

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09352

研究課題名(和文)パレット食道癌の生存・増殖・浸潤・脂肪滴沈着における脂肪組織の役割とその制御機構

研究課題名(英文)The roles and regulation-mechanisms of adipose tissue in the survival, growth, invasion and lipid deposition of Barrett's esophageal cancer

研究代表者

戸田 修二 (SHUJI, TODA)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80188755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：内臓、皮下脂肪組織は、パレット食道癌細胞の増殖、浸潤を促進し、アポトーシスを抑制した。脂肪酸輸送・合成分子(FATP-1, -4, -6, CD36)、脂肪滴形成・輸送分子(Perilipin-1, 2)、脂質情報伝達分子(PAF)、MAPK pathwayの発現を促進した。

以上、パレット食道癌の進展には、内臓、皮下脂肪組織が関与していることが示唆され、その基盤分子は脂肪酸輸送・合成分子(FATP-1, -4, -6, CD36)、脂肪滴形成・輸送分子(Perilipin-1, 2)、脂質情報伝達分子(PAF)、MAPK pathwayの関与が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、パレット食道癌の発症と内臓、皮下脂肪組織の増加を基盤とする肥満との関連が疫学的に示唆されている。我々の研究では、脂質関連分子や細胞情報伝達分子(MAPK)の発現亢進を介して、内臓、皮下脂肪組織がパレット食道癌の進展促進に深く関与すること示している。この結果は、肥満やメタボリックシンドロームが、パレット食道癌の危険因子となることを示唆している。従って、肥満、メタボリックシンドロームの予防がパレット食道癌の予防につながると思われる。さらに、上記分子の阻害因子がパレット食道癌の治療に応用できる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Both visceral and subcutaneous adipose tissues (VAT and SAT) promoted the growth and invasion of Barrett esophageal cancer cells, but VAT and SAT inhibited the apoptosis. Along with these phenomena, VAT and SAT promoted the expression of fatty acid-transfer and -synthesis molecules (FATP-1, -4, -6, CD36), lipid droplet-synthesis and -transfer agents (Perilipin-1, 2), lipid signaling molecules (PAF) and MAP kinase pathway. These results suggest that both VAT and SAT may be involved in the progression of Barrett Esophageal cancer through lipid-related molecules and MAPK pathway above. Thus, obesity may be a risk factor for Barrett esophageal cancer.

研究分野：病理学

キーワード：パレット食道癌 内臓脂肪 皮下脂肪 脂肪滴沈着 増殖 アポトーシス 浸潤 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

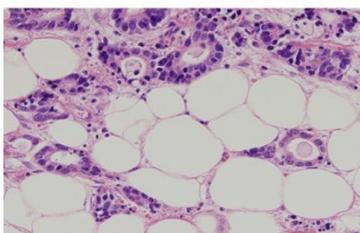
1. 研究開始当初の背景

バレット食道癌(腺癌)は、欧米では肥満に関連して増加しており、日本でもその増加が危惧されている(Ther Adv Gastroenterol 7:247-268, 2014; 日消誌 105:1325-9, 2008)。事実、バレット食道癌の発症リスクと内臓、皮下脂肪組織の増加を基盤とする肥満との関連が疫学的に示唆されている(Cancer Epidemiol 42:9-14, 2016; Lancet 371:569-78, 2008)。しかし、脂肪組織がバレット食道癌にどのような影響を与えているか、その詳細は不明である。一般に、バレット食道癌は粘膜内で発生し、粘膜下層筋層外膜下層へと浸潤する(図1)。一方、粘膜下層、外膜下層、腹腔内には豊富な脂肪組織が存在する。それ故に、脂肪組織がバレット食道癌細胞の生存、増殖、浸潤、転移に活発に影響していると予想される。しかし、脂肪組織がバレット食道癌細胞に与える直接的な影響を解析した研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。

これまで、脂肪組織を培養することは困難であった。我々は初めて脂肪組織の器官培養系を確立し、脂肪組織の長期維持、脂肪酸、アディポカイン産生を見出した(Toda et al. Endocrinology 149:4794-98, 2008)。さらに、尿管上皮や心筋細胞、肝細胞-脂肪組織解析モデルを考案し、脂肪組織が尿管上皮の機能分化、グリコーゲン産生を促進し、細胞死を抑制すること(Toda et al. Kidney Int 78:60-8, 2010)や、心筋細胞、肝細胞に脂肪滴沈着・細胞死促進、分化抑制(脂肪毒性)を誘導することを見出した(Toda et al. Endocrinology 152:1599-605, 2011; Toda et al. Cell Tissue Res 352:611-21, 2013)。以上により、脂肪組織がバレット食道癌細胞に与える直接的な影響を解析することが初めて可能となった。

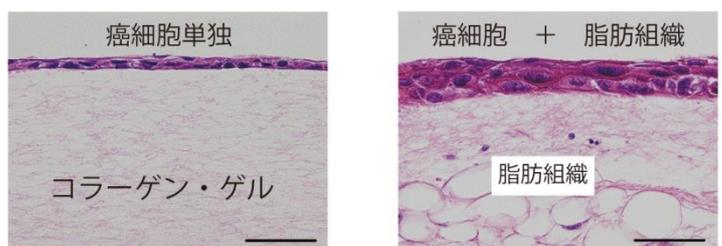
最近、脂肪組織由来の脂肪酸が乳癌、前立腺癌、卵巣癌などの腺癌細胞に脂肪滴として取り込まれ、エネルギー源や情報伝達脂質として、癌細胞の増殖・浸潤・転移に関与することが示唆されている(J Lipid Res 57:193-206, 2016; Int J Mol Sci 17:1430, 2016; Biochim Biophys Acta 1831:1499-508, 2013)。我々も、食道の扁平上皮癌-脂肪組織解析モデルを考案し、脂肪組織がIGF-1情報伝達経路を介して、癌細胞の肥大・増殖(図2)・浸潤・脂肪滴沈着を促進し、アポトーシスを抑制することを見いだした(Toda et al. Am J Pathol 186:1180-94, 2016)。しかし、腺癌であるバレット食道癌での研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。

図1 バレット食道癌(腺癌)



癌の外膜下脂肪組織への浸潤

図2 食道扁平上皮癌細胞-脂肪組織相互作用解析モデル



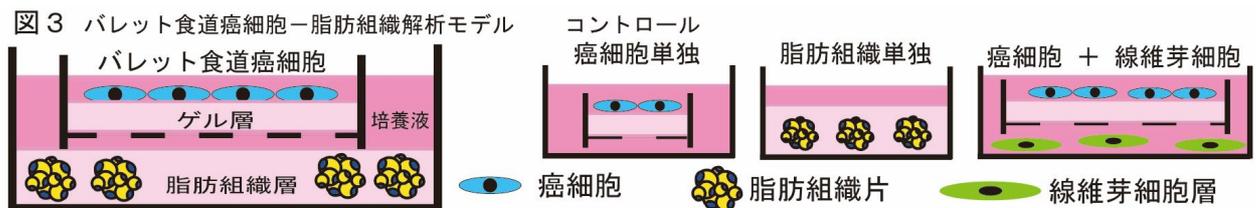
以上の背景に基づいて、バレット食道癌の生存、増殖、浸潤、脂肪滴沈着における脂肪組織の役割とその制御機構を解明する本研究を着想した。

2. 研究の目的

近年、バレット食道(BE)癌の発症と内臓、皮下脂肪組織の増加を基盤とする肥満との関連が示唆されている。BE癌は粘膜内で発生し、粘膜下層筋層外膜下層へと浸潤する。一方、粘膜下層、外膜下層、腹腔内には脂肪組織が存在する。さらに、脂肪組織由来脂質が癌細胞に脂肪滴として取り込まれ、癌細胞の細胞動態に影響することが示唆されている。それ故に、脂肪組織がBE癌の細胞動態に活発に影響していると予想される。しかし、脂肪組織がBE癌細胞に与える影響を解析した研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。我々は、初めて脂肪組織の器官培養系を開発し、脂肪組織がBE癌細胞に与える直接的な影響を解析することを可能にした。本研究では、BE癌細胞の生存、増殖、浸潤、脂肪滴沈着における脂肪組織の役割とその制御機構を解明する。本研究により、上記2種類の脂肪組織のBE癌に与える影響とその制御因子の同定や、BE癌の新規分子標的治療薬の開発が期待できる。

3. 研究の方法

- 1) **材料**： バレット食道癌細胞：FLO-1, OE33 (ヒト腺癌細胞株) 及び手術材料のバレット食道癌より単離した癌細胞 (学内倫理委員会の認可症例) を用いる。 脂肪組織：ヒト (剖検例や手術症例、学内倫理委員会の認可症例) 及び 6, 12 週齢マウス、ラットの臓器、皮下脂肪組織を細切した脂肪組織片を用いる。
- 2) **培養システム**：バレット食道癌細胞 - 脂肪組織解析モデルを用いる (図3、文献1, 54 を基盤に考案した)。外皿に、0.5-1 mm 径に細切した脂肪組織片 (0.5 ml) を 5 ml の I 型コラーゲン・ゲル内に包埋し、1 日間培養する。同時に、底面がニトロセルロース膜から成る内皿に 1 ml のコラーゲン・ゲル層を作製し、そのゲル層上に癌細胞 (10 万個) を播種し、1 日間培養する。その後、内皿を外皿に入れて培養する。対照は、癌細胞、脂肪組織片の単独培養である。脂肪組織が癌細胞に与える影響の特異性を検証するために、外皿に線維芽細胞 (3T3 細胞株、手術例、剖検例より単離した線維芽細胞) を培養した系で、内皿に癌細胞を培養する。培養 1, 2, 3 週で、癌細胞 - 脂肪組織解析モデルで再現された現象を、ホルマリン及びグルタルアルデヒド固定切片、細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて、以下のように解析する。
- 3) **癌細胞の形態、生存、増殖の解析 (坂田担当)**：癌細胞の形態をヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色、電顕で、アポトーシスを cleaved caspase-3, ssDNA の免疫染色で、増殖を 24 時間ウリジン (BrdU) 摂取率、Ki-67 免疫染色で、比較検討する。以上により、内臓、皮下脂肪組織がバレット食道癌細胞の形態、生存、増殖に与える影響を解明する。



- 4) **癌細胞のゲル内遊走、浸潤の解析**：本解析モデルで、癌細胞のゲル内への遊走や浸潤を H&E 染色で形態的に検討する。さらに、遊走関連分子 (filamin A, laminin-5, E-cadherin など) や浸潤関連分子 (MMP-1, 2, 9 など) を免疫染色、Western blot、real-time RT-PCR を用いて、解析する。以上により、内臓、皮下脂肪組織がバレット食道癌細胞の遊走、浸潤に与える影響とその相違および分子基盤を解明する。
- 5) **癌細胞 - 脂肪組織相互作用関連分子の解析**：本研究では、脂肪組織関連分子 (Biochim Biophys Acta 1831: 1499-508, 2013) として、以下の分子を解析する。脂肪酸を細胞内に取り込む脂肪酸輸送・合成分子 (FATP-1, -4, -6, CD36; FAS)、脂肪滴形成・輸送分子 (Perilipin-1, 2, 3)、脂質情報伝達分子 (PAF, S1P, LPA)、癌と炎症に関連する脂肪細胞が分泌する機能性膜小胞であるアディポゾーム [ExoELISA キット、フナコシ社製] (Metabolism 60:1021-37, 2011)、脂肪酸刺激に伴うストレス応答としてセラミドの発現

や酸化ストレス分子（酸化ストレスマーカー：8-OHdG、4-HNE；酸化ストレスシグナル：NF- κ B, ERK-1/2, p38；酸化ストレス防御因子：SOD）小胞体ストレス分子（アポトーシス促進シグナル：IRE1、JNK；小胞体ストレス防御シグナル：PERK、eIF2、ATF6、）分子の発現を、免疫組織化学、ELISA、Western blot、real-time RT-PCR で比較検討する。さらに、肥満と関連する癌の情報伝達分子（Obes Res 12: 1063-70, 2011）である MAPK, STAT3 pathway, IGF-1/PI3K/ AKT/mTOR/AMPK pathway, COX-2, HER2（分子標的療法）の発現を同様に比較検討する。また、パレット食道癌の発癌関連因子（Ann NY Acad Sci 1300:187-99, 2013）であるオートファジー調節分子（Beclin-1 など）や miRNAs（miRNA-21, 93, 143 など）の発現を比較検討する。癌細胞の脂肪滴沈着は、オイルレッド O 染色と透過電顕を用いて検討する。以上により、内臓、皮下脂肪組織がパレット食道癌細胞の脂肪酸輸送/合成・脂肪滴形成/輸送・アディポゾーム・酸化ストレス・小胞体ストレス・オートファジー分子、情報伝達分子、miRNAs の発現、脂肪滴沈着に与える影響とその相違を明らかにする。

- 6) 脂肪組織のアディポカイン・脂肪酸産生の解析： 培養液中のアディポカイン（leptin、adiponectin、nesfatin-1、visfatin、resistin、TNF- α 、PAI-1、IGF-1 など）を ELISA キットで（文献 49, 54）脂肪酸（パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、アラキドン酸、DHA、EPA など）[Clin Sci 112:27-42, 2007；文献 37, 49]を酵素法（SRL 社に外注）で測定する。以上により、内臓、皮下脂肪組織のアディポカイン・脂肪酸産生能の相違を比較検討し、脂肪組織がパレット食道癌細胞に与える影響に關与するアディポカイン、脂肪酸を明らかにする。

以上により、パレット食道癌細胞の生存、増殖、浸潤、脂肪滴沈着における内臓、皮下脂肪組織の影響とその相違や制御機構を解明する。正常脂肪組織で影響が見られない場合は、肥満モデル動物の病的脂肪組織を使用する。また、今回の培養系は癌細胞と脂肪組織の細胞接触のない条件で解析しているため、細胞接触のある混合培養系を用いる。

平成 29 年度に同定した制御因子に加えて、cDNA microarray による網羅的遺伝子解析により同定した候補遺伝子の蛋白とその阻害因子（中和抗体、siRNA、shRNA など）やアディポカイン、脂肪酸、アディポゾームの投与実験により、脂肪組織誘導性の癌細胞の細胞動態の仲介因子を同定する。【平成 31 年度】は、これまでの実験から予想される癌細胞のアポトーシス、増殖、浸潤や脂肪滴沈着の促進因子や防御因子を癌細胞単独培養系、癌細胞 - 脂肪組織混合培養系や癌細胞移植スキッドマウスに投与し、上記現象の促進及び阻害効果を比較検討し、パレット食道癌の新規分子標的治療薬としての可能性を追求する。

本研究により、パレット食道癌の生存、増殖、浸潤、脂肪滴沈着における内臓、皮下脂肪組織の役割とその制御機構を解明し、メタボリック症候群由来の病的脂肪組織がパレット食道癌細胞に与える影響とその制御機構を解明する研究に発展させる予定である。余裕があれば、肥満症脂肪組織を用いた予備実験を行う予定である。

4. 研究成果

内臓、皮下脂肪組織は、癌細胞の増殖、浸潤を促進し、アポトーシスを抑制した。さらに、脂肪酸輸送・合成分子（FATP-1, -4, -6, CD36）、脂肪滴形成・輸送分子（Perilipin-1, 2）、脂質情報伝達分子（PAF）の発現を促進した。また、MAPK pathway の発現亢進が見られた。しかし、STAT3 pathway, IGF-1/PI3K/ AKT/mTOR/AMPK pathway の発現促進傾向がみられたが、有意

差は見られなかった。

以上、バレット食道癌の進展には、内臓、皮下脂肪組織が関与していることが示唆され、その基盤分子は脂肪酸輸送・合成分子(FATP-1, -4, -6, CD36) 脂肪滴形成・輸送分子(Perilipin-1, 2) 脂質情報伝達分子 (PAF) MAPK pathway の関与が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akutagawa T, Aoki S, Yamamoto-Rikitake M, Iwakiri R, Fujimoto K, Toda S	4. 巻 6
2. 論文標題 Cancer-adipose tissue interaction and fluid flow synergistically modulate cell kinetics, HER2 expression, and trastuzumab efficacy in gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 946-955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-018-0829-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	坂田 資尚 (YASUHISA SAKAT) (50404158)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	