において臨床的に予後再発に深くかかわること、FABP5 が上皮間葉転換を引き起こすことで腫瘍形成、浸潤、転移に非常に重要な役割を果たしていることを初めて報告した。

今回の検討で FABP5 が非癌部よりも癌部に強く発現していること、臨床病理学的に腫瘍径、脈管浸潤、分化度などと相関しており、FABP5 の発現が高いほど予後不良であり再発率も高いことを確認した。

基礎実験においても、*in vitro* における FABP5 と細胞浸潤、遊走、増殖との相関、*in vivo* における腫瘍形成、転移巣形成との相関関係を証明した。

FABP5 はこれまでに細胞増殖および腫瘍増殖に関わる核内受容体 (peroxisome-proliferator-activated receptor β/δ) や上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現を亢進することが報告されている¹²。今回は FABP5 と増殖に関わる分子との関連性に対する分子生物学的検討を行わなかったが、肝細胞癌においても前述の受容体を介した分子カスケードにより腫瘍増殖を促進している可能性が示唆される。

転移は癌細胞が原発部位から別の臓器や器官へ移動し増殖することを意味する。具体的には原発巣で腫瘍が増大→原発巣から癌細胞が離脱→脈管へ浸潤し脈管内を移動→転移臓器への接着と増殖という一連の流れがある¹³が、癌細胞の遊走、浸潤、播種に関わる重要な概念として上皮間葉転換がある。

上皮間葉転換は、上皮細胞が上皮としての特性を失い周辺組織に遊走しやすい間葉系細胞に形態変換する現象のことを指す。上皮間葉転換における重要な分子学的特徴に E-cadherin の発現抑制がある^{14,15}。E-cadherin は細胞接着に関与する代表的な分子であるが、この接着分子の発現抑制により細胞極性が失われることが細胞の間葉性変化における主要機序と考えられているからである¹⁶。

上皮間葉転換に関連した FABP5 の報告は今までになかったが、今回初めて FABP5 が上皮間葉転換を介して腫瘍形成や転移を引き起こすことを報告した。分子生物学的評価において、FABP5 を過剰発現することで E-cadherin や ZO-1 といった上皮マーカーの発現が抑制され、代表的な間葉マーカーである N-cadherin の発現が亢進されることを確認した。さらに別の上皮間葉転換の重要分子である Snail 発現も亢進されることを確認した。FABP5 発現を抑制することで逆の現象を生じることも確認した。以上の現象を踏まえて FABP5 が EMT を介することで肝細胞癌における悪性度を高めていることが強く示唆された。

今まで FABP5 が他癌において転移、浸潤、予後に関連していることはいくつかの文献で報告されている^{7,17,18}。例えば、FABP5 が細胞外マトリクスを分解する酵素である matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) の発現を亢進することで腫

瘍転移能を促進すること、血管新生に関わる重要な分子である VEGF の発現を亢進することなどが報告されている¹⁹。また、VEGF が Snail 発現を介した上皮間葉転換に重要な役割を果たしていること、MMP-9 が細胞骨格のリモデリングや基底膜の破壊だけでなく、上皮間葉転換を介したがん転移に深く関与していることも報告されている^{20,21}。これらの報告は FABP5 と上皮間葉転換の関連性を惹起させるものであり、今回の検討で裏付けしたと考えられる。

ほとんどの肝細胞癌は慢性肝炎か肝硬変から発症するものであり、HBV, HCV による肝炎ウイルスあるいはアルコールが慢性肝炎や肝硬変の主な原因であった^{22,23}。近年はウイルス性肝炎の治療が発達してきており、non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) あるいは nonalcoholic steatohepatitis (NASH) を基盤とした肝細胞癌の増加が懸念されている²⁴⁻²⁶。NAFLD による肝細胞癌の危険因子として肥満、2 型糖尿病、メタボリックシンドロームが報告されている^{27,28} が、最近では遊離脂肪酸が NAFLD、HCV による肝細胞の脂肪化、HBV 由来肝細胞癌の原因として報告されてきている²⁹⁻³¹。今回の検討は腫瘍が形成されてからの悪性度に FABP5 が関わっていることを示したものであるが、FABP はレチノイン酸や長鎖脂肪酸に結合することから、FABP が発癌にも関わっていることが推察される。従って、FABP5 がメタボリックな発癌抑制および肝細胞癌の治療において新たなターゲットとして強く期待することができる。

本研究では、FABP5 が肝細胞癌において予後再発に関係していること、上皮間葉転換により浸潤転移に関わっていることを示した。これらの知見から肝細胞癌再発抑制のための分子ターゲットとしての臨床応用が期待される。

【総括および結論】

1. 臨床的に **FABP5** が高発現である症例は優位に予後不良であり、再発率も高かった。
2. 臨床病理学的に **FABP5** 発現と顕微鏡的脈管侵襲、分化度、腫瘍径、血清 **AFP** 値、血清 **PIVKA-II** 値と相関を示した。
3. 単変量・多変量解析において **FABP5** は独立した予後不良因子であり最も強力な再発因子でもあった。
4. *In vitro* において **FABP5** は細胞の浸潤・遊走・増殖に重要な役割を果たしていることを解明した。
5. 肝細胞癌において **FABP5** 発現が腫瘍形成ならびに転移促進に重要な役割を果たしていることを *in vivo* で確認した。
6. **FABP5** に対する網羅的な分子生物学的解析において **FABP5** が上皮間葉転換に非常に重要な役割を果たしていることを確認した。
7. 今後は肝細胞癌における、**FABP5** とメタボリック発癌との関連性あるいは新たなバイオマーカーとしての **FABP5** の臨床応用が強く期待される。

【謝辞】

稿を終えるにあたり、研究の御指導を頂きました北海道大学大学院研究科消化器外科学分野 I 武富紹信教授、神山俊哉准教授、横尾英樹助教、深井原特任助教に深く謝意を表します。また、貴重な御助言と技術的な御指導を賜りました同講座の皆様に厚く御礼申し上げます。

【引用文献】

1. 日本肝臓学会 肝がん白書平成 27 年度 (2015)
2. Eguchi, S., Takatsuki, M., Hidaka, M., Soyama, A., Tomonaga, T., Muraoka, I. & Kanematsu, T. Predictor for histological microvascular invasion of hepatocellular carcinoma: a lesson from 229 consecutive cases of curative liver resection. *World. J. Surg.* **34**, 1034-1038 (2010).
3. Fujii, K., Kondo, T., Yokoo, H., Yamada, T., Iwatsuki, K. & Hirohashi, S. Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics* **5**, 1411-1422 (2005).
4. Furuhashi, M. & Hotamisligil, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **7**, 489-503 (2008).
5. Sinha, P., Hutter, G., Kottgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D. & Lage, H. Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis* **20**, 2952-2960 (1999).
6. Li, Z., Huang, C., Bai, S., Pan, X., Zhou, R., Wei, Y. & Zhao, X. Prognostic evaluation of epidermal fatty acid-binding protein and calcyphosine, two proteins implicated in endometrial cancer using a proteomic approach. *Int. J. Cancer.* **123**, 2377-2383 (2008).
7. Fang, L. Y., Wong, T. Y., Chiang, W. F. & Chen, Y. L. Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral. Pathol. Med.* **39**, 342-348 (2010).
8. Morgan, E. A., Forootan, S. S., Adamson, J., Foster, C. S., Fujii, H., Igarashi, M., Beesley, C., Smith, P. H. & Ke, Y. Expression of cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: potential prognostic marker and target for tumourigenicity-suppression. *Int. J. Oncol.* **32**, 767-775 (2008).
9. Jing, C., Beesley, C., Foster, C. S., Chen, H., Rudland, P. S., West, D. C., Fujii, H., Smith, P. H. & Ke, Y. Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer. Res.*

- 61, 4357-4364 (2001).
10. Cheng, A.L., Guan, Z., Chen, Z., Tsao, C.J., Qin, S., Kim, J.S., Yang, T.S., Tak, W.Y., Pan, H., Yu, S., Xu, J., Fang, F., Zou, J., Lentini, G., Voliotis, D. & Kang, Y.K. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma according to baseline status: subset analyses of the phase III Sorafenib Asia-Pacific trial. *Eur J Cancer*. **48**, 1452-1465 (2012).
 11. Zhang, Y., Sun, Y., Rao, E., Yan, F., Li, Q., Zhang, Y., Silverstein, K. A., Liu, S., Sauter, E., Cleary, M. P. & Li, B. Fatty acid-binding protein E-FABP restricts tumor growth by promoting IFN-beta responses in tumor-associated macrophages. *Cancer. Res.* **74**, 2986-2998 (2014).
 12. Kannan-Thulasiraman, P., Seachrist, D.D., Mahabeleshwar, G.H., Jain, M.K. & Noy, N. Fatty acid-binding protein 5 and PPARbeta/delta are critical mediators of epidermal growth factor receptor-induced carcinoma cell growth. *JBC* **285**, 19106-19115 (2010).
 13. Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massague, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer*. **9**, 274-284 (2009).
 14. Baum, B., Settleman, J. & Quinlan, M. P. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **19**, 294-308 (2008).
 15. Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell.* **14**, 818-829 (2008).
 16. Larue, L. & Bellacosa, A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* **24**, 7443-7454 (2005).
 17. Jeong, C. Y., Hah, Y. S., Cho, B. I., Lee, S. M., Joo, Y. T., Jung, E. J., Jeong, S. H., Lee, Y. J., Choi, S. K., Ha, W. S., Park, S. T. & Hong, S. C. Fatty acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol. Rep.* **28**, 1283-1292 (2012).
 18. Uma, R. S., Naresh, K. N., D'Cruz, A. K., Mulherkar, R. & Borges, A. M. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue is associated with down-regulation of epidermal fatty acid binding protein (E-FABP). *Oral. Oncol.* **43**, 27-32 (2007).

19. Adamson, J., Morgan, E. A., Beesley, C., Mei, Y., Foster, C. S., Fujii, H., Rudland, P. S., Smith, P. H. & Ke, Y. High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene* **22**, 2739-2749 (2003).
20. Li, J., Yang, B., Zhou, Q., Wu, Y., Shang, D., Guo, Y., Song, Z., Zheng, Q. & Xiong, J. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. *Carcinogenesis* **34**, 1343-1351 (2013).
21. Yang, A. D., Camp, E. R., Fan, F., Shen, L., Gray, M. J., Liu, W., Somcio, R., Bauer, T. W., Wu, Y., Hicklin, D. J. & Ellis, L. M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* **66**, 46-51 (2006).
22. Cabibbo, G. & Craxi, A. Epidemiology, risk factors and surveillance of hepatocellular carcinoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **14**, 352-355 (2010).
23. Bosch, F. X., Ribes, J., Cleries, R. & Diaz, M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin. Liver. Dis.* **9**, 191-211 (2005).
24. Hashimoto, E., Yatsuji, S., Tobari, M., Taniai, M., Torii, N., Tokushige, K. & Shiratori, K. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Gastroenterol.* **44 Suppl 19**, 89-95 (2009).
25. Chitturi, S., Farrell, G. C., Hashimoto, E., Saibara, T., Lau, G. K. & Sollano, J. D. Non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: definitions and overview of proposed guidelines. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 778-787 (2007).
26. Amarapurkar, D. N., Hashimoto, E., Lesmana, L. A., Sollano, J. D., Chen, P. J. & Goh, K. L. How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 788-793 (2007).
27. Starley, B. Q., Calcagno, C. J. & Harrison, S. A. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* **51**, 1820-1832 (2010).
28. Ahmed, M. H., Husain, N. E. & Almobarak, A. O. Nonalcoholic Fatty liver disease and risk of diabetes and cardiovascular disease: what is important for primary care physicians? *J. Family. Med. Prim. Care.* **4**,

- 45-52 (2015).
29. Koo, S. H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatol.* **19**, 210-215 (2013).
 30. Mandair, D. S., Rossi, R. E., Pericleous, M., Whyand, T. & Caplin, M. The impact of diet and nutrition in the prevention and progression of hepatocellular carcinoma. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 369-382 (2014).
 31. Zhao, J., Zhao, Y., Wang, H., Gu, X., Ji, J. & Gao, C. Association between metabolic abnormalities and HBV related hepatocellular carcinoma in Chinese: a cross-sectional study. *Nutr. J.* **10**, 49 (2011).