

平成 21年 4月14日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591532
 研究課題名（和文） 十二指腸液逆流による食道腺癌に対するウルソデオキシコール酸とカモスタットの効果
 研究課題名（英文） Chemopreventive effects of ursodeoxycholic acid and camostat mesilate on esophageal carcinogenesis by duodeno-esophageal reflux.
 研究代表者
 藤村 隆 (FUJIMURA TAKASHI)
 金沢大学・附属病院・講師
 研究者番号：50262580

研究成果の概要：

ラットに胃全摘術を行った後十二指腸食道逆流モデルを作成し、ウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA)、メシル酸カモスタット (camostat mesilate, CMM) の投与及びそれらの併用 (UDCA+CMM) を行うことにより、逆流性食道炎からバレット食道上皮を経て食道腺癌の発生に至るまでの過程を予防できるかどうかを検討した。その結果 UDCA 投与群は control 群に比してバレット食道、異形成、腺癌の発生は有意に低率であった。採取した胆汁の分画に関しては、control 群では UDCA が 1.2%、UDCA 以外のその他の分画が 98.8% であったのに対して、UDCA 投与群では UDCA が 69%、それ以外の分画が 31% であった。以上より UDCA は細胞毒性の強い内因性胆汁酸の割合を減じることにより、十二指腸液の逆流によるバレット食道や食道発癌を抑制し得ることが示唆された。現在、胆汁酸のリセプターである FXR や cyclooxygenase-2, ornithine decarboxylase などの発現、prostaglandin E2 の産生量を検討している。また、CMM 投与群、UDCA+CMM 併用群についても調査を行う予定である。今回の実験により、胆汁と膵液の食道発癌への関わりと、それらの阻害剤の有効性が示されると考えている。その結果、増加する逆流性食道炎の患者にとって、食道腺癌へ進展するリスクが低減されると思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：十二指腸食道逆流、食道腺癌、ウルソデオキシコール酸、メシル酸カモスタット

1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の欧米化に従って、大腸癌、乳癌、膵癌などが激増しているが、バレット

食道を背景にした食道腺癌もそのひとつである。その原因の一つとして胃食道逆流症が考えられているが、胃酸のみの逆流では食道炎は発症するものの、発癌までは至らないと

されている。一方、十二指腸液のようなアルカリ逆流により、食道に炎症からバレット食道化生や異形成を経て食道癌を発生することを、我々はラットの動物モデルを用いて証明してきた。アルカリ逆流成分の中でも原因と考えられるものとして、胆汁(特に胆汁酸)及び膵液(特にトリプシン)が挙げられているが、これらは食道上皮に重篤な炎症を惹起する。以上より、この発癌過程を抑えるためには、特にアルカリ逆流(胆汁酸・トリプシン)をコントロールすることが重要と考えられている。

内因性胆汁酸のうちリトコール酸、デオキシコール酸などは、強い細胞障害性を示すとされるが、ウルソデオキシコール酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)は細胞毒を有しない特徴がある。以前より UDCA は、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、など高度の慢性炎症性疾患に対して、有効性が示されている。UDCAは他の毒性の高い胆汁酸との置換作用により効果を発揮するものと考えられてきたが、近年 phospholipase A2 の発現を低下させることにより、prostaglandin E2(PGE2)の産生を抑制することが報告されており、直接的な作用も考えられてきている。

また膵液には多くのタンパク分解酵素(プロテアーゼ)が含まれているが、中でもトリプシンは単なるプロテアーゼとしてのみではなく、近年は proinflammatory protein として各種の遺伝子を誘導することにより、重要な働きを示すことが判明している。これに対してメシル酸カモスタット(camostat mesilate, CMM)は強力なトリプシン阻害剤として知られており、炎症の進展を根本から食い止める可能性がある。臨床的にも、慢性膵炎や逆流性食道炎の治療薬として使用されている。

2. 研究の目的

今回我々は、ラットの十二指腸食道逆流モデルを用いて、UDCA、CMM および UDCA+CMM を投与し、十二指腸液による炎症作用を抑制することにより、逆流性食道炎からバレット食道上皮を経て食道腺癌の発生に至るまでの過程を予防できるかどうか明らかにすることを目的とした。また各群の食道の炎症、バレット化生、異形成、食道腺癌の発生率を比較することにより、どの段階を最も抑制できるかを検討する。さらに十二指腸液のうち、いかなる成分がより強く発癌に影響を与えているのか、すなわち胆汁か、膵液か、その混合液かを明らかにする。

また食道癌発生の機序を解明するために、免疫組織化学染色、RT-PCR、Western blotting など分子生物学的手法を用いて各種

の遺伝子やタンパクの発現を検討する。

十二指腸液の食道への逆流は胃切除術後の患者のみならず、近年幽門機能不全の人にも起こることが示されており、十二指腸食道逆流症の数は少ないものではない。また、バレット食道癌は肥満者の多い欧米において、非常に多いことが知られているが、最近我が国でも肥満者は増加しており、過食による腹圧の上昇などから逆流性食道炎を経て食道癌に進む可能性が高い。すなわち食道腺癌の予備軍は、我が国でも増えつつあると考えられる。

癌の発症の予防という観点から「化学予防」という言葉が台頭しているが、確かなエビデンスがなければ机上の空論となる。今回の我々の実験により、胆汁と膵液の食道発癌への関わりと、それらの阻害剤の有効性が示されると考えている。その結果、今後増加が予想される逆流性食道炎の患者にとって、食道腺癌へ進展するリスクが低減される可能性が高くなる。

3. 研究の方法

7週齢の Wistar 雄性ラット(体重約 150~180g)を用いて、エーテル麻酔下に十二指腸食道逆流モデルを作成する。すなわち、胃を全摘後、空腸を起始部から約 4cm の部位で食道の断端に端側吻合する。手術を施行したラットを UDCA 投与群、CMM 群、UDCA+CMM 併用群、非投与群の 4 群に分けて、薬剤は 40 週間投与し、その後ジエチルエーテル深麻酔のもとに屠殺する。また各群において投与後 10,20,30 週目に各 5 頭ずつ屠殺し、最終的に 40 週目に 15 頭屠殺する。UDCA 投与群は 0.4%UDCA を、CMM 群は 65 mg/kg/day を経口的に投与し、UDCA+CMM 併用群では両者を単独投与と同じ濃度で摂取させる。

屠殺したラットの食道を切開し肉眼的に観察後、標本を作成しホルマリンにて固定後 HE 染色にて病理組織学的検討を行う。また後の PGE2 測定用に、食道粘膜を少し剥離採取するとともに、吻合部付近の腸液および食道内洗浄液を回収する。

食道粘膜での cyclooxygenase-2 (COX-2), ornithine decarboxylase (ODC), PAR-1, PAR-2 の発現を LSAB 法により検討するとともに、COX2, PAR-1, PAR-2 に関しては、RT-PCR 法により mRNA の発現ならびに Western blotting 法によりタンパク産物の発現を調べる。さらに RIA kit を用いて、COX2 の産物のひとつである PGE2 産生量を測定する。

また、屠殺時に食道空腸吻合部付近で採取した腸液を用いて、高速液体クロマトグラフィー法により胆汁酸分析にて胆汁酸分画を

比較するとともに、fluorometric assayにより食道内トリプシン活性の測定を行う。

4. 研究成果

食道の肉眼的観察では、control 群では食道空腸吻合部を中心に 10~20 週目にかけて、びらん、潰瘍が認められ、30 週目を越えると、隆起性病変が出現し、40 週目には大きさは 5~10mm になっていた。しかし UDCA 群では、いずれの変化も軽度であった。

病理組織学的検討では control 群に比して UDCA 投与群において食道炎に伴う増殖性変化は軽度であった。Control 群ではバレット食道が 60%に、異形成が 60%に、癌が 60%に認められたのに対して UDCA 投与群ではバレット食道が 20%に、異形成が 10%に、癌は 10%に認められ、各々の発生率は有意に抑制されていた。

胆汁酸分画の結果は平均で、control 群では UDCA が 1.2%、コール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸等 UDCA 以外の分画が 98.8%であったのに対して UDCA 投与群では UDCA が 69%、それ以外の分画が 31%であり、細胞毒性の有しない UDCA の分画が著明に増加していた。以上より UDCA は細胞毒性の強い内因性胆汁酸の割合を減じることにより、十二指腸逆流によるバレット食道や食道発癌を抑制し得ることが示唆された。

現在、胆汁酸のリセプターである FXR や COX2, ODC などの mRNA, タンパクの発現、PGE2 の産生量を検討している。また、CMM 投与群、UDCA+CMM 併用群についても調査を行う予定である。

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 8 件)

① Takashi Fujimura, (他 4 名、1 番目), Cyclooxygenase-2 (COX-2) in carcinogenesis and selective COX-2 inhibitors for chemoprevention in gastrointestinal cancers, J Gastrointest Cancer, 38, 78-82, 2008, 査読無

② Masaru Oba, Takashi Fujimura, (他 6 名、3 番目), A selective cyclooxygenase-2 inhibitor prevents inflammation-related squamous cell carcinogenesis of the forestomach via duodenogastric reflux in rats, Cancer, 115, 454-464, 2008, 査読有

③ Masaru Oba, Takashi Fujimura, (他 4 名、3 番目), Chemoprevention of glandular stomach carcinogenesis through

duodenogastric reflux in rats by a COX-2 inhibitor, Int J Cancer, 123, 1491-1498, 2008, 査読有

④ Ninomiya I, Fujimura T, (他 9 名、4 番目), Quantitative detection of TIMP-3 promoter hypermethylation and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma Oncol Rep, 20, 1489-1495, 2008, 査読無

⑤ 新村篤史, 藤村 隆, (他 12 名、13 番目)急性膵炎の重症化におけるトリプシンを介したアンギオテンシン II 産生系の関与について.胆膵の生理機能 24:25-32,2008, 査読無

⑥ Shozo Sasaki, Takashi Fujimura, (他 4 名、3 番目), Ingestion of thioproline suppresses rat esophageal adenocarcinogenesis caused by duodenogastroesophageal reflux, Oncol Rep, 18, 1443-1449, 2007, 査読無

⑦ 尾山勝信, 藤村 隆, (他 5 名、2 番目), ラット食道腺癌発癌モデルにおける cyclooxygenase (COX)-2 発現と選択的 COX-2 阻害剤による化学予防の検討. 日本消化器病学会雑誌 104, 1183-1191, 2007, 査読有

⑧ 木南伸一, 藤村 隆, (他 4 名、2 番目), 幽門側胃切除後・空腸パウチ間置再建法 (JPI), 手術, 61, 1869-1873, 2007, 査読無

[学会発表] (計 6 件)

① 尾島英介, 藤村 隆, 他, 十二指腸液逆流による食道腺癌に対するウルソデオキシコール酸による化学予防, (ミニシンポジウム) 第 19 回日本消化器癌発生学会総会, 2008.8.28, 別府

② 宮下知治, 藤村 隆, 他, GM-CSF 導入癌ワクチンによるバレット腺癌進展への抑制. (ワークショップ) 第 29 回癌免疫外科研究会 2008.06.19, 東京

③ Ninomiya I, Fujimura T, et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of TIMP-3 gene and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. The 54th Annual Congress of the Japan Section & The 14th Czech-Japan Surgical Symposium 2008.06.07, Tokyo

④ 宮下知治, 藤村 隆, 他, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor 導入癌ワクチンによるバレット腺癌進展への予防. (シンポジウム) 第 94 回日本消化器病学会総会 2008.05.9, 福岡

⑤ Ojima T, Fujimura T, Rapid diagnosis of micrometastasis of the sentinel node using double staining of hematoxylin & eosin and immunonanocrystal beads staining. 6th Biennial International Sentinel Node Society Meeting 2008.02.19, Sydney

⑥新村篤史,藤村 隆,他, ラット重症膵炎でのトリプシンを介したRAS非依存性アンギオテンシンⅡの関与.(ワークショップ) 第38回日本膵臓学会大会 2007.06.28, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 隆 (FUJIMURA TAKASHI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号 50262580