

機関番号：15201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20590722

研究課題名 (和文) バレット食道の病態に対する逆流胆汁と脂肪酸合成酵素の関わり

研究課題名 (英文) Relationship between reflux vile acids and fatty acid synthase  
in the pathogenesis of Barrett' s esophagus

研究代表者

天野 祐二 (AMANO YUJI)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80284032

研究成果の概要 (和文)：

Barrett食道におけるfatty acid synthase (FASn)発現とその意義、逆流胆汁組成のBarrett食道の病態に及ぼす影響について内視鏡的臨床研究とBarrett腺癌cell line及びラットBarrett食道モデルにおける基礎検討を中心に研究をすすめた。内視鏡的にBarrett食道を有する症例のBarrett粘膜を生検し、免疫染色及びRT-PCRにてFASnの発現の有無をチェック、種々の臨床的及び病理組織学的因子との関連を多変量解析した。その結果、FASnの発現は逆流性食道炎を有すること、腸型ムチン形質及びCdx2発現、細胞増殖亢進、apoptosis抑制と相関し、その発現がBarrett食道の病態生理・発癌に深く関与する可能性を示すことが判明した。一方で、Barrett食道の病態は胃酸のみならず、逆流胆汁によっても規定されると報告されるが、その詳細については明らかにされていない。胃ではFASnの発現が胆汁逆流と関連する腸上皮化生に強く認められることから、Barrett食道においても、胆汁とFASnとの関与が示唆される。そこでBarrett食道cell lineにおけるFASnの発現は、酸の単独添加よりも有意に胆汁との混合添加時に高濃度に観察され、Barrett食道の病態に及ぼす因子としての胆汁の意義は、重大なものがあることを確認し、これをFatty acid synthase expression in Barrett' s esophagus: implications for carcinogenesisとしてJ Clin Gastroenterolに発表した。また、kruppel-like factor 4を介したBarrett食道発現系の検討でも、同様に胆汁の役割は大きく、これもGutにRoles of Kruppel-like factor 4 in oesophageal epithelial cells in Barrett' s epithelium developmentとして報告した。最後に臨床材料において、内視鏡的Barrett食道及び逆流性食道炎の有無と胃内逆流胆汁の胆汁酸組成との関連を検討した。その結果、疎水性の胆汁逆流は逆流性食道炎を介して食道粘膜の障害に関与し、その結果、BMP-4発現由来のバレット食道発生において初段階で影響を与える可能性が示唆されるとともに、COX-2発現や細胞増殖亢進による発癌過程への関与も証明された (Dig Liv Dis: Impact of the composition of gastric reflux bile acids on Barrett' s esophagus)。そして、これらのプロセスは親水性胆汁酸であるUDCA投与にて軽減される可能性も判明し、今後の研究に続くものであった。

研究成果の概要 (英文)：

FASn expression in Barrett' s esophagus was accelerated by the mixture of bile acids and related the malignant potential of Barrett' s carcinogenesis. The predictors of FASn expression were reflux esophagitis, intestinal mucin-phenotype, Cdx2 expression, accelerated cellular proliferation inhibited apoptosis (accepted by J Clin Gastroenterol). Moreover, in the various kinds of bile acids, hydrophobic ones (LCA, GLCA, TLCA) acted as cytotoxic for Barrett' s esophagus, and hydrophilic ones (UDCA, GUDCA, TUDCA) did as cytoprotective. Therefore, UDCA administration may protect the Barrett' s carinogenesis (accepted by Digestive Liver Disease).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：バレット食道、発生・分化、癌

1. 研究開始当初の背景

現在欧米において、最も増加率の高い癌は Barrett 腺癌であり、その発生母地となっているのは食道胃逆流症 (GERD) を由来とする Barrett 食道である。近年、本邦では高齢化社会および若年層の *H. pylori* 感染率の低下を背景に、GERD 症例が急激に増加しており、今後本邦においての Barrett 食道有病率の上昇、更には Barrett 腺癌発癌の増加を懸念することは自然な成り行きと考えられる。このような現況は、すでに本症に対する本邦なりの準備が必要な時期にきていると言わざるを得ない。私共はこれまでに、本邦における Barrett 食道・Barrett 腺癌の頻度、前癌状態である Barrett 食道の病態生理の解明、内視鏡的 surveillance の在り方について検討し、以下の如く一定の成果を上げてきた。

現在の Barrett 食道の内視鏡による surveillance 法は、粘膜を at random に生検する方法が、唯一コンセンサスの得られた標準手技であるが、本法の安全性及びコストの面での問題点は指摘されて久しい状況にある。私共は、Barrett 食道の surveillance に Crystal violet 色素内視鏡を用い、Barrett 食道を高い感受性と特異性をもって検出できることを実証し、その臨床的有用性を報告した (Amano, et al. Am J Gastroenterol 2005)。さらに、Crystal violet 色素内視鏡を用いた Barrett 食道の新しいピットパターン分類法を考案し、発癌ポテンシャルの高い Barrett 食道を簡便に同定する方法も確立した (Yuki, Amano, et al. Dig Liv Dis 2006)。また、ムチン形質により Barrett 食道を胃型、腸型に分類し、さらに COX-2 の発現パターンおよび細胞増殖や apoptosis の評価から Barrett 食道の発癌ポテンシャルを検討した結果、腸型ムチン形質で COX-2 の発現する Barrett 食道が最も高い発癌ポテンシャルを持ち、surveillance の対象となるべき Barrett 食道であることを証明した (Amano,

et al. Aliment Pharmacol Ther 2004)。また、本邦におけるムチン形質別にみた Barrett 食道の疫学データもまとめた (Amano, et al. Scand J Gastroenterol 2006)。以上の結果と経過から、私共の Barrett 食道研究の焦点は、「診断」から「治療」へと変遷する時期を迎えている。

今日、Barrett 食道を消褪させる治療法については、欧米を中心に盛んに検討されている。Proton pump inhibitor を中心とする制酸剤の投与が、Barrett 食道を縮小させる可能性が高いとの報告が多いものの反論もあり、十分なコンセンサスを得るに至っていない。私共も、2004 年度科学研究費の補助を受け、Barrett 食道を縮小の根幹である Barrett 上皮の再扁平上皮化についての研究を進め、その結果、再扁平上皮化を起こしやすい臨床的因子を究明した (Amano, et al. J Gastroenterol Hepatol 2007)。さらに、遺伝子レベルでの検討も行い、再扁平上皮化の因子のひとつが、Reg 遺伝子の発現である可能性を明らかにした (Chinuki, Amano, et al. J Gastroenterol Hepatol in press)。また、hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  は酸性条件化で活性を受けることから、酸逆流と関連があると考え、Barrett 食道において同様に検討を加え、Barrett 食道の病態との関連を確認している (Moriyama, Amano, et al. J Gastroenterol Hepatol in press)。この HIF-1 $\alpha$  は fatty acid synthase (FAS) によって規定されることが報告されているが、癌組織での FAS 高発現による脂肪酸合成は低酸素を誘発し、その結果 HIF-1 $\alpha$  を解した血管新生などの反応に繋がる。また、FAS は各種臓器癌で発現することは広く知られているが、胃の腸上皮化生での発現も報告され、胆汁逆流との関連が注目された (Kasukabe, et al. Histopathology 2002, Hashimoto, et al. Pathobiology 2004)。従って、FAS が胆汁逆流を介して、Barrett 腸上皮化生の成熟

及び発癌に関与することも示唆される。

## 2. 研究の目的

Barrett 食道における胆汁逆流と fatty acid synthase の関連を臨床的因子及び分子生物学的因子のレベルから詳細に検討することは、Barrett 食道の成熟・発癌の機序を明らかにする有用な研究の一つであると考えられる。また、fatty acid synthase には数種類の阻害薬が存在することから、本研究は Barrett 食道に対する molecular targeting therapy 実現の可能性を持つものと期待している。また、fatty acid synthase の活性に関与する逆流胆汁の組成そのものも Barrett 食道の成熟・発癌に関与する可能性は、古くより議論されているが、人モデルで検討されたことがない。その解明と逆流胆汁組成の改善も治療応用の可能性を持つ。

## 3. 研究の方法

(1) 逆流胆汁組成と Barrett 食道及び逆流性食道炎有病率の検討：

内視鏡的 Barrett 食道 (BE) 100 症例、非 BE 症例 50 例をエントリー、全例に内視鏡検査時に胃液を採取し、これを胆汁酸分析する。胆汁酸分析は高速ガスクロマトグラフィーでオキシコール酸、タウロコール酸、ウロコール酸、リコール酸を測定し、リコール酸群/ウロコール酸群の非を算定し、Barrett 食道・逆流性食道炎の存在に影響を及ぼす因子を検討した。

また、生検組織による免疫組織化学的検討として、扁平上皮・円柱上皮の狙撃生検材料を用いて、BMP-4, Fatty acid synthase, PCNA の免疫染色を行う。

(2) Fatty acid synthase 発現と逆流胆汁の関連に関する内視鏡学的疫学調査：

内視鏡検査施行時に Barrett 食道の有無により 2 群に分類し、それぞれの群で胃液を採取し、その胆汁酸分析及び FAS 濃度の測定を行う。また、各群とも Barrett 食道、下部食道扁平上皮を生検採取し、免疫染色にて FAS のほか、腸上皮分化のマーカーである homeobox 遺伝子 Cdx1, Cdx2 の蛋白発現を検討する。Barrett 食道の有無による胃内逆流の胆汁酸組成の違い及び FAS 濃度を明らかにすると共に、扁平上皮における Cdx1, Cdx2 発現との関連を検討する。一方、Barrett 食道については、FAS の発現と発癌リスクについて、細胞増殖・apoptosis・COX-2 発現などより評価する。

(3) Cell line による Barrett 食道における fatty acid synthase (FAS) の分子生物学的評価：

Barrett 腺癌 cell line における FAS 発現の役割を基礎検討により証明された COX-2 の発現との関連を中心に、細胞増殖・apoptosis

などについて評価・確認する。

## 4. 研究成果

(1) 内視鏡的に Barrett 食道を有する症例の Barrett 粘膜を生検し、免疫染色及び RT-PCR にて fatty acid synthase の発現の有無をチェック、種々の臨床的及び病理組織学的因子との関連を多変量解析した。その結果、fatty acid synthase の発現は逆流性食道炎を有すること、腸型ムチン形質及び Cdx2 発現、細胞増殖亢進、apoptosis 抑制と相関し、その発現が Barrett 食道の病態生理・発癌に深く関与する可能性を示すことが判明した。一方で、Barrett 食道の病態は胃酸のみならず、逆流胆汁によっても規定されると報告されるが、その詳細については明らかにされていない。胃では fatty acid synthase の発現が胆汁逆流と関連する腸上皮化生に強く認められることから、Barrett 食道においても、胆汁と fatty acid synthase との関与が示唆された。そこで Barrett 食道 cell line における fatty acid synthase の発現検討では、酸の単独添加よりも有意に胆汁との混合添加時に高濃度に観察され、Barrett 食道の病態に及ぼす因子としての胆汁の意義は、重大なものがあることを確認し、これを Fatty acid synthase expression in Barrett's esophagus: implications for carcinogenesis として J Clin Gastroenterol に発表し accept された。

(2) kruppel-like factor 4 を介した Barrett 食道発現系の検討でも、同様に胆汁の役割は大きく、Barrett 食道形成に MUC2 発現に続く kruppel-like factor 4 発現の関与を解明し、Gut に Roles of Kruppel-like factor 4 in oesophageal epithelial cells in Barrett's epithelium development として報告した。

(3) 最後に臨床材料において、内視鏡的 Barrett 食道及び逆流性食道炎の有無と胃内逆流胆汁の胆汁酸組成との関連を検討した。その結果、疎水性の胆汁逆流は逆流性食道炎を介して食道粘膜の障害に関与し、その結果、BMP-4 発現由来の Barrett 食道発生において初段階で影響を与える可能性が示唆されるとともに、COX-2 発現や細胞増殖亢進による発癌過程への関与も証明された (Dig Liv Dis: Impact of the composition of gastric reflux bile acids on Barrett's esophagus)。そして、これらのプロセスは親水性胆汁酸である UDCA 投与にて軽減される可能性も判明し、今後の研究に続くものであった。

## 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 5 件)

- 1) Norihisa Ishimura, Yuji Amano, Alvaro A Sanchez-Siles, et al. Fatty acid synthase expression in Barrett's esophagus: implications for carcinogenesis. Journal of Clinical Gastroenterology (in press), 査読有
- 2) Yoshiko Takahashi, Yuji Amano, Norihisa Ishimura, et al. Impact of the composition of gastric reflux bile acids on Barrett's esophagus. Digestive Liver Disease (in press), 査読有
- 3) Hidearki Kazumori, Shunji Ishihara, Yuji Amano, et al. Roles of Kruppel-like factor 4 in oesophageal epithelial cells in Barrett's epithelium development. Gut (in press), 査読有
- 4) Rahman FB, Kadowaki Y, Amano Y, et al. Fibroblast-derived HB-EGF promotes Cdx2 expression in esophageal squamous cells. Lab Invest. 2010;90:1033-48. ), 査読有
- 5) Rahman FB, Ishihara S, Amano Y, et al. Heparin-binding EGF-like factor augments esophageal epithelial cell proliferation, migration and inhibits TRAIL-mediated apoptosis via EGFR/MAPK signaling. Scand J Gastroenterol. 2010;45:1350-9. ), 査読有

[学会発表] (計7件)

- 1) Yuji Amano, Yoshiko Takahashi, Norihisa Ishimura, et al. Impact of the Composition of Gastric Reflux Bile Acids on Erosive Esophagitis and Barrett's Esophagus. DDW 2010, May 1-6, 2010, New Orleans, USA, 査読有
- 2) Yuji Amano, Norihisa Ishimura, Y. Takahashi, et al. What does a mucosal pit pattern mean in Barrett's esophagus? DDW 2009, May 30-June 4, Chicago USA, 査読有
- 3) 高橋芳子, 天野祐二, 他. 胃内逆流胆汁組成の GERD 関連疾患に及ぼす影響. 第5回日本消化管学会 2009. 02.12. 査読有
- 4) 石村典久, 天野祐二, 木下芳一. Barrett 食道癌予防を目的とした本邦独自のサーベイランス法の確立. 第95回日本消化器病学会総会ワークショップ, 2009. 05. 07. 査読有
- 5) Yuji Amano, Yoshiko Takahashi, Norihisa Ishimura, et al. Fatty acid synthase expression in Barrett's esophagus and its detection of endoscopic surveillance. DDW 2008, May 30, San Diego, USA, 査読有
- 6) 石村典久, 天野祐二, 木下芳一. 本邦の Barrett 食道内視鏡診断は柵状血管で行われるべきか, 胃のヒダで行われるべきか. 第50回日本消化器病学会大会ワークショップ, 2009. 05. 07. 査読有
- 7) 天野祐二. 教育講演. 食道胃接合部内視

鏡診断の現況と問題点. 第7回日本消化管学会 2011.02.18.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

天野 祐二 (AMANO YUJI)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号: 80284032