

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590783

研究課題名（和文） 食道・胃接合部で限局性に発生する一酸化窒素による発癌への影響

研究課題名（英文） Carcinogenic effect of nitric oxide generated luminally at gastro-esophageal junction of human

研究代表者：飯島 克則 (IIJIMA KATSUNORI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60375003

研究成果の概要（和文）：

ヒトでは、硝酸塩を多く含む食物を摂取すると、食後数時間にわたり、食道・胃接合部内腔、高濃度の一酸化窒素 (NO) が発生することが知られている。今回の研究では、この NO は周囲組織の傷害（逆流性食道炎）、前癌状態である異型性（バレット食道）を増悪させること、さらに、その作用には雌雄差（雄優位）が存在することが明らかになった。ヒトの食道・胃接合部で発生する癌も著明な男女差（男性優位）があることが知られており、今後、NO による発癌に至る過程の研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：

At the human gastro-esophageal junction, nitric oxide (NO) is generated luminally during several hours after the ingestion of dietary nitrate. The present study demonstrated that exogenous luminal nitric oxide could be involved in the pathogenesis of reflux esophagitis and Barrett's esophagus, a precursor lesion of esophageal adenocarcinoma, and that the action caused by the NO presented the prominent gender difference. Since gender differences consistently exist in carcinogenesis at gastro-esophageal junction in human, understanding the mechanism by which action of NO on the esophageal epithelium could induce the gender difference should provide valuable information regarding the pathogenesis of esophageal adenocarcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：消化器内科学

## 1. 研究開始当初の背景

食道腺癌を含む食道・胃接合部領域に発生する癌は、近年、欧米を中心に急速に増加しており、本邦においても近い将来、その増加が危惧されている。こうした癌の特徴として、食道・胃逆流症(GERD)が発癌リスクを著明に増加させることが知られている。現在、発癌の病態発生に関して、食道内へ逆流する胃酸、ペプシン、胆汁酸に着目した検討が広く進められているが、いまだその原因は不明である。私はこれまで、ヒトの食道・胃接合部では限局性に高濃度の一酸化窒素(NO)が発生していることを報告して以来、このNOがこの領域の発癌に関連している可能性に関しての検討を続けてきた。ヒトでは、硝酸塩を多く含む食物を摂取すると、硝酸塩の唾液～腸管再循環により食後数時間にわたり唾液中に高濃度の亜硝酸塩が存在し、それが食道・胃接合部でアスコルビン酸を含む強酸性の胃液と瞬時に化学反応して、同部に限局して数十 $\mu$ Mに達する高濃度のNOが数時間にわたり発生している。さらに、この上部消化管内腔でNOの発生は、亜硝酸塩を含む中性の唾液が、強酸性の胃液と初めて出会う部位でおきるため、GERDを有する症例では、NOの発生は下部食道に移る。私は、これまでの一連の実験結果から、食道・胃接合部の内腔で発生したNOは周囲組織に拡散し、同部の病態に深くかかわっていることを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

今回の研究期間では、我々は、初めに、ラット逆流性食道炎モデルを用いて、食道内腔で発生したNOによる逆流性食道炎に及ぼす影響を検討し、慢性のNO暴露が逆流性食道炎による組織障害を著明に増悪させることを明

らかにした(論文6)また、NOによる食道粘膜傷害の機序として、ラット食道上皮を用いた検討で、食道管腔側で発生したNOが、食道上皮内に拡散し、NOが食道粘膜上皮の細胞間隙拡大を引き起こし、食道粘膜上皮の防御機構を破綻させる可能性についても明らかにした(論文2)。

バレット食道は逆流性食道炎を介して発生し、食道粘膜が扁平上皮から円柱上皮に置換された状態であり、食道腺癌の前癌病変と考えられている。食道に対するNO暴露によって、逆流性食道炎、食道粘膜傷害が増悪することが明らかとなったが、それに引き続くバレット食道に及ぼす影響を検討することは、その後の発癌への可能性と関連して重要である。我々の当初用いたラット逆流性食道炎モデルは生存期間が10日前後と短い為、逆流性食道炎に引き続くバレット食道・腺癌発生に与える影響を評価することができない。そこで、長期間の生存が可能であるバレット食道/腺癌モデル(ラット慢性炎症モデル)を用い、食道内腔で発生するNOとバレット食道発生に及ぼす影響についての検討を行った。

また、NOによる逆流性食道炎に及ぼす検討を進めたところ、外因性NOのラット逆流性食道炎に対する作用には大きな雌雄差があり、雄で組織傷害が著明にみられることを見出した。これは、ヒトで食道腺癌、バレット食道、びらん性逆流性食道炎といった胃・食道逆流症(GERD)関連疾患がいずれも著明に男性優位である疫学報告と一致しており、重要な知見と考えられた。よって、ヒト食道腺癌の病態発生を解明するために、ラット雌雄差が生じる機序を明らかにすることが重要であると考え、雌雄差の生じる機序についての検討をあ

わせて行った。

### 3. 研究の方法

実験1：食道に酸性の胃十二指腸混合物の逆流がおこることが証明されたラットバレット食道モデルを用い、外因性 NO の暴露の有無によりバレット食道発生にどのような影響があるかを検討した。

方法：ラットバレット食道モデルを作成後、術後1週目に0.05%亜硝酸塩+1%アスコルビン酸投与群（NO群）と非投与群（Control群）とに分け、食道の炎症所見、バレット食道の発生率について振り分け後2週、4週、8週の段階で比較検討を行った。炎症所見は炎症面積率と炎症スコアで肉眼的に評価し、バレット食道の有無は組織学的に評価を行い、バレット食道の面積の指標としてバレット食道 Area index (AI) を算出した。また、バレット食道と診断した検体については CDX2、MUC2、MUC6 による免疫組織学的評価も併せて行った。

実験2：雌雄ラットの酸逆流性食道炎モデルを用いて、外因性 NO 暴露の有無による雌雄間での食道粘膜傷害の程度の違い、さらに食道粘膜傷害に対するエストロゲンの影響について検討し、実際のヒトにおける胃食道逆流症（GERD）関連疾患の病態と結びつけることを目的とした。

方法：雌雄のラットを用いて確立された逆流性食道炎モデルを作製し、食道内腔を食道傷害増悪因子である外因性 NO に暴露させるために、モデル作製ラットの半数にアスコルビン酸と亜硝酸ナトリウムを投与した。7日後に食道を摘出し、食道粘膜傷害面積および傷害部位におけるミエロペルオキシダーゼ

（MPO）活性を測定し、食道粘膜傷害の程度を評価した。また、雄ラットや卵巣を摘出し

た雌ラットに対して逆流性食道炎モデルを作製後、エストロゲン製剤である

17 $\beta$ -estradiol を投与し、全てのラットを外因性 NO に暴露させて同様に評価を行った。さらに、傷害部位における各種炎症性サイトカイン濃度も測定し比較検討した。

### 4. 研究成果

実験1では、食道へ胃酸の逆流がおこるラットのバレット食道モデルにおいて、亜硝酸塩とアスコルビン酸の投与により下部食道で発生する外因性の NO が、食道の炎症所見を増強し、バレット食道の出現するタイミングを早め、さらにその範囲も拡大することを、術後比較的早期の段階で検討を行うことで明らかにした。このことは唾液中の亜硝酸塩に由来する外因性の NO がバレット食道発生に関わる新たな因子となりうることを示している。今回我々がバレット食道と診断した組織は免疫組織学的にヒトにおける特殊円柱上皮の所見に一致し、これらは将来的に食道腺癌のリスクとなりうると考えられるため、下部食道で発生する NO がバレット食道のみならず、食道腺癌の促進因子にもなっている可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられた。以上の研究結果は論文3、4に掲載された。

次に実験2では、卵巣を摘出した雌ラットなどを用いた実験によって、外因性 NO の食道粘膜傷害増悪作用に対してエストロゲンが抑制的に働いていることが明らかとなった。また、エストロゲンは、食道組織中の肥満細胞の作用、そして炎症性サイトカインの作用を抑制することで食道での炎症の発現を抑制していることが明らかとなった。そして、炎症性サイトカインのうち、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) が食道粘膜傷害の程度と最もよく相関していた。これらの実

験結果は、GERD 関連疾患モデル動物を用いて食道粘膜傷害の雌雄差を示した報告は初めてであり、今回認められたエストロゲンの抗炎症作用が、ヒトにおける GERD 関連疾患の性差にも深く関与していると考えられた。これらの実験結果は文献 1 に印刷中である。

#### 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 7 件)

1. Masaka T, Iijima K, Endo H, et al. Gender differences in esophageal mucosal injury in a reflux esophagitis model of rats. *Gut*. (査読有) 2012 (印刷中)
2. Ito H, Iijima K, Ara N, et al. Reactive nitrogen oxide species induce dilatation of the intercellular space of rat esophagus. *Scand J Gastroenterol*. (査読有) 2010;45(3):282-91.
3. Endo H, Iijima K, Asanuma et al. Exogenous luminal nitric oxide exposure accelerates columnar transformation of rat esophagus. *Int J Cancer*. (査読有) 2010;127:2009-19.
4. 飯島克則、遠藤博之、浅沼清孝、他. Barrett 食道/腺癌の発生に NO はどうかかわるか。分子消化器病 (査読無) 2010; 7: 344-349.
5. 飯島克則、小池智幸、下瀬川徹、他. バレット腺癌の発生と発癌予防. 消化器の臨床 (査読無) 2010;13: 627-630.
6. Ishiyama F, Iijima K, Asanuma K, et al. Exogenous luminal nitric oxide exacerbates esophagus tissue damage in reflux esophagitis model of rats. *Scand J Gastroenterol*. (査読有) 2009;44(5):527-537.

7. Terai S, Iijima K, Asanuma K, et al. Lack of modulation of gastric emptying by dietary nitrate in healthy volunteers. *Tohoku J Exp Med*. (査読有) 2009;218(1):73-9.

[学会発表] (計 3 件)

1. K. Iijima, H. Endo, K. Asanuma, et al. Exogenous luminal nitric oxide exposure accelerates columnar transformation of rat esophagus. 第 6 回国際 NO 学会学術集会. 京都 2010/06/14~2010/06/18
2. 真坂智寛、飯島克則、荒誠之、他. ラット逆流性食道炎における雌雄間での食道粘膜傷害に違いについて. JDDW2010. 2010/10/13-10/15. 横浜
3. 遠藤博之、飯島克則、浅沼清孝、他. 外因性 NO によるバレット食道発生に対する影響について. JDDW2009. 2009/10/14-10/17. 京都

[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

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 克則 (IIJIMA KATSUNORI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60375003

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし