

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860529

研究課題名(和文) APC遺伝子ヘテロ変異を有する肥満・糖尿病マウスを用いた大腸発癌機序の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanisms of colon carcinogenesis in C57BL/KsJ-db/db-Apc mice

研究代表者

久保田 全哉 (KUBOTA, MASAYA)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：90542407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸発癌機序と化学予防に関して肥満、生活習慣病に注目し検討を行った。糖尿病治療薬メトホルミン、緑茶カテキンはdb/db-Min/+マウスの腸管腫瘍数を減少させた。アスタキサンチン、降圧剤カプトプリルは別の動物モデルで大腸前癌病変を抑制した。メトホルミン、アスタキサンチンは、肥満糖尿病モデルマウスの肝発癌モデルにおいて腫瘍抑制効果を示した。その機序として酸化ストレスの改善や炎症の改善を確認した。生活習慣病治療薬やある種のファイトケミカルは、肥満・メタボリック症候群関連大腸発癌を抑制する上で、有効な候補薬剤である可能性を強く示唆するもので、現在当施設において臨床介入試験の準備を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, the chemopreventive effects of therapeutic agents for lifestyle disease or phytochemicals, and its underlying molecular mechanisms were investigated using obesity- and lifestyle disease-related colon cancer models. Metformin, an agent for diabetes, and green tea catechin decreased the number of intestinal tumors in diabetic db/db-Min/+ mice. Besides, astaxanthin, one of phytochemicals, and captopril, an antihypertensive agent, suppressed colonic precancerous lesions in different models. In addition, metformin and astaxanthin prevented the development of liver tumors in obese diabetic mice through the improvement of oxidative stress and chronic inflammation. Thus, these results suggest that certain phytochemicals or therapeutic agents for lifestyle disease may become effective candidates for the chemoprevention of colon carcinogenesis. Clinical trials testing the efficacy of those agents in obese diabetic individuals will be ready to start in our facility.

研究分野：大腸癌基礎

キーワード：大腸癌化学予防 肥満関連大腸発癌

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、本邦のみならず海外においても癌死亡率の上位を占める悪性疾患である。大腸癌の機序を詳細に検討し、そこで得られた結果より大腸癌高危険群患者をスクリーニングし、積極的な臨床介入によって発癌化学予防を実践することは同疾患の予後改善に繋がる。

家族性大腸腺腫症 (FAP) の原因遺伝子として同定された APC 癌抑制遺伝子の変異は、大腸多段階発癌において重要な役割を果たしていると考えられる。また様々な遺伝子異常に加え、近年、肥満や糖尿病をはじめとするメタボリックシンドロームに伴った病態が、大腸癌の発癌・進展に深く関与していることが明らかになりつつある。肥満・糖尿病に関連した様々な分子異常が協調的に働きながら大腸癌を促進しているものと考えられている。

上述の通り大腸癌は、「遺伝子異常」とともに、肥満・生活習慣病といった全身の「環境的素因」に起因する悪性疾患といえる。APC をはじめとする遺伝子異常と、肥満・糖尿病に関連した分子異常は、相互作用を介して大腸癌の発癌・進展を促進している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

今回我々が作製した db/db-Min/+ マウスは、遺伝子異常と肥満に起因する大腸癌に関する研究を新たな展開に導く非常に有用なモデルである。実際、IGF/IGF-1R の発現亢進が、db/db-Min/+ マウスの腸管腫瘍形成に促進的に働いていることも、本モデルの有用性を示唆するものである。一方、インスリン抵抗性や IGF/IGF-1R の過剰活性化以外の肥満関連分子異常、例えば、内臓脂肪の増加によって惹起されるアディポカインの不均衡や慢性炎症状態、さらには酸化ストレスの亢進が引き起こす DNA 損傷が、本疾患モデルにおいて果たしている役割については十分に検討されていない。また、APC 遺伝子の変異によって、特に異常をきたしている (影響を受けている) 肥満・糖尿病・代謝関連分子 (遺伝子・蛋白・シグナル) を明らかにするための解析も、十分に行われていない。

今回の研究では、db/db-Min/+ マウスにおける肥満関連大腸腫瘍形成の詳細な機序を解明し、ヒトの肥満・糖尿病関連大腸癌を研究する上で、同マウスを用いた実験系が有用性の高いモデルであることを確認・検証する。次に同マウス (実験系) を用いて、肥満・糖尿病と大腸癌を結びつける上で鍵を握る分子異常、すなわち APC 遺伝子変異と肥満関連分子異常の相互作用を明らかにする。本研究の最終目標は、それらの分子異常を標的とする臨床的に有用な新規大腸癌予防法

(薬) を開発することにある。

肥満や糖尿病、生活習慣病の増加は大きな社会問題であり、これらの疾患を合併した大腸癌患者の増加が危惧される。本研究によって、APC 遺伝子変異と肥満に起因する大腸癌において鍵となる新規遺伝子・蛋白・シグナル異常を同定し、大腸癌抑制のための標的分子を明らかにすることができれば、大腸癌 (再発) のリスクの高い糖尿病や肥満を合併した大腸腺腫・大腸癌患者の予後改善が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 我々が作成した新規肥満関連大腸癌モデルマウスである db/db-Min/+ マウスについて、糖尿病治療薬の 1 つであるピグアナイド薬 (メトホルミン)、ファイトケミカルの 1 つである緑茶カテキン (EGCG) の 2 剤を投与した際の腸管腫瘍抑制効果とその機序について検討する。

(2) ファイトケミカルの 1 つである天然色素カロテノイドのアスタキサンチン、また降圧剤として広く臨床に用いられているアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤であるカプトプリルの大腸癌抑制効果について、同様に大腸癌抑制効果があるかどうかモデル動物を使用して検討する。

(3) メトホルミンおよびアスタキサンチンについて、肥満糖尿病モデルマウス (db/db マウス) にジエチルニトロサミンを投与した肝発癌モデルでも同様の機序で腫瘍抑制効果があるか検討する。

(4) これらの薬剤を使用し、大腸癌予防のための臨床介入研究の準備、検討をする。

4. 研究成果

(1) 肥満関連大腸癌モデルマウスである db/db-Min/+ マウス (5 週齢) にメトホルミンおよび緑茶カテキンを 10 週間投与したところ、対照群と比較して有意に小腸ポリープの発生数を減少させた。また大腸ポリープについては発生数が少なく有意差はないものの、減少させる傾向にあった。これまでの報告にある通り、これらの薬剤が肥満関連発癌を抑制させる効果を確認した。

(2) 引き続き、他のファイトケミカルおよび肥満・生活習慣病に使用される薬剤についても検討を進めた。肥満糖尿病モデルマウスである db/db マウス 5 週齢に週 1 回、計 4 回アゾキシメタン (AOM) を投与、その後 8 週間アスタキサンチンを経口投与し、AOM 誘発大腸前癌病変について検討したところ、大腸前癌病変 (ACF; aberrant crypt foci, BCAC; β -catenin accumulated crypt) の抑制を認めた。アスタキサンチン投与群で、酸化ストレ

スマーカーである尿中 8-OHdG、血清 d-ROM レベルが低下し、大腸粘膜における抗酸化酵素 (GPx1, SOD1, CAT) の mRNA 発現が増加した。また大腸粘膜における IL-1、IL-6、F4/80、CCL2、CXCL2 の mRNA 発現は、アスタキサンチン投与群で有意に減少した。またアスタキサンチン投与により大腸粘膜上皮における NF- κ B および PCNA 陽性細胞数は減少した。酸化ストレスの改善、慢性炎症の抑制、NF- κ B 活性の抑制により肥満糖尿病関連の AOM 誘発大腸前癌病変が抑制されたことを確認した。また、糖尿病・高血圧ラット (SHRSP-ZF ラット) の AOM 誘発大腸前癌病変におけるカプトプリルの効果を検討した。6 週齢の SHRSP-ZF ラットに週 1 回、計 2 回 AOM を投与し、その後 2 週間カプトプリルの投与を行い解析した。その結果、カプトプリル投与群では AOM 誘発大腸前癌病変 (ACF) が有意に減少した。血清アンジオテンシン、大腸粘膜におけるアンジオテンシン変換酵素とアンジオテンシンタイプ 2 受容体の mRNA の発現が減少し、尿中 8-OHdG および血清 d-ROM レベルが低下、大腸粘膜上皮において抗酸化酵素であるカタラーゼの mRNA 発現が増加し、TNF- α 、IL-18、MCP-1、iNOS、VEGF、PCNA の mRNA 発現が抑制された。これらの結果より、カプトプリルはレニンアンジオテンシン系の抑制、酸化ストレスの改善、炎症の抑制を介して、高血圧に関連した AOM 誘発大腸前癌病変の発生を抑制した。

これらの研究成果から、生活習慣病治療薬やある種のファイトケミカルは、肥満・メタボリック症候群関連大腸発癌を抑制する上で、有効な候補薬剤・化合物である可能性を強く示唆するものである。

(3) 上記の通り、大腸腫瘍抑制効果を示すメトホルミンおよびアスタキサンチンについて、肥満糖尿病モデルマウス (db/db マウス) にジエチルニトロサミン (DEN) を投与した肝発癌モデルでも同様の機序で腫瘍抑制効果が認められるかどうか検討した。2 週齢の db/db マウスに DEN を投与し、その後メトホルミンを 20 週間投与した。その結果メトホルミン投与群では肝腫瘍 (肝前癌病変) の抑制効果が認められた。解析の結果、メトホルミン投与群では血清インスリン値の低下、インスリン抵抗性の改善、肝細胞における Akt、mTOR、p70S6 のリン酸化抑制、また血清レプチン値の低下と血清アディポネクチン値の増加を認めた。これらの結果より、メトホルミンはインスリン抵抗性を改善し、mTOR 経路を阻害、またアディポカインの不均衡を是正することで肝腫瘍の抑制効果をもたらしたと考えられた。またアスタキサンチンについても同様に検討した。2 週齢の db/db マウスに DEN を投与し、その後アスタキサンチン投与群では肝腫瘍 (肝前癌病変) が有意に抑制された。解析により、酸化ストレス

マーカーである血清 d-ROM/BAP 比の低下、肝および脂肪組織での抗酸化酵素 SOD2、GPx1 の mRNA の発現増加、また血清アディポネクチン値の増加を認めた。アスタキサンチンは酸化ストレスを改善し、アディポカインの不均衡を是正することで肝腫瘍の抑制効果をもたらしたと考えられる。

これまでの研究成果は、生活習慣病治療薬やある種の phytochemical が、肥満・メタボリック症候群関連大腸発癌を抑制する上で、有効な候補薬剤・化合物である可能性を強く示唆するものである。生活習慣病の治療薬として、今回検討した薬剤の他に、糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体、脂質異常症治療薬のスタチン、フィブラート系薬剤等、などが有効である可能性があり、今後さらに各薬剤を用いた詳細な検討が必要であり検討中である。

(4) 当初の研究目的に関連し、肥満・メタボリック症候群関連大腸発癌の抑制、予防のこれらの薬剤を使用した臨床介入研究の準備段階として、現在までに『ヒト直腸における前がん病変 (ACF; aberrant crypt foci) の観察研究』について当施設の倫理審査委員会の承認 (27-227) を得た。現在、前向き観察研究の症例登録を行い、データベースを構築している。引き続き症例の蓄積と解析を実施し、薬剤による肥満関連大腸発癌の抑制、予防効果に関する臨床介入試験を予定する方針である。

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 12 件)

Miyazaki T, Shirakami Y, Kubota M, Ideta T, Kochi T, Sakai H, Tanaka T, Moriwaki H, Shimizu M, Sodium alginate prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and liver carcinogenesis in obese and diabetic mice, *Oncotarget*, 査読有、7 巻、2016、10448-10458、doi:

10.18632/oncotarget.7249

Ohno T, Shimizu M, Shirakami Y, Miyazaki T, Ideta T, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Tanaka T, Moriwaki H, Preventive effects of astaxanthin on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in C57/BL/KsJ-db/db obese mice, *Hepatol Res*, 査読有、46 巻、2016、E201-209、doi: 10.1111/hepr.12550

Ohno T, Shimizu M, Shirakami Y, Baba A, Kochi T, Kubota M, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H, Metformin suppresses diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-+Leprdb/+Leprdb mice, *PLoS*

One、査読有、10 巻、2015、e0124081、
doi: 10.1371/journal.pone.0124081
Kochi T, Shimizu M, Sumi T, Kubota M,
Shirakami Y, Tanaka T, Moriwaki H、
Inhibitory effects of astaxanthin on
azoxymethane-induced colonic
preneoplastic lesions in
C57/BL/KsJ-db/db mice、BMC
Gastroenterol、査読有、14 巻、2014、
212、doi: 10.1186/s12876-014-0212-z
Kochi T, Shimizu M, Ohno T, Baba A, Sumi
T, Kubota M, Shirakami Y, Tsurumi H,
Tanaka T, Moriwaki H、Preventive
effects of the angiotensin-converting
enzyme inhibitor, captopril, on the
development of azoxymethane-induced
colonic preneoplastic lesions in
diabetic and hypertensive rats、Oncol
Lett、査読有、8 巻、2014、223-229、
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/arti
cles/PMC4063600/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4063600/)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 全哉 (KUBOTA, Masaya)

岐阜大学大学院医学系研究科 特任助教

研究者番号：90542407

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし