

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10日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790638

研究課題名（和文） 肥満に関連した分子異常を標的とした消化器発癌予防に関する研究

研究課題名（英文） Targeting obesity-related metabolic abnormalities for chemoprevention of colorectal cancer and hepatocellular carcinoma

研究代表者

清水 雅仁（SHIMIZU MASAHIRO）

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90402198

研究成果の概要（和文）：

我々は本研究で、インスリン抵抗性、IGF/IGF-1 受容体シグナルの過剰活性、アディポカインの不均衡、慢性炎症状態の惹起等、肥満や糖尿病に関連した様々な病態・分子異常が、大腸および肝発癌に深く関与していること（発癌高危険群のスクリーニングに有用であること）、また分岐鎖アミノ酸製剤等の薬剤投与や栄養学的介入によって、これらの分子異常を改善・制御することが、肥満や糖尿病合併患者の大腸および肝発癌予防に繋がる可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Obesity- and diabetes-related metabolic abnormalities, including insulin resistance, alterations in the IGF-1/IGF-1 receptor axis, state of chronic inflammation, and occurrence of adipokine imbalance, increase the risk of colorectal cancer and hepatocellular carcinoma. Therefore, improvement of these metabolic abnormalities by either pharmaceutical or nutritional intervention, such as supplementation with branched-chain amino acids, may be an effective strategy to prevent the development of colorectal cancer and hepatocellular carcinoma in obese individuals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：(1)肥満 (2)発癌予防 (3)大腸癌 (4)肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、食生活を含めた生活習慣の欧米化により、我が国においても近年著しい増加傾向を示しているが、特にエネルギーの過剰摂取に伴う「肥満」が、大腸発癌の重要な risk factor の一つであることが、いくつかの疫学および基礎研究で明らかになってきている。また肝細胞癌においても、肥満や脂肪肝炎、高インスリン血症の合併が、その発癌に深く関与していることが報告されているが、特に肥満や糖尿病患者により多く認められる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: nonalcoholic steatohepatitis) は、肝癌の発生母地として近年高い注目を集めている。

肥満がこれらの発癌に及ぼす具体的なメカニズムとしては、①インスリン抵抗性の出現、②IGF/IGF-1 受容体シグナルの過剰活性化、③アディポカインの不均衡、④内臓脂肪の増加に伴う慢性炎症状態の惹起、⑤酸化ストレスの亢進等が挙げられるが、これらの報告は、大腸癌や肝細胞癌をはじめとするある種の癌は「生活習慣病」としての一面を有することを証明するとともに、肥満・糖尿病に関連した分子異常を標的とした、新たな大腸および肝発癌予防法 (薬) の可能性を強く示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究は、肥満・糖尿病に関連した分子異常が大腸および肝発癌に及ぼす影響について詳細な検討を行い、これらの発癌の予測因子として簡便かつ特異性の高い biomarker を肥満・糖尿病関連分子異常の中に見出すことで、発癌高危険群のスクリーニングを可能とし、さらには、それらの分子異常を制御・改善する薬剤や機能性食品を用いた新規大腸および肝発癌予防薬 (法) を開発することで、積極的に肥満に関連した発癌予防を実践し、肥満・糖尿病患者の予後改善を目指すことを目標とする。

肥満や糖尿病をはじめとする生活習慣病に関連した大腸および肝臓癌の増加は、現代社会における大きな問題であり、有効な肥満・糖尿病関連発癌予防薬 (法) の確立は、今後の予防医学の発展や包括的な癌治療戦略を構築していく上で、非常に重要な研究課題である。肥満関連分子異常を標的とする大腸および肝発癌予防の可能性と有効性を明らかにし、分子生物学的考察に基づいた evidence と biomarker を臨床の場に提示することが、本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

① 緑茶カテキン EGCG による大腸癌細胞増殖抑制と、IGF-1R および VEGFR2 シグナル活性化制御に関する検討 (*in vitro* study)

肥満に伴う分子異常の一つとして、IGF-1R や VEGFR2 をはじめとする受容体型チロシンキナーゼと、その下流に位置する細胞内シグナル (ERK, Akt, GSK-3 β 等) の過剰活性化が報告されている。そこで、EGCG が IGF-1R や VEGFR2、さらにはそれらの細胞内シグナルの活性状態を制御することで大腸癌細胞の増殖を抑制するか検討した。

② 分岐鎖アミノ酸製剤をはじめとする各種薬剤による肥満関連大腸および肝発癌抑制に関する検討 (*in vivo* study)

2型糖尿病モデルマウスである *db/db* mice に、大腸発癌物質である azoxymethane、または肝発癌物質である diethylnitrosamine を投与し、肥満関連大腸および肝発癌モデルを作製したのち、各種薬剤 {1. EGCG、2. 肥満を伴った肝硬変患者の肝発癌を抑制する分岐鎖アミノ酸製剤、3. 脂質異常症治療薬として臨床で広く使用されている HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (Pitavastatin)、4. 肝発癌予防薬としての臨床試験が行われている非環式レチノイド (ペレチノイン)、5. 降圧剤として用いられている Renin-angiotensin 系阻害剤 (captopril, telmisartan)、6. ターメリックの黄色色素ポリフェノールであるクルクミン} をそれぞれ投与し、これらの薬剤の肥満関連発癌に対する抑制効果について検討した。

③ 肝細胞癌治療後早期再発に関与する肥満関連分子異常の同定 (臨床試験)

肝癌の病期進行や、治療後の早期再発に関与する肥満関連分子異常 (biomarker) を同定するために、肝細胞癌患者の保存血清を解析した。特にインスリン抵抗性と、アディポカインの一つである血清レプチンおよびビスファチン値について検討した。

4. 研究成果

まず基礎研究の成果であるが、細胞株を用いた実験において、EGCG が HIF-1 α の発現と IGF-1/IGF-1R および VEGF/VEGFR2 の活性化を抑制し、ERK および Akt のリン酸化を阻害することで、大腸癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、肝癌細胞をビスファチンで刺激すると細胞増殖活性が誘導されること、また分岐鎖アミノ酸製剤は、GSK-3 β のリン酸化を抑制し、p21 の発現を増加させ、細胞周期停止 (G0/G1 期) とアポトーシスを誘導することで、ビスファチン刺激によって亢進したヒト肝癌細胞の増殖活性を抑制することを報告した。

次に動物実験において、Pitavastatin、captopril、telmisartan、およびクルクミンが、脂質異常の改善、血清アディポネクチンの上昇およびレプチンの低下、大腸粘膜および全身の慢性炎症状態の改善 (大腸粘膜の

TNF- α 、IL-6、IL-18、COX-2 の発現低下と血清 TNF- α 、IL-6、IL-18 の低下)、大腸粘膜における AMPK 蛋白の活性化と NF- κ B 活性の抑制、および酸化ストレスの抑制を介して、マウスの肥満関連大腸発癌を抑制することを明らかにした。また、分岐鎖アミノ酸製剤、EGCG、Pitavastatin、および非環式レチノイドは、マウスの肥満関連肝腫瘍形成を抑制したが、その作用機序として、インスリン抵抗性の改善、IGF/IGF-1 受容体シグナルの活性化抑制、血清レプチン値の低下、肝細胞の増殖活性抑制、レチノイド核内受容体 RXR α のリン酸化抑制、Ras/MAPK の活性化抑制、肝臓および全身の慢性炎症状態の改善 (肝および血清における TNF- α の低下)、および肝臓の脂肪蓄積と線維化の改善が認められた。さらに、*db/db* mice に家族性大腸腺腫症のモデルマウスである *Min/+* mice を交配し新規作製した動物モデル (*db/db*-*Min/+* mice) において、腸管腫瘍形成が著明に亢進すること、また ICR mice にグルタミン酸ナトリウムを投与すると腸管粘膜における IGF/IGF-1 受容体の発現が亢進し、azoxymethane による大腸前癌病変の発生が促進されることを報告した。特に前者に関しては、癌抑制遺伝子 *APC* の遺伝子異常と、肥満という環境異常の重複によって腸管腫瘍形成が促進される、よりヒトの肥満関連大腸発癌を反映した新規動物モデルと考えられた。

最後に臨床研究の成果であるが、根治的治療を行った Stage I の肝細胞癌患者を対象にした試験において、早期治療後再発の予測因子として、術前のインスリン抵抗性 (HOMA-IR 2.3 以上) と血清レプチン値の上昇 (5 ng/mL 以上) が有用であることを明らかにした。また血清ビスファチン値の上昇が、肝細胞癌の臨床病期の進行および腫瘍径の増大と、有意に相関していることを報告した。

食生活を含めた生活習慣の欧米化に伴い、本邦においても肥満や糖尿病、NASH のさらなる増加、ひいてはこれらの病態を背景とする大腸および肝細胞癌の増加が危惧されている。本研究において、すでに臨床で広く使用されている生活習慣病改善薬 (HMG-CoA 還元酵素阻害薬、Renin-angiotensin 系阻害剤) や分岐鎖アミノ酸製剤、有害事象も少なく日常生活で容易に摂取可能な緑茶カテキンやクルクミン、そして肝発癌予防薬として臨床応用が期待されている非環式レチノイドが、肥満・糖尿病に起因する様々な分子異常を改善し、肥満関連大腸および肝発癌を抑制したことは、積極的な介入による「予防」を含めた包括的な癌診療を考える上で大変興味深い結果と考えられる。これらの研究結果は、様々な薬剤や栄養学的介入、または機能性食品 (Nutraceutical approach) による肥満関連分子異常の改善が、大腸および肝発癌の有

効な予防法となりうる可能性を強く示唆するものである。

Metabolic factor の重複、インスリン抵抗性の出現、レプチン、ビスファチン等の血清アディポカインの異常などを検討することで発癌高危険群のスクリーニングを行い、各種生活習慣病改善薬 (降圧剤、脂質異常症治療薬、糖尿病治療薬等) や分岐鎖アミノ酸製剤、あるいは EGCG に代表されるファイトケミカルを用いた積極的介入による発癌予防を行えば、肥満や糖尿病患者の予後改善が期待できる。

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 18 件)

1. Shimizu M, Kubota M, Tanaka T, Moriwaki H. Nutraceutical approach for preventing obesity-related colorectal and liver carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 579-595.
2. Hata K, Kubota M, Shimizu M, Moriwaki H, Kuno T, Tanaka T, Hara A, Hirose Y. Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2012; 33: 702-707.
3. Kubota M, Shimizu M, Sakai H, Yasuda Y, Terakura D, Baba A, Ohno T, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Preventive effects of curcumin on the development of azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db obese mice. *Nutr Cancer* 2012; 64: 72-79.
4. Ninomiya S, Shimizu M, Imai K, Takai K, Shiraki M, Hara T, Tsurumi H, Ishizaki S, Moriwaki H. Possible role of visfatin in hepatoma progression and the effects of branched-chain amino acids on visfatin-induced proliferation in human hepatoma cells. *Cancer Prev Res* 2011; 4: 2092-2100.
5. Watanabe N, Takai K, Imai K, Shimizu M, Naiki T, Nagaki M, Moriwaki H. Increased levels of serum leptin are a risk factor for the recurrence of stage I/II hepatocellular carcinoma after curative treatment. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 49: 153-158.
6. Hata K, Kubota M, Shimizu M, Moriwaki H, Kuno T, Tanaka T, Hara A, Hirose Y. C57BL/KsJ-db/db-Apc mice exhibit an increased incidence of intestinal neoplasms. *Int J Mol Sci*

- 2011; 12: 8133-8145.
7. **Shimizu M**, Sakai H, Shirakami Y, Iwasa J, Yasuda Y, Kubota M, Takai K, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Acyclic retinoid inhibits diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BLKS/J- +(db)/+Lepr(db) mice. *Cancer Prev Res* 2011; 4: 128-136.
 8. **Shimizu M**, Sakai H, Shirakami Y, Yasuda Y, Kubota M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Hara Y, Tanaka T, Moriwaki H. Preventive effects of (-)-epigallocatechin gallate on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-*db/db* Mice. *Cancer Prev Res* 2011; 4: 396-403.
 9. **Shimizu M**, Yasuda Y, Sakai H, Kubota M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Kochi T, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Pitavastatin suppresses diethylnitrosamine-induced liver preneoplasms in male C57BL/KsJ-*db/db* obese mice. *BMC Cancer* 2011; 11: 281.
 10. **Shimizu M**, Adachi S, Masuda M, Kozawa O, Moriwaki H. Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 832-843.
 11. **Shimizu M**, Sakai H, Moriwaki H. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma by acyclic retinoid. *Front Biosci* 2011; 16: 759-769.
 12. Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Kawaguchi J, **Shimizu M**, Itani M, Nakamura M, Nishii Y, Yoshioka T, Hirose Y, Okano Y, Moriwaki H, Kozawa O. Ultraviolet irradiation can induce evasion of colon cancer cells from stimulation of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 2011;286:26178-26187.
 13. Kubota M, **Shimizu M**, Sakai H, Yasuda Y, Ohno T, Kochi T, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Renin-angiotensin system inhibitors suppress azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-*db/db* obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 410: 108-113.
 14. **Shimizu M**, Shirakami Y, Sakai H, Yasuda Y, Kubota M, Adachi S, Tsurumi H, Hara Y, Moriwaki H. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits growth and activation of the VEGF/VEGFR axis in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* 2010; 185: 247-252.
 15. Yasuda Y, **Shimizu M**, Shirakami Y, Sakai H, Kubota M, Hata K, Hirose Y, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Pitavastatin inhibits azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-*db/db* obese mice. *Cancer Sci* 2010; 101: 1701-1707.
 16. Iwasa J, **Shimizu M**, Shiraki M, Shirakami Y, Sakai H, Terakura Y, Takai K, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Dietary supplementation with branched-chain amino acids suppresses diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-*db/db* mice. *Cancer Sci* 2010; 101: 460-467.
 17. Imai K, Takai K, Nishigaki Y, Shimizu S, Naiki T, Hayashi H, Uematsu T, Sugihara J, Tomita E, **Shimizu M**, Nagaki M, Moriwaki H. Insulin resistance raises the risk for recurrence of stage I hepatocellular carcinoma after curative radiofrequency ablation in HCV-positive patients: A prospective, case-series study. *Hepato Res* 2010;40:376-382.
 18. Sakai H, Yamada Y, **Shimizu M**, Saito K, Moriwaki H, Hara A. Genetic ablation of Tnfalpha demonstrates no detectable suppressive effect on inflammation-related mouse colon tumorigenesis. *Chem Biol Interact* 2010; 184: 423-430.
- [学会発表] (計 5 件)
1. JDDW2011 (第 53 回日本消化器病学会大会)
2011 年 10 月 20 日~23 日、福岡
ワークショップ 18「消化器疾患における probiotics と機能性食品の有用性」
緑茶カテキンを用いた肥満関連大腸および肝発癌予防
清水雅仁、久保田全哉、森脇久隆
 2. がん予防大会 2011 京都
2011 年 6 月 20 日~21 日、京都
シンポジウム「がん予防戦略の最前線」
肥満関連分子異常を標的とした肝発癌化学予防
清水雅仁、森脇久隆
 3. 第 97 回日本消化器病学会総会
2011 年 5 月 13 日~15 日、新潟
ワークショップ 7「Steatohepatitis の病態~その多様性と相同性~」
非環式レチノイドによる肥満関連肝腫瘍形成の抑制
清水雅仁、森脇久隆
 4. 第 46 回日本肝臓学会総会
2010 年 5 月 27-28 日 山形
ワークショップ 5「肝発癌・進展とインスリン抵抗性」
インスリン抵抗性と IGF/IGF-1 受容体シグナルを標的とした肥満関連肝発癌予防

5. 清水雅仁、岩砂淳平、森脇久隆
第96回日本消化器病学会総会
2010年4月22-24日 新潟
シンポジウム2「消化器癌と栄養療法」
分枝鎖アミノ酸製剤 (BCAA) を用いた肥
満関連肝および大腸発癌の予防
清水雅仁、白木 亮、森脇久隆

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水雅仁 (Msahito Shimizu)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90402198

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし