

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860527

研究課題名(和文) 食道腺がんのアディポサイトカイン応答におけるmiR-221/222の機能の解明

研究課題名(英文) Interaction of miR-221/222 and adipocytokine signaling in esophageal adenocarcinoma

研究代表者

松崎 潤太郎 (Matsuzaki, Juntaro)

慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)

研究者番号：60464864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：欧米で急増している食道腺がんは、胆汁酸の食道内への逆流が主要因である。また中心性肥満は食道腺がんの主要なリスク因子である。一般に中心性肥満の進行に伴い血中アディポネクチンが低下する。一方、我々は胆汁酸刺激が核内胆汁酸受容体FXRの活性化およびmiR-221/222の亢進を介して発がん促進に寄与することを報告していたが、今回さらにmiR-221/222がCOX-2発現を増加させることを見出した。更にアディポネクチンはこのCOX-2上昇を是正する作用があるがわかった。この結果は、中心性肥満を有する食道腺がんハイリスク症例にはアディポネクチン受容体作動薬による化学予防が有効である可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Esophageal adenocarcinoma, which is rapidly increasing in Western countries, is one of the complications of gastroesophageal reflux disease. Bile reflux and central obesity are major risk factors for esophageal adenocarcinoma. In general, plasma adiponectin levels are decreased through the progression of central obesity. We had reported that bile acids contribute to carcinogenesis through the activation of nuclear bile acid receptor (FXR) and the enhancement of miR-221/222. Herein, we identified that miR-221/222 enhance the expression of COX-2 in esophageal epithelial cells. On the other hand, COX-2 expression was suppressed during exposure to adiponectin receptor agonist. These results suggest adiponectin receptor agonist might work as a chemopreventive agent for esophageal adenocarcinoma among high-risk individuals with central obesity.

研究分野：消化器内科学

キーワード：食道腺がん 中心性肥満 アディポネクチン マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

食道がんは、本邦でのがんの部位別死亡数第9位に相当し、特に男性に多い。食道がんの組織型は扁平上皮がんと腺がんに大別される。日本人の食道がんは90%以上が扁平上皮がんであり、食道腺がんは稀である。一方、欧米では食道腺がんの罹患率がこの40年間で約6倍となっており、もっとも急激に増加した悪性腫瘍である。

食道腺がんは、下部食道の円柱上皮化生であるバレット食道と呼ばれる病変を、その発生源地としている。バレット食道および食道腺がんのその主な原因には、胃食道逆流と肥満が挙げられる。研究代表者らは既に、胃液の逆流による食道上皮への胆汁酸曝露逆流により、oncogenic microRNAであるmiR-221/222の発現が食道上皮細胞内で上昇し、バレット食道から食道腺がんへの発がん過程を促進させる可能性があることを報告した(Gastroenterology 145:1300, 2013)。一方、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは、中心性肥満の悪化に伴って血中濃度が低下することが知られている。またmiR-221/222の標的遺伝子のひとつにアディポネクチン受容体1(AdipoR1)がある(図1)。そのため研究代表者らは、miR-221/222高発現下の食道上皮細胞においては、アディポネクチンシグナルに変化が生じており、腫瘍形成に影響があるのではないかという仮説のもと、以下の検討を開始した。

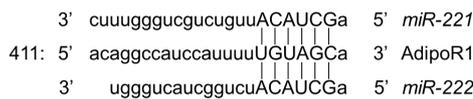


図1. AdipoR1 mRNA上のmiR-221/222の標的部位

2. 研究の目的

(1) miR-221/222高発現細胞モデルとして、胆汁酸核内受容体FXR作動薬(GW4064)へ曝露させた食道腺がん細胞および、miR-221/222強制発現細胞に対する、アディポネクチン刺激の影響を検討し、食道腺がんの新たな予防戦略の提言の一助となるデータの創出を目的とした。

(2) また付随研究として、本邦における胃食道逆流症と内臓脂肪過多などの生活習慣素因との関連性について、研究代表者の施設における独自の cohorts を用いて検証し、スクリーニング集団の絞り込みや生活習慣介入の基盤となるデータの創出も試みた。

3. 研究の方法

(1) ヒト食道腺がん細胞株(0E33, 0E19)を用いて、miR-221/222高発現系におけるアディポネクチン受容体(AdipoR1, AdipoR2)発現量およびアディポネクチン受容体作動薬(AdipoRon)投与による細胞増殖能を評価した。またバレット食道の腫瘍化に寄与するこ

とが知られるCOX-2発現量についても検討した。

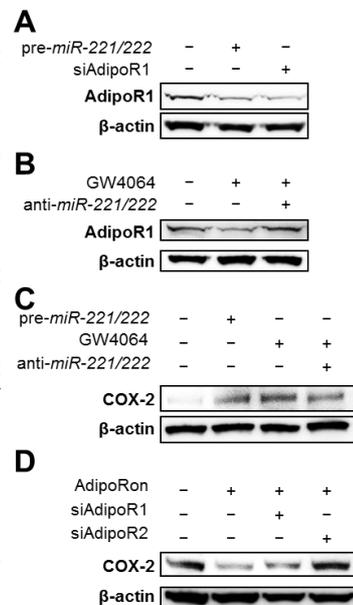
(2) 2012年10月から2013年11月までに慶應義塾病院予防医療センターで人間ドックを受診し、上部消化管内視鏡および体幹部単純CT(内臓脂肪面積測定)を受けた方を対象とし、逆流性食道炎やバレット食道の有無と、内臓脂肪面積などの臨床情報の相関を、男女別に解析した。

4. 研究成果

(1) まずヒト食道腺がん細胞株(0E33, 0E19)におけるmiR-221/222とアディポネクチン刺激の直接相互作用を確認した。アディポネクチン刺激によってmiR-221/222の発現に変化が生じなかった。一方、miR-221/222の強制発現によってAdipoR1の低下がみられた(図2A)。FXR刺激(GW4064)によりmiR-221/222発現を誘導した際にもAdipoR1の低下がみられ、これはantimiRによるmiR-221/222の阻害によって修復された(図2B)。これによりFXR刺激はmiR-221/222の誘導を介してAdipoR1を低下させることが示された。一方、AdipoR2発現量には変化が生じなかった。

図2.

A) miR-221/222およびsiAdipoR1の強制発現によるAdipoR1の低下。
 B) FXRアゴニスト(GW4064)によるmiR-221/222を介したAdipoR1の低下。
 C) miR-221/222およびFXRアゴニストによるCOX-2の上昇。
 D) アディポネクチン刺激によるAdipoR2を介したCOX-2の低下。



AdipoR1の低下によるアディポネクチンシグナルへの影響を評価するため、AdipoRon投与による0E33の細胞増殖能をBrdU ELISAにより評価したところ、AdipoRonは細胞増殖能を低下させる機能を有しており、さらにこの減少はmiR-221/222強制発現やFXR刺激の影響下においても持続することから、アディポネクチンはAdipoR2を介した腫瘍細胞増殖抑制作用を有していると考えられた(図3A)。

またCOX-2の発現変化に注目すると、miR-221/222およびFXR刺激によりCOX-2発現が上昇することを見出した(図2C)。一方、AdipoRonはCOX-2を抑制し、この変化は特にsiAdipoR2で処理すると阻害されることから、

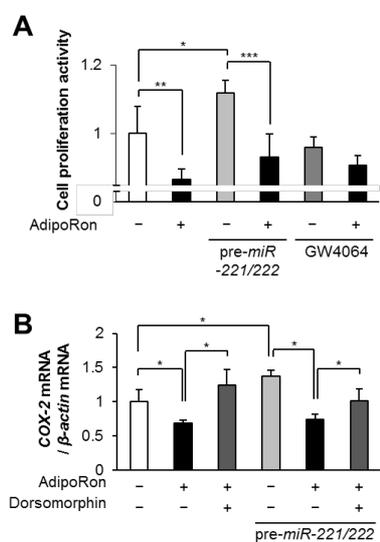


図3. A) miR-221/222 および FXR アゴニスト曝露下における、AdipoRon 添加時の細胞増殖能の変化。B) AdipoRon による AMPK を介した COX-2 mRNA の発現低下。Dorsomorphin: AMP 阻害剤

AdipoRon がやはり AdipoR2 を介して COX-2 低下に寄与することがわかった(図 2D)。さらに AdipoRon による COX-2 の低下が mRNA レベルで生じていること、さらにこの変化が AMPK 阻害剤(Dorsomorphin)により修復されることを見出した(図 3B)。すなわち、AdipoRon は AdipoR2 を介した AMPK の活性化により、細胞増殖能の抑制や COX-2 の低下に寄与することがわかった。AdipoR1 に依存したため、このカスケードは miR-221/222 の発現増加に影響されないものであった。

以上より、食道腺がんにおいて AdipoR2 は有望な予防・治療戦略の標的となることが示唆された。

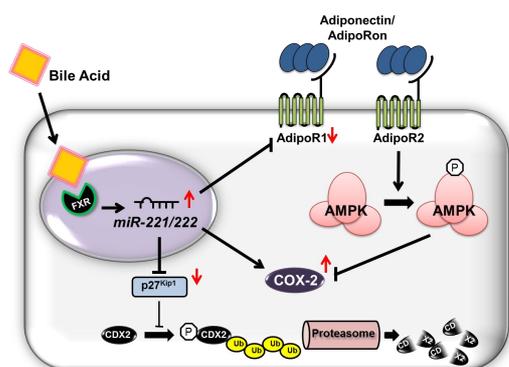


図 4. 食道腺がん細胞におけるアディポネクチンシグナル伝達と、胆汁酸曝露の影響

(2) 2608 例を解析対象とした。内臓脂肪面積は、男女ともに逆流性食道炎の有無と関連した。また男性では喫煙と中性脂肪高値も逆流性食道炎と関連した。一方、内臓脂肪面積とバレット食道の有無とは有意な相関はみられなかった。男性では 1 日 2 合以上の飲酒が重症逆流性食道炎およびバレット食道と関連した。(文献)

この結果は、本邦においては内臓脂肪の影響がバレット食道形成時にはあまり強くない、むしろ飲酒の影響が強いという、欧米とは異なる特徴があることを明らかにした。今後、アジア人での食道腺がんの臨床的特徴を、特に欧米との違いも含めて評価していく必要性が提言された。また予防戦略を考えるうえでも、欧米の踏襲のみならず本邦の現状に即した評価を行っていくべきと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Matsuzaki J, Hayashi R, Arakawa T, et al. Questionnaire-Based Survey on Diagnostic and Therapeutic Endoscopies and *H. pylori* Eradication for Elderly Patients in East Asian Countries. *Digestion* 93, 93-102 (2016). 査読有. DOI:10.1159/000440741

Matsuzaki J, Suzuki H, Masaoka T, et al. Influence of regular exercise on gastric emptying in healthy men: a pilot study. *J Clin Biochem Nutr* [in press] (2016). 査読有

Togawa K, **Matsuzaki J**, Fukushima Y, et al. Association of baseline plasma des-acyl ghrelin level with the response to rikkunshito in patients with functional dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol* 31, 334-341 (2016). 査読有. DOI:10.1111/jgh.13074

Mori H, Suzuki H, **Matsuzaki J**, et al. Rifabutin based 10-day and 14-day triple therapy as a third-line and fourth-line regimen for *Helicobacter pylori* eradication: a pilot study. *United European Gastroenterol J* 4, 380-387 (2016). 査読有. DOI:10.1177/2050640615618043

Mori H, Suzuki H, **Matsuzaki J**, et al. Efficacy of 10-day sitafloxacin-containing third-line rescue therapies for *Helicobacter pylori* strains containing the *gyrA* mutation. *Helicobacter* (2016) [Epub ahead of print]. 査読有. DOI:10.1111/hel.12286

Lee SY, Masaoka T, Han HS, **Matsuzaki J**, et al. A prospective study on symptom generation according to spicy food intake and TRPV1 genotypes in functional dyspepsia patients. *Neurogastroenterol Motil* (2016) [Epub ahead of print]. 査読有. DOI:10.1111/nmo.12841

Shimomura A, Shiino S, Kawauchi J,

Takizawa S, Sakamoto H, **Matsuzaki J**, et al. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci* 107:326-334 (2016). 査読有. DOI:10.1111/cas.12880

Matsuzaki J, Suzuki H, Kobayakawa M, et al. Association of visceral fat area, smoking, and alcohol consumption with reflux esophagitis and Barrett's esophagus in Japan. *PLoS One* 10: e0133865 (2015). 査読有. DOI:10.1371/journal.pone.0133865

Matsuzaki J, Suzuki H. Role of microRNAs-221/222 in digestive systems. *J Clin Med* 4:1566-1577 (2015). 査読有. DOI:10.3390/jcm4081566

Tsugawa H, Mori H, **Matsuzaki J**, et al. Nordihydroguaiaretic Acid Disrupts the Antioxidant Ability of *Helicobacter pylori* through the Repression of SodB Activity In Vitro. *BioMed Res Int* 2015:734548 (2015). 査読有. DOI:10.1155/2015/734548

Matsuzaki J, Suzuki H. MicroRNAs in Barrett's esophagus: Future prospects. *Front Genet* 5:69 (2014). 査読有. DOI:10.3389/fgene.2014.00069

Fukuhara S, **Matsuzaki J**, Tsugawa H, et al. Mucosal expression of aquaporin-4 in the stomach of histamine type 2 receptor knockout mice and *Helicobacter pylori*-infected mice. *J Gastroenterol Hepatol* 29 Suppl 4:53-59 (2014). 査読有. DOI:10.1111/jgh.12771

Suzuki H, **Matsuzaki J**, Fukushima Y, et al. Randomised clinical trial: rikkunshito in the treatment of functional dyspepsia - a multi-centre, double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Neurogastroenterol Motil* 26:950-961 (2014). 査読有. DOI:10.1111/nmo.12348

Suzuki H, **Matsuzaki J**, Masaoka T, et al. Greater loss of productivity among Japanese workers with gastro-esophageal reflux disease (GERD) symptoms that persist vs resolve on medical therapy. *Neurogastroenterol Motil* 26:764-771 (2014). 査読有. DOI:10.1111/nmo.12319

Nishizawa T, Suzuki H, **Matsuzaki J**, et al. Propofol versus traditional sedative agents for endoscopic submucosal dissection. *Dig Endosc* 26:701-706 (2014). 査読有.

DOI:10.1111/den.12342

[学会発表](計17件)

Matsuzaki J. Adiponectin ameliorates carcinogenic pathway depending on miR-221/222 in esophageal adenocarcinoma cells. *Digestive Disease Week 2015*. 2015年5月19日. ワシントンDC(米国)

Matsuzaki J. Smoking, a previous history of malignancy, and the presence of Barrett's esophagus as risk factors for adenoma and carcinoma of the duodenum. *Digestive Disease Week 2015*. 2015年5月19日. ワシントンDC(米国)

松崎 潤太郎. 胆汁酸曝露による食道腺がん進展機序に対するアディポネクチンの抗腫瘍効果の検討. **第101回日本消化器病学会総会**. シンポジウム1「バレット食道および食道腺癌(食道胃接合部癌)の成因、発生のメカニズム」. 2015年4月23日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)

松崎 潤太郎. 食道腺がん発がん過程における胆汁酸と中心性肥満の関与. **第2回 Medical Frontier Consortium beyond the Organocentric Dogma**. 2015年3月28日. 第一ホテル東京シーフォート(東京都品川区)

松崎 潤太郎. 食道腺がん発がん過程における胆汁酸とアディポネクチンの関与の検討. **第33回サイトプロテクション研究会**. 2015年3月20日. メルパルク京都(京都府京都市)

Matsuzaki J. Influence of age on the formation of colorectal adenomatous polyps or adenocarcinomas in Japan. **The 8th International Gastrointestinal Consensus Symposium**. 2015年2月14日. 京王プラザホテル(東京都新宿区)

松崎 潤太郎. ディスペプシア症状と関連する *H. pylori* 菌体由来毒素の遺伝子変異の検討. **第11回日本消化管学会総会**. コアシンポジウム3「機能性疾患:機能性ディスペプシアの新展開 ~ピロリ菌感染胃炎と機能性ディスペプシア~」. 2015年2月13日. 京王プラザホテル(東京都新宿区)

松崎 潤太郎. 症例対照研究による十二指腸腫瘍に關与する臨床所見の検討. **第11回日本消化管学会総会**. ワークショップ11「十二指腸腫瘍性病変(非乳頭部)病理発生・診断・治療」. 2015年2月14日. 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Matsuzaki J. Metronidazole-resistant *H. pylori* is more prevalent in patients with dyspepsia. **The 4th Biennial Congress of Asian Neurogastroenterology & Motility Association**. 2015年2月8日. デリー(インド)

松崎 潤太郎. 機能性ディスペプシアに対

する六君子湯の有効性とその予測可能性.
第13回日本臨床中医学学会. 2014年12月6日. 大阪市立大学大学院医学研究科学舎4階 中講義室1(大阪府大阪市)
松崎 潤太郎. 食道腺がんにおける胆汁酸応答性 microRNA とアディポネクチン反応性の検討. **第36回胆汁酸研究会**. 2014年11月22日. 東海大学校友会館(東京都千代田区)
松崎 潤太郎. ディスペプシア症状を惹起する *H. pylori* 菌株の特性の検討. **第8回機能性ディスぺプシア研究会**. シンポジウム1「機能性ディスぺプシアの病態～特に、*H. pylori* 関連ディスぺプシアの観点から」. 2014年11月6日. 学術総合センター(東京都千代田区)
松崎 潤太郎. 健常者におけるバレット粘膜および逆流性食道炎に關する生活習慣因子の検証. **第22回日本消化器関連学会週間**. パネルディスカッション15「Barrett 食道(食道癌を含む)は増えているのかー現状と対策」. 2014年10月26日. 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
松崎 潤太郎. 食道への胆汁酸曝露による miR-221/222 亢進を介した食道腺がん進展機序におけるアディポネクチンの関与. **第22回日本消化器関連学会週間**. シンポジウム12「生活習慣病と脂質・胆汁酸代謝」. 2014年10月24日. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
Matsuzaki J. Adiponectin ameliorates FXR-dependent oncogenic signaling in esophageal adenocarcinoma cells. **Falk Symposium 194**. 2014年10月8-9日. フライブルク(ドイツ)
Matsuzaki J. Differences of lifestyle factors between erosive esophagitis and Barrett's esophagus. **The 1st Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting**. 2014年9月6-7日. 広州(中国)
松崎 潤太郎. *H. pylori* 感染を有する機能性ディスぺプシア患者における菌体由来因子と症状の関連性の検討. **第100回日本消化器病学会総会**. ワークショップ2「FGIDの病態生理学と脳腸相關研究の進歩」. 2014年4月24日. 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計1件)

Matsuzaki J, Suzuki H. Springer. *Helicobacter pylori*. 2016. 125-130

〔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

松崎 潤太郎 (MATSUZAKI, Juntaro)
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)
研究者番号: 60464864

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

津川 仁 (TSUGAWA, Hitoshi)
鈴木 秀和 (SUZUKI, Hidekazu)