

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：22701  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790374  
 研究課題名（和文） レプチンが大腸発がんに与える作用およびその分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Investigation of the mechanism underlying the effect of leptin on colorectal carcinogenesis

研究代表者

遠藤 宏樹（ENDO HIROKI）  
 横浜市立大学・附属病院・助教  
 研究者番号：70468164

研究成果の概要（和文）：マウス大腸発がんにおけるレプチンの作用は、レプチン受容体の欠損した正常の大腸上皮および前がん病変ではレプチンシグナルは伝達されず、腫瘍になって初めてレプチン受容体が発現し、レプチンシグナルが伝わるようになり STAT3 が活性化して腫瘍の増大に関与することを解明した。また、腫瘍でレプチン受容体が発現する契機となるイベントが Wnt 経路の活性化であることを実証した。

研究成果の概要（英文）：We clarified that leptin acts as a growth factor for colorectal cancer at stages subsequent to tumour initiation in colon carcinogenesis via leptin receptor/STAT3 pathway which was not activated in normal colonic epithelium and premalignant lesions because of lack of the leptin receptors, and then Wnt signalling contributes to the upregulation of leptin receptors in colonic epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：大腸発がん、レプチン

## 1. 研究開始当初の背景

大腸がんは近年わが国をはじめ欧米で急激に増加してきており、国内では 2004 年の年齢別調整死亡率では女性で 1 位、男性で 4 位となっており、本疾患が国民生活に与える影響はきわめて高く、その対策は急務である。大腸がんの発生に関して、運動不足や欧米食摂取に伴う肥満を背景とした生活習慣が大腸がんのリスクを押し上げるとする疫学・動物研究が数多く報告される一方で、これら肥満因子がどのようなメカニズムで大腸発がんを促進するのかはいろいろな仮説が報告されているがまだはっきりしていないのが現状である。

最近では内臓脂肪蓄積の結果起こる異常と

して、脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポサイトカインの分泌異常が注目されている。レプチンと大腸癌との関係に関しては、非癌群と発癌群の血清レプチン値との間に有意な相関を認めないが、レプチン高値群では大腸発癌のリスクが高い傾向があることが示されている。一方、血清レプチン値が正常者と比較し腺腫や癌患者で低値であることも報告されている。大腸癌患者と血清レプチン値についての関連を研究する際、血清レプチン値は癌進行に伴う食事摂取量の低下や体重減少の影響を受けるものであり、レプチンそのものによる発癌への作用についてはより入念な疫学調査や動物実験などによる解明が必要と考えられる。また最近で

はレプチンの血清値のほか受容体発現に注目した報告も散見される。腺腫や癌においてレプチン受容体が多く発現しており、これが大腸発癌に関与しているとするものもある。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでマウス発がんモデルにおける化学予防の研究を精力的におこなってきた (Gastroenterology 2004 ; 124 : 361-367) 今回の研究はこのマウス発がんモデルの研究のノウハウを用いてライフスタイルの因子、高脂肪食、レプチン上昇が大腸発がんをどのようなメカニズムで促進するかの分子メカニズムに迫ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) レプチン欠損状態での大腸腫瘍形成不全の現象の解析

我々は食餌性に高レプチン血症をきたすマウス (高脂肪食摂取ワイルドタイプマウス) を用いた大腸発がん実験で、これらのマウスが高レプチン血症をきたさないマウス (普通食摂取ワイルドタイプマウス) と比べ短期間に有意に多数かつ大きな腫瘍を形成し、しかも腺腫のみならず腺癌が形成されることを確認している。さらにレプチンが欠損したマウス (*ob/ob* マウス) を用いた発がん実験では、マウスは高度な肥満状態を呈するにも関わらず大腸腫瘍はほとんど形成されず、また形成される腫瘍も非常に微小であることを発見した。またレプチン受容体欠損マウス (*db/db* マウス) でも同様に腫瘍形成の顕著な抑制を認め、上記現象がレプチン受容体を介するものであることを突き止めている。さらに非肥満状態のマウスと比較し、肥満モデルマウス (高脂肪食摂取、*ob/ob*、*db/db* マウス) ではいずれも大腸前がん病変である aberrant crypt foci (ACF) 数が劇的に増加しており、上皮の増殖能を示す BrdU 取り込みも亢進していることを確認している。しかし上記の如く次の腫瘍形成の段階でレプチンシグナル亢進状態 (高脂肪食摂取) とシグナルが伝わらない状態 (*ob/ob*、*db/db*) との間に劇的な違いが生まれる。つまり、レプチンシグナルは大腸腫瘍の発育・増大の過程で非常に重要な役割を果たしていると考えられる。正常粘膜ではレプチンシグナルが伝達されておらず、腫瘍になると伝達されている可能性を示唆する所見である。

*Ob/ob* や *db/db* マウスは全身のレプチンやその受容体が欠損しているため必然的に過食 (レプチンは食欲を抑制するホルモンであるため) となり著しい肥満となるが、この肥満の他の因子が大腸発がんに与える影響を除去するため、腸管のみレプチン受容体を欠

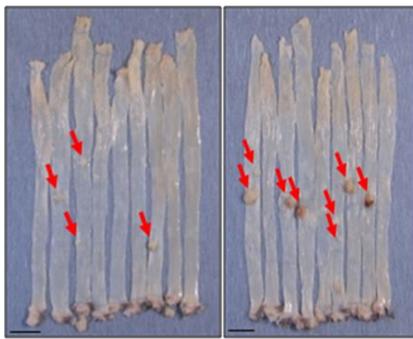
損させたモデル作成を計画している。今後さらなるレプチンを介した発がん促進分子機序究明のため以下の計画を立てた  
①レプチン亢進/欠損での腫瘍組織における VEGF, Bcl, survivin などの遺伝子解析  
②他の肥満マウス (高レプチンモデル, KKAY/KK マウスを使用予定) での発がん実験による検証  
③STAT3 コンディショナルノックアウトマウスでの発がん実験による検証  
④レプチン受容体コンディショナルノックアウトマウスでの発がん実験による検証

(2) 大腸におけるレプチンシグナル伝達の機序解明 (レプチン受容体発現の機序解明)  
機能的レプチン受容体 (ObRb) は Janus kinase (JAK 型チロシンキナーゼ) を介して細胞内にシグナルを伝達することが知られており、その下流には転写因子 STAT が存在し、遺伝子発現の調節を担っている。レプチンがこの JAK/STAT 経路の亢進を介して細胞増殖を促し癌化を促進する機序を証明できれば、これまで考えられていた遺伝子異常とは全く異なる発がん促進の新メカニズムにつながるものとする。現段階では、レプチン欠損状態 (*ob/ob*) で形成された腫瘍ではほとんど STAT3 が活性化していないことを免疫染色・ウエスタンで確認済みである。今回の研究ではいかなる状況でレプチンシグナルが下流へ伝わるのかを正常粘膜・腫瘍粘膜の受容体発現などを PCR 法や免疫染色法で明らかにしつつ、その下流分子の活性状態をリン酸化ウエスタンや免疫染色法を用いて明らかにしていく。さらには、前がん病変から腫瘍形成へのステップでのレプチンの関与とともに大腸発がん初期にその経路の活性を認める Wnt 経路にも注目し、レプチンシグナルへの関与について検討していく。

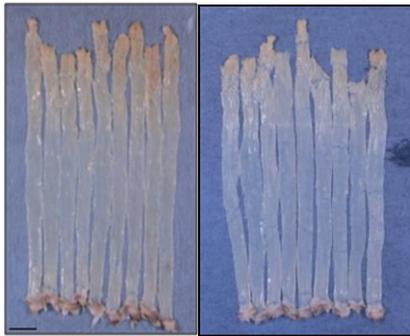
## 4. 研究成果

(1) レプチン欠損マウスは高度な肥満状態を呈するにも関わらず発生する大腸腫瘍は非常に微小である [図 1]。

高レプチン血症をきたす高脂肪食摂取マウス、レプチン欠損マウス (*ob/ob*)、およびレプチン受容体欠損マウスを用いて発癌実験をおこない、レプチンシグナルが大腸腫瘍増大に重要な役割を果たしていることを証明した。



(普通食摂取) (高脂肪食摂取)



(*ob/ob*) (*db/db*)

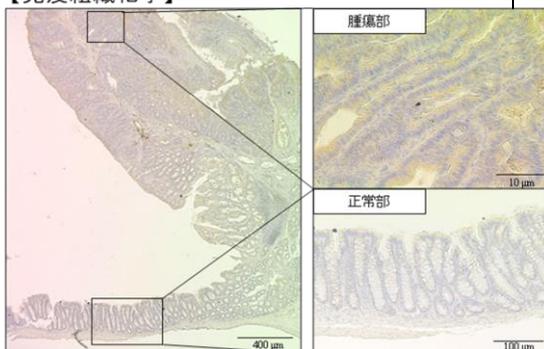
〔図 1〕

正常上皮の細胞増殖は、普通食を摂取した WT マウスと比べて肥満モデルである高脂肪食摂取の WT マウスや *ob/ob* マウスで有意に高値であり、また大腸前癌病変である ACF 数に關しても同様の結果であった。

(2) マウス大腸腫瘍増大にレプチン受容体は重要な役割をしている

大腸の腫瘍細胞と正常上皮細胞におけるレプチン受容体の発現を比較したところ、腫瘍細胞で有意に高発現していることがわかった〔図 2〕

a 【免疫組織化学】

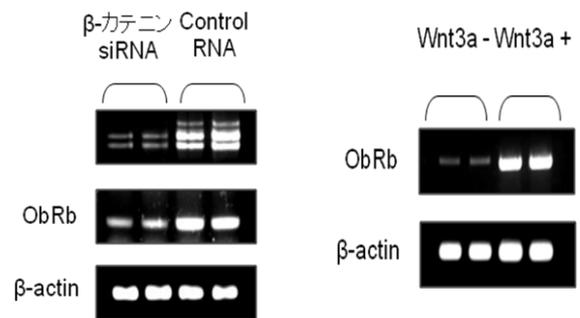


〔図 2〕

(3) Wnt シグナルにより誘発されるレプチン受容体 (ObRb) 発現

Wnt シグナル活性は、ObRb の発現と同様に腫

瘍部と正常部で違いを認める。一般に大腸発癌物質であるアゾキシメタンにより誘発されるマウスの大腸腫瘍ではβカテニン遺伝子の変異を高頻度に認めることが知られている。そこで、レプチン/ObRb シグナル制御における Wnt シグナル活性の役割を解明するため、大腸癌培養細胞を用いてβカテニンノックダウンがレプチン/ObRb 経路に与える効果について検討した。多くの大腸癌培養細胞では ObRb が高発現していることが報告されているが、これらの細胞のβカテニンをノックダウンしてみると ObRb の発現が著明に減少することが確認できた〔図 3〕。さらにもともと ObRb の発現を認めない非腫瘍細胞である HEK293 細胞に対してレコンビナントの Wnt を用いて刺激してみると、ObRb の発現は顕著に増加した〔図 3〕。これらの結果は、大腸腫瘍においてレプチン受容体の発現が増加していることに矛盾のないものであり、大腸上皮においては Wnt シグナルの活性化が ObRb 発現の引き金となることを強く示唆するものであった。

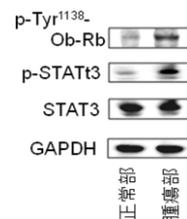


〔図 3〕

(4) レプチンにより大腸腫瘍増大のため活性化する STAT3 シグナル

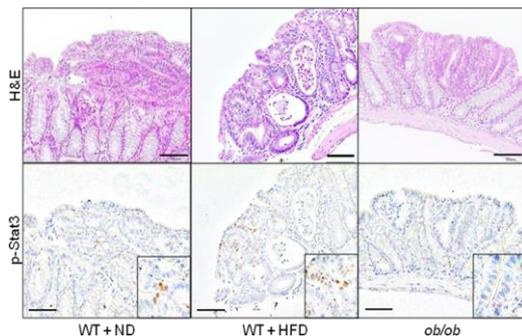
レプチンは ObRb のチロシン残基 (Tyr<sup>1138</sup>) をリン酸化することにより STAT3 経路を活性化させる。ObRb の発現している腫瘍部ではこのチロシン残基のリン酸化が増加し、その下流の STAT3 も活性化しているのに対し、ObRb の発現が乏しい正常部ではほとんどこの経路の活性化を認めない (図 4)。

〔図 4〕



レプチンがどのような機序で腫瘍の細胞増殖やアポトーシスに作用しているかを検討

するため、WT マウスと *ob/ob* マウスで発生した大腸腫瘍部の STAT3 活性およびその下流の標的遺伝子の発現について解析した。免疫組織化学法にて、WT マウスの腫瘍ではリン酸化 STAT3 陽性細胞を腫瘍細胞の核に認めるのに対し、*ob/ob* マウスの腫瘍ではほとんど陽性細胞を認めなかった (図 5)。また WT マウスでは血清レプチン濃度の高い高脂肪食摂取群においてリン酸化 STAT3 陽性細胞を多数認めた (図 5)。一方、正常部の粘膜においては WT、*ob/ob* マウスともにリン酸化 STAT3 陽性細胞をほとんど認めなかった。これは ObRb の発現が乏しい正常部にレプチンシグナルが伝わっていないことに矛盾しない結果であった

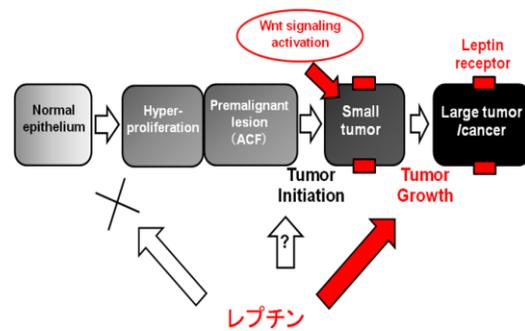


〔図 5〕

肥満関連の因子と大腸癌の関与はこれまで多くの研究者が報告してきたが、未だ決定的な結論は得られていない。近年急増している大腸癌の対策として、これらの機序解明は臨床的にも非常に重要な意義を持つ。本研究によって、高度肥満を呈しインスリンなどの肥満関連の因子がいかに高値になるうとも、レプチン欠損状態では大腸腫瘍の増大は抑制されるという全く新しいメカニズムを実証することができた。この結果はレプチンが大腸腫瘍の増大にきわめて重要な因子であることを示唆している。またレプチンの有無にかかわらず肥満モデルでは正常大腸上皮の細胞増殖や ACF 形成が亢進するが、一方腫瘍形成後はレプチンを欠くだけで劇的に腫瘍の増大が抑制されることから、レプチンは大腸発癌過程において腫瘍が形成された次のステージ、つまり腫瘍増大に対して非常に重要な成長因子として働くことが示された (図 6)。

本検討から、食事により過剰な脂肪やカロリーを摂取することは内臓・皮下脂肪を蓄積させ、その余剰エネルギーはレプチンシグナルを介して大腸癌の促進へと悪用されている可能性が示唆された。この結果は、血清レプチン値が高値となる肥満者で大腸癌が多くなる傾向に矛盾しないものであった。また肥満者であっても、このレプチンシグナルを

抑制することができれば大腸発癌促進を予防できる可能性が期待される結果であった。



〔図 6〕

## 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 38 件)

1. Takahashi H, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Higurashi T, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Nakajima A. Relationship of human rectal aberrant crypt foci and formation of colorectal polyp: One-year following up after polypectomy. *World J Gastrointest Endosc.* 2012 Dec 16;4(12):561-4. 査読有. doi: 10.4253/wjge.v4.i12.561.
2. Hosono K, Yamada A, Endo H, Takahashi H, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, Nakajima A. Increased tumor necrosis factor receptor 1 expression in human colorectal adenomas. *World J Gastroenterol.* 2012 Oct 14;18(38):5360-8. 査読有. doi: 10.3748/wjg.v18.i38.5360.
3. Higurashi T, Hosono K, Endo H, Takahashi H, Iida H, Uchiyama T, Ezuka A, Uchiyama S, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Maeda S, Morita S, Natsumeda Y, Nagase H, Nakajima A. Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer.* 2012 Sep 19;12(1):413. 査読有. doi: 10.1186/1471-2407-12-413.
4. Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Kato S, Sakai E, Hosono K, Yoneda M, Inamori M, Hippo Y, Nakagama H, Nakajima A. Number of aberrant crypt foci in the rectum is a useful surrogate marker of colorectal adenoma recurrence. *Dig Endosc.* 2012 Sep;24(5):353-7. 査読有.

- doi:  
10.1111/j.1443-1661.2012.01289.x.
- Higurashi T, Takahashi H, Endo H, Hosono K, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Uchiyama T, Hata Y, Fujisawa N, Uchiyama S, Ezuka A, Nagase H, Kessoku T, Matsuhashi N, Nakayama S, Inayama Y, Morita S, Nakajima A. Metformin efficacy and safety for colorectal polyps: a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer*. 2012 Mar 26;12(1):118. 査読有 . doi: 10.1186/1471-2407-12-118.
  - Sakai E, Morioka T, Yamada E, Ohkubo H, Higurashi T, Hosono K, Endo H, Takahashi H, Takamatsu R, Cui C, Shiozawa M, Akaike M, Samura H, Nishimaki T, Nakajima A, Yoshimi N. Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2012 Jan;103(1):144-9. 査読有 . doi:10.1111/j.139-7006.2011.02125x.
  - Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Sugiyama M, Sakai E, Hosono K, Nagashima Y, Inayama Y, Wada K, Hippo Y, Nakajima A. Role of the long form leptin receptor and of the STAT3 signaling pathway in colorectal cancer progression. *Int J Oncol*. 2011 Oct;39(4):935-40. 査読有 . doi: 10.3892/ijo.2011.1105.
  - Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Sakai E, Sugiyama M, Takahashi H, Nakajima N, Wada K, Takeda K, Nakagama H, Nakajima A. Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut* 2011 Oct;60(10):1363-71. 査読有 . doi: 10.1136/gut.2010.235754
  - 遠藤宏樹、細野邦広、酒井英嗣、内山崇、日暮琢磨、高橋宏和、中島淳。【消化器癌をめぐる栄養療法】食事摂取により増大する大腸癌：レプチンシグナルの関与。消化器内科（1844-2895）52 巻 6 号 Page582-590（2011.06）。査読無。http://ci.nii.ac.jp/naid/40018927290
- [学会発表] (計 13 件)
- 日暮琢磨, 遠藤宏樹, 酒井英嗣, 大久保秀則, 山田英司, 高橋宏和, 中島淳: 大腸腫瘍を増大させるレプチンシグナル: Cre/flox動物モデルを用いた検討. 第71回日本癌学会学術総会ポスターセッション(化学物質とがん予防), 2012年9月20日 ロイトン札幌(北海道)
  - 酒井英嗣, 遠藤宏樹, 中島淳, 山田英司, 日暮琢磨, 大久保秀則, 高橋宏和: 低用量 resveratrol は大腸腫瘍の initiation に影響を与えないが, STAT3 経路を介して大腸腫瘍の progression を抑制する. 第71回日本癌学会学術総会口演(化学物質とがん予防), 2012年9月20日 ロイトン札幌(北海道)
  - 酒井英嗣, 遠藤宏樹, 中島淳: レスベラトロールによる大腸発癌予防効果に関する検討. 第98回日本消化器病学会総会ミニシンポジウム2(Nutraceuticalをめぐって), 2012年4月19日 京王プラザホテル(東京都)
  - 酒井英嗣, 遠藤宏樹, 中島淳: レスベラトロールによる大腸発癌予防効果に関する検討. 第98回日本消化器病学会総会ミニシンポジウム2(Nutraceuticalをめぐって), 2012年4月19日 京王プラザホテル(東京都)
  - Sakai E, Takahashi H, Yamada E, Higurashi T, Ohkubo H, Hosono K, Endo H, Kato S, Nakajima A, Cui C, Takamatsu R, Yoshimi N: The histopathological characteristics of mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. AACR 2012 (pathogenesis of gastrointestinal and hepatocellular carcinomas), 2012年4月2日 Chicago, U. S. A.
  - Sakai E, Takahashi H, Kato S, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Maeda S, Yoneda M, Taguri M, Nakajima A: Validity of ACF using as a surrogate biomarker for colorectal cancer. AACR conference on frontiers in cancer prevention research, poster session, 2011年10月3日, Boston, U. S. A.
  - 中島淳, 遠藤宏樹, 酒井英嗣, 高橋宏和: 肥満と大腸癌: メカニズムと予防. 第28回日本医学会総会2011東京, シンポジウム6(からだの調節と代謝, 肥満の成因と治療), 2011年4月8日, 東京国際フォーラム(東京都)
  - 遠藤宏樹, 内山崇, 酒井英嗣, 細野邦広, 高橋宏和, 中島淳: 肥満と大腸癌: 大腸腫瘍を増大させるレプチンシグナル. 第7回日本消化管学会総会学術集会ワークショップ16(肥満, 代謝異常と消化管疾患: 病態解明への新たなアプローチ), 2011年2月2日, 国立京都国際会館(京都)
  - 内山崇, 高橋宏和, 酒井英嗣, 杉山美智子, 細野邦広, 遠藤宏樹, 中島淳: 大腸発癌におけるIL-6の作用解析. 第7回日本消化管学会総会学術集会ワークショップ16(肥満, 代謝異常と消化管疾患:

- 病態解明への新たなアプローチ), 2011年  
2月2日、国立京都国際会館 (京都)
10. 酒井英嗣、遠藤宏樹、中島淳: 新規大腸  
化学発癌予防薬としてのResveratrolの  
可能性. 第7回日本消化管学会総会学術  
集会 ワークショップ7 (大腸癌の治療,  
予防に向けた新規標的分子の探索), 2011  
年2月2日 国立京都国際会館 (京都)

[その他]

ホームページ

横浜市立大学附属病院 分子消化管内科学

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3syon/member.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 宏樹 (ENDO HIROKI)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号: 7 0 4 6 8 1 6 4

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: