

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15936

研究課題名(和文)メタボリック症候群を基盤病態とする大腸発癌の特性：分子異常とmiRNAの解析

研究課題名(英文)Characteristics of colorectal carcinogenesis based on metabolic syndrome: molecular abnormality and alteration of miRNA expression

研究代表者

久保田 全哉 (Kubota, Masaya)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90542407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸発癌における生活習慣病等の環境素因と遺伝子異常に着目した研究を行った。遺伝子変異を有するMinマウスと、肥満・2型糖尿病を呈するdb/dbマウスを交配し作製した新規肥満関連大腸発癌モデルマウスは、対照マウスと比較し肥満・高インスリン血症・脂質異常症を発症すること、および腸管腫瘍数が増加することを見出した。このマウスへの糖尿病治療薬メトホルミンや緑茶カテキンの投与により腸管腫瘍の発生数が減少した。また、db/dbマウスを用いた実験において糖尿病治療薬であるSGLT2阻害薬によって大腸発癌が抑制された。糖尿病治療薬や植物由来化学物質によって肥満関連大腸発癌が抑制されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や糖尿病をはじめとする生活習慣病患者の増加は重要な社会問題であり、また、これらの疾患を合併する大腸癌患者の増加が危惧されている。本研究結果は、臨床で使用されている糖尿病治療薬や日常生活で摂取可能な植物由来化学物質(phytochemical)が、肥満に関連する大腸発癌を抑制する上で有効であることを示しており、大腸発癌リスクの高い肥満や糖尿病を合併した患者の予後改善・再発予防への寄与が期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted focusing on environmental factors such as lifestyle-related diseases and gene abnormalities in colorectal carcinogenesis. A novel obesity-related colorectal carcinogenesis model was constructed by crossing APC-mutated Min mouse and db/db mouse exhibiting obesity/type 2 diabetes. It was found that this mouse developed obesity, hyperglycemia, hyperinsulinemia, and dyslipidemia, and that the incidence of tumors in the intestinal tract increased significantly compared to the control. Administration of the anti-diabetic drug metformin and green tea catechin to the mice reduced the number of intestinal tumors. Moreover, development of colorectal neoplasms was suppressed by an anti-diabetic drug SGLT2 inhibitor in a colon carcinogenesis model using db/db mice. The results indicated the possibility that obesity-related colorectal carcinogenesis is suppressed by anti-diabetic agents and phytochemicals.

研究分野：大腸癌基礎

キーワード：肥満関連大腸発癌 大腸癌 化学予防

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 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の上位に位置する悪性疾患である。大腸発癌過程において、様々な遺伝子の変異・発現異常が報告されているが、その中でも特に、家族性大腸腺腫症 (FAP) の原因遺伝子として同定された adenomatous polyposis coli (APC) 癌抑制遺伝子の変異は、散在性大腸癌でも 80-90% の頻度で認められることが知られている。APC の不活化により Wnt シグナルの伝達因子である beta-catenin タンパクが細胞質や核内に異常蓄積し、転写因子である Tcf4 と結合して標的遺伝子の転写を活性化することが、大腸前癌病変である大腸腺腫の形成に深く関与していることが明らかになっている。一方、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症候群に伴った病態が、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・糖尿病に関連した分子異常としては、インスリン抵抗性、インスリン様増殖因子経路 (IGF/IGF-1R) の過剰活性化、内臓脂肪増加に伴う adipokine 不均衡と慢性炎症状態、酸化ストレス亢進による DNA 損傷などが挙げられるが、これらの病態は、協調的に働きながら大腸発癌を促進しているものと考えられている。すなわち大腸癌は、「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。

上記の遺伝子異常と肥満・糖尿病に関連した分子異常の相互作用を検証するため、申請者らは APC ヘテロ変異を有する C57BL/6J-ApcMin/+ (Min/+) マウスと、レプチン受容体変異により肥満・2型糖尿病を呈する C57BLKS/J-+Leprdb/+Leprdb (db/db) マウスを交配し、新規肥満関連大腸発癌モデルである“db/db-Min/+マウス”を作成した。このマウスは対照群と比較して、肥満・高血糖・高インスリン血症・脂質異常症の発症、および腸管における腺腫発生個数の有意な増加が確認された。そのため、同マウスは、APC の遺伝子異常と肥満・インスリン抵抗性・脂質異常症を併発する、ヒト大腸発癌、特にメタボリック症候群を基盤病態とした大腸発癌を反映した動物モデルであると考えられる。

また近年、機能性 RNA の一種であるマイクロ RNA (miRNA) が注目されている。主に細胞が分泌する小胞顆粒 (エクソソーム) 中に存在し、細胞間の情報伝達物質として機能する miRNA は、mRNA の非翻訳領域に配列相補的に結合し、遺伝子機能を調節することにより発生、発癌、老化などに寄与している。これまで、様々な臓器の悪性腫瘍においてその発現が亢進あるいは低下する miRNA が数多く報告されており、大腸癌組織においては、miRNA-21 および miRNA-31 発現の増強が、腫瘍増殖や治療抵抗性に関与することが示唆されている。しかし、その他の miRNA と大腸癌の関連性については不明な点が多く、さらに、大腸発癌過程における miRNA 発現の変化や、肥満に関連した大腸発癌に特徴的な miRNA について解析した報告はみられない。

### 2. 研究の目的

新規モデル db/db-Min/+マウスにおける肥満に関連した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・糖尿病と大腸発癌を結びつける分子異常、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。また、メタボリック症候群を基盤とする大腸発癌過程における miRNA 発現を網羅的に解析し、特徴的な変化を明らかにする。さらに、APC 遺伝子変異・肥満関連大腸発癌を抑制する候補薬剤を探索・同定する。

### 3. 研究の方法

新規モデル db/db-Min/+マウスの大腸粘膜における経時的な遺伝子発現の変化やタンパクの相互作用、細胞内シグナルの変化について免疫染色、western blot、リアルタイム定量 PCR を用いて詳細な解析を行う。また、同マウスを用いた大腸発癌モデルで得られた腫瘍部および非腫瘍部組織より、miRNA 網羅的解析のために RNA を精製するとともに、遺伝子およびタンパク質発現の変化について解析を行い、大腸発癌を促進または抑制する候補遺伝子をスクリーニングする。

さらに、大腸発癌モデルに各種薬剤を投与し、それらの発癌抑制効果とその機序について検討する。レニン-アンジオテンシン阻害剤 (降圧剤) や様々な生活習慣病治療薬 (具体的には糖尿病治療薬、脂質異常症治療薬等) の有効性を検証する。そして、これらの薬剤が、抽出された候補分子の発現変化に影響を与えるか確認する。また、緑茶カテキンやアスタキサンチン等の植物由来化学物質についても同様の検討を行う。

### 4. 研究成果

免疫組織染色によるタンパク質発現の解析から、db/db-Min/+マウス大腸粘膜における IGF/IGF-1R 経路の過剰活性化が確認された。5週齢雄性 db/db-Min/+マウスに糖尿病治療薬メトホルミンおよび緑茶カテキンを10週間経口投与したところ、対照群と比較して有意に腸管腫瘍の発生数が減少していた。大腸腫瘍に限定した解析では、発生数が少なく有意差はないものの減少傾向にあった。これら薬剤および化学物質による、肥満に関連した消化管発癌に対する抑制作用が示された。

さらに、他の糖尿病治療薬の発癌抑制効果についても検討を進めた。肥満糖尿病モデルである db/db マウスに大腸発癌剤 azoxymethane (AOM) を注射、その後15週間 SGLT2 阻害薬トログリフロジン (TOF) を経口投与した。大腸前癌病変である beta-catenin accumulated crypt (BCAC)

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

の解析において、AOM 単独群に比して AOM/TOF 群において BCAC 数の有意な減少が認められた。大腸粘膜における mRNA 発現解析では、AOM/TOF 群において IGF-1 mRNA 発現の低下がみられた。また、血清 TNF-alpha およびグルコースも同様の傾向であった。白色脂肪組織の解析では、TOF 投与によって F4/80 陽性細胞数は有意に減少しており、また、TNF-alpha および CCL2 mRNA 発現の低下傾向が認められた。ヒト大腸癌細胞株における SGLT2 のタンパク質発現は、HT29 および SW480 を含む 4 種類の細胞株で確認されたが、48 時間の TOF で処理した後に細胞増殖アッセイを行ったところ、それら細胞の増殖に有意な差はみられず、TOF による細胞増殖への直接的な影響は認められなかった。SGLT2 阻害薬 TOF は、肥満糖尿病モデルマウスにおいて大腸前癌病変の発生を抑制し、その機序として慢性炎症の改善と高血糖の是正が考えられた。一般臨床で使用されている SGLT2 阻害薬が、肥満糖尿病患者の大腸発癌を予防する可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shirakami Yohei, Kochi Takahiro, Kubota Masaya, Sakai Hiroyasu, Ibuka Takashi, Yoshimi Kazuto, Kuramoto Takashi, Tanaka Takuji, Shimizu Masahito, Seishima Mitsuru	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibitory effects of pentoxifylline on inflammation-related tumorigenesis in rat colon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 33972-33981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.26119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takada Jun, Araki Hiroshi, Mizutani Taku, Ozawa Noritaka, Sugiyama Tomohiko, Kubota Masaya, Ibuka Takashi, Shimizu Masahito	4. 巻 37
2. 論文標題 Safety of Carbon Dioxide Insufflation during Endoscopic Submucosal Dissection for Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestive Diseases	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000492870	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 -
1. 著者名 Sugiyama T, Araki H, Ozawa N, Takada J, Kubota M, Ibuka T, Shimizu M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Carbon dioxide insufflation reduces residual gas in the gastrointestinal tract following colorectal endoscopic submucosal dissection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 257-263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2018.1044.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takada J, Araki H, Ozawa N, Sugiyama T, Kubota M, Ibuka T, Shimizu M.	4. 巻 50
2. 論文標題 Effective Treatment of Cytotoxic Agent Refractory Alpha-Fetoprotein-Producing Gastric Cancer with Ramucirumab: a Case Report and Review of the Literature.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastrointest Cancer	6. 最初と最後の頁 556-559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12029-017-0043-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ibuka T, Araki H, Sugiyama T, Takada J, Kubota M, Shirakami Y, Shiraki M, Shimizu M, Suzui N, Miyazaki T.	4. 巻 114
2. 論文標題 A case of an elderly patient with inverted Meckel's diverticulum with small intestinal bleeding detected using capsule and double-balloon endoscopies.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi	6. 最初と最後の頁 2005-2011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.11405/nisshoshi.114.2005.	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 -

1. 著者名 Fukuta K, Shirakami Y, Maruta A, Obara K, Iritani S, Nakamura N, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Preventive Effects of Pentoxifylline on the Development of Colonic Premalignant Lesions in Obese and Diabetic Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 pii: E413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18020413.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yohei Shirakami, Koki Obara, Masaya Kubota, Hiroyasu Sakai, Takuji Tanaka, Masahito Shimizu, Mitsuru Seishima
2. 発表標題 Effects of the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on hepatoma cell lines and liver tumorigenesis
3. 学会等名 109th American Association for Cancer Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田全哉、小島健太郎、小澤範高、杉山智彦、高田 淳、井深貴士、荒木寛司、清水雅仁
2. 発表標題 当院における食道ESD後の狭窄予防および発生した狭窄に対する治療に関する検討
3. 学会等名 第93回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白上洋平、河内隆宏、久保田全哉、清水雅仁、清島 満
2. 発表標題 大腸発癌モデルにおけるペントキシフィリンの発癌抑制効果
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保田全哉、手塚隆一、前田俊英、小島健太郎、大西雅也、中村みき、小澤範高、長谷川恒輔、杉山智彦、華井竜徳、高田 淳、境 浩康、井深貴士、白上洋平、末次 淳、白木 亮、荒木寛司、清水雅仁
2. 発表標題 胃Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) の臨床病理学的検討
3. 学会等名 JDDW2017 (第59回日本消化器病学会大会)
4. 発表年 2017年

〔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
---------------------------	-----------------------	----