

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18590696
 研究課題名（和文）アラキドン酸代謝からみたバレット食道・腺癌発生過程の分子機構の解明
 研究課題名（英文）Role of arachidonic acid in development of Barrett's esophagus and cancer
 研究代表者
 藤原 靖弘（FUJIWARA YASUHIRO）
 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：40285292

研究成果の概要：BN ラットの空腸食道吻合により、バレット食道・食道腺癌が発生した。食道粘膜炎症部では PGE2 が増加しており、COX-2 および mPGES-1、EP4 受容体の発現が増強していた。また酸逆流により喘息ラットにおける好酸球を主体とした気道炎症増強および Th2 系サイトカイン発現増加が確認された。一方、正常ヒト食道扁平上皮細胞に混合胆汁酸を曝露させることで、腸上皮化生のマーカーである Cdx2 誘導が惹起された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：バレット食道、食道腺癌、プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

欧米における 20 世紀後半からの著明なバレット食道癌（食道腺癌）の増加は、他のどのタイプの癌にも見られない変化とされている。このような増加の背景には、胃食道逆流症や前癌病変とされるバレット食道の罹患率増加や *Helicobacter pylori* 感染率の低下が要因と考えられている。したがって、我が国においても、50 歳以下の低い *H. pylori* 感染率や生活習慣の欧米化を考慮すると、今後バレット食道や腺癌の増加が予測される。実際、本邦における胃食道逆流症の増加が疫学

的に指摘されている。しかしながら、食道の重層扁平上皮が円柱上皮化生さらに癌化へと進展する過程のメカニズム、バレット食道癌の増殖やアポトーシスなどを制御する因子については不明な点が多い。バレット食道およびその癌化には、逆流に含まれる物質、特に酸や胆汁が密接に関係しているが、これらにより活性化されるものとして、ラットやイヌでのバレット食道・腺癌モデルを用いた基礎的研究の成果により、アラキドン酸代謝に関わる cyclooxygenase-2 (COX-2) や prostaglandinE2 (PGE2) の関与が報告され

ている。しかしながら、その詳細な病態については不明な点が多い。特に PGE2 生合成経路の最終段階をつかさどる PGE2 合成酵素 (PGES) や PGE2 受容体 (EP) の動態については不明である。現在、PGES には常在的に存在する COX-1 と機能的に連関すると言われる cytosolic PGES (cPGES) と膜結合型 PGES である microsomal PGES (mPGES) があり、mPGES には COX-2 と機能的に連関するとされる mPGES-1 と glutathione-S-transferase のグループに属さない mPGES-2 が同定されている。EP についても EP1~EP4 までの幾つかのサブタイプが明らかとなっている。しかしながら、酸や胆汁曝露による食道炎からバレット食道、腺癌発生過程における詳細なアラキドン酸代謝の役割は不明な点が多い。

2. 研究の目的

バレット食道・腺癌を発生させるマウスモデルを確立し、その病態にどのようなアラキドン酸代謝が関与するかを検討する。具体的な標的分子としては、COX-2、PGES、PGE2、EP の経路ではあるが、他のアラキドン酸代謝経路も検討することにより、その意義を明らかにしていきたい。さらに培養細胞を用いた検討によりアラキドン酸代謝と腫瘍増殖やアポトーシスとの関連やそれに関わる分子シグナルを同定する。具体的には

(1) バレット食道腺癌発生マウスモデルの樹立とアラキドン酸代謝産物、合成経路、受容体の発現動態。

(2) アラキドン酸代謝系における各種阻害剤および標的分子のノックアウトマウスを用いたバレット食道および腺癌発生率の検討。

(3) 食道腺癌培養細胞を用いた検討 (酸・胆汁などの刺激による COX-PGES-PGE2-EP 系の発現動態と関与する細胞内シグナルの検討およびプロスタノイドが細胞増殖、遊走、浸潤、アポトーシスに与える影響) について検討する

3. 研究の方法

(1) 動物モデルを用いた検討

バレット食道・食道腺癌の動物モデルとして、前胃切除、空腸—食道吻合を行った。マウスは外科的処置後 20 週から 40 週までに屠殺し、肉眼的、組織学的にバレット食道や食道腺癌発生の有無を検討する。食道組織を摘出し、PG、LT、TX を抽出、EIA 法にて測定する。(また、アラキドン酸代謝産物の測定結果を踏まえて LT および TX 系の検討も加える。具体的には、ウエスタンブロット法、免疫組織化学

染色、ノーザンブロット法、Real-time RT-PCR 法により発現動態を検討する。さらに、PGE2 生合成に関わる PGES (mPGES-1、mPGES-2、cPGES) やプロスタグランジン受容体の発現を検討する。

(2) 培養細胞を用いた検討

食道培養細胞として、ヒト由来のバレット食道癌細胞株 (TE-7、OE33) および正常食道上皮細胞 (Het-1A) を用いて検討した。扁平上皮から円柱上皮あるいは癌化へと至る過程には胃酸のみならず胆汁を含めた十二指腸液の食道への逆流が重要であると考えられるため、細胞外に同様の条件を設定し、刺激により細胞より産生されたアラキドン酸代謝産物を EIA 法にて測定する。外的刺激として、酸 (pH 3-6)、胆汁酸、酸と胆汁の組み合わせを曝露させた。アラキドン酸代謝産物として、PGE2、PGI2、LTB4、LTC4/D4/E4、TXA2 などについて測定する。PGE2 などプロスタノイド投与による細胞機能変化と標的受容体の同定、細胞機能評価として、細胞増殖 (³H-thymidine 取り込み、MTT アッセイ)、アポトーシス (HOECHST 染色、caspase 活性測定)、細胞遊走、浸潤能について検討を行う。

4. 研究成果

(1) バレット食道モデルの検討

研究当初、マウスモデルを用いて検討する予定であったが、小動物のため手技的に極めて困難であり、かつ術後生存期間が短いこと、長期生存例での検討でも多くは慢性炎症所見のみで、明らかバレット食道や腺癌の発生が認められなかったことから、ラットモデルに変更した。その際、バレット食道が Th2 優位であることに着目して Brown-Norway (BN) ラットを用いた。食道胃接合部を切断し、空腸と食道吻合を行った。術後 30 週で屠殺したところ、約 70% のラットにバレット食道形成が確認され、腺癌も数病変認められた。

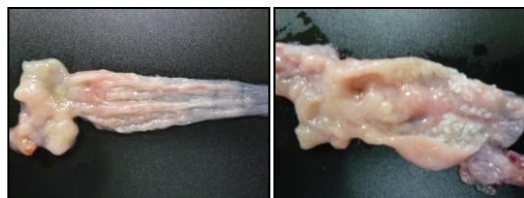


図 1. 肉眼所見

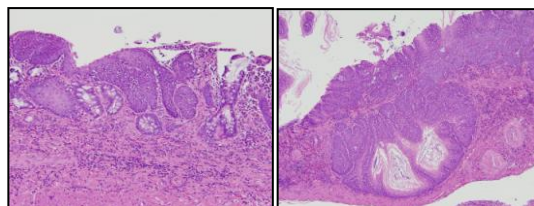


図 2. 組織所見

一方、この BN ラットを用いた実験系で、胃食道逆流症と強い関連のある喘息が Th2 優位な疾患であることから、GERD と喘息 (BA) の相互関連を検討したところ、RE+BA 群では BA 群に比較して、気管支肺洗浄液中の浸潤炎症細胞数、特に好酸球や Th2 系サイトカインである IL-13 濃度増加など OVA 惹起性気道炎症を増悪させた。一方、食道も RE 単独に比較して RE+BA 群では粘膜層における好酸球浸潤増加を認め、また食道粘膜内の Th2 系サイトカインや RANTES など好酸球浸潤に関わるサイトカイン mRNA 発現増加が確認された。この成果は、臨床的に関連が示唆される 2 つの疾患の病態について動物モデルを用いて初めて証明したものであり、両疾患が高頻度に合併することから、創薬分野でも有意義なモデルといえる。国内外でも高い評価を受けた。

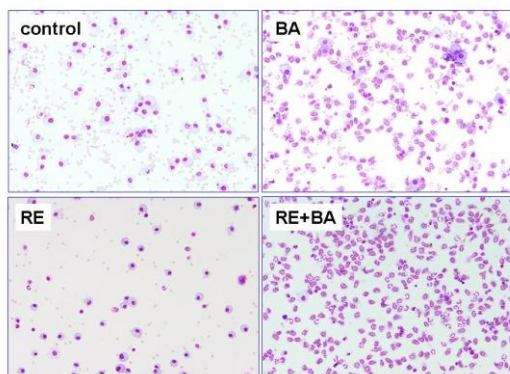


図 BALF 中の炎症細胞

アラキドン酸代謝に関しては、正常食道粘膜に比較して PGE2 や LTB4 の増加を認めたことから、その合成経路について検討した結果、COX-1 や cPGES、mPGES-2 の発現は変化を認めなかったが、COX-2 および mPGES-1 の蛋白及び mRNA 発現増強が確認された。PGE2 受容体のうち EP4 発現が増加していた。一方 LT 系についても、LTB4 増加を認め、LOX および LTA4 hydase の増加が確認された。さらに COX-2 阻害薬投与により食道炎症は抑制された。以上の結果より、アラキドン酸代謝や関与する合成酵素の誘導が病態形成に重要なことが判明した。この成果は国内外の学会にて発表し、高い評価を受けた。今後、PGE2 受容体拮抗薬や PGE2 代謝酵素などの関与について検討について新しい展開が期待される。

(2) 培養細胞を用いた検討

Het-1A 細胞において、腸上皮活性マーカーである Cdx-2 の発現は認めなかった。Het-1A 細胞に様々な濃度・種類の胆汁及び酸を経時的に曝露させ、細胞生存率、Cdx の発現を検討したところ、混合胆汁酸 400 μ M の 10 分間、1

日 2 回、48 時間刺激では細胞生存率に影響を与えずに、Cdx-2 の誘導が惹起された。一方、食道上皮細胞 (TE-1, HEEC) を用いて酸惹起性細胞傷害に対する EGF の保護作用とその機序について検討したところ、EGF が細胞内 pH を制御する NHE-1 活性化を誘導することにより発揮されることを明らかにし、さらにその経路として PI3K と Calmodulin の関与を証明した。これらの成果は国内外の学会に発表した。今後、食道上皮細胞培養細胞において Cdx-2 など腸上皮化生マーカーの発現の可逆性が検討可能であり、その因子を解明することによりバレット食道から正常扁平上皮に戻しうる物質の同定を試みたい。

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 10 件)

- ① Otani K, Watanabe T, Tanigawa T, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Arakawa T. Anti-inflammatory effects of IL-17A on Helicobacter pylori-induced gastritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;382(2):252-8 査読有
- ② Sugawa T, Fujiwara Y, Yamagami H, Watanabe K, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. A novel rat model to determine interaction between reflux oesophagitis and bronchial asthma. *Gut.* 2008;57(5):575-81. 査読有
- ③ Tanaka F, Tominaga K, Shiota M, Ochi M, Kuwamura H, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Iwao H, Arakawa T. Interleukin-10 gene transfer to peritoneal mesothelial cells suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer cells due to a persistently high concentration in the peritoneal cavity. *Cancer Gene Ther.* 2008;15(1):51-9. 査読有
- ④ Tanaka F, Tominaga K, Ochi M, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Ohta K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced

- colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats. *Life Sci.* 2008;83(23-24):771-9. 査読有
- ⑤ Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, Nishio H, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Takeuchi K, Arakawa T. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut.* 2008;57(2):181-7. 査読有
- ⑥ Kuwamura H, Tominaga K, Shiota M, Ashida R, Nakao T, Sasaki E, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Ichijo H, Arakawa T, Iwao H. Growth inhibition of colon cancer cells by transfection of dominant-negative apoptosis signal-regulating kinase-1. *Oncol Rep.* 2007;17(4):781-6. 査読有
- ⑦ Okuyama M, Fujiwara Y, Tanigawa T, Watanabe K, Shiba M, Tominaga K, Watanabe T, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Roles of ZO-1 and epidermal growth factor in esophageal epithelial defense against acid. *Digestion.* 2007;75(2-3):135-41. 査読有
- ⑧ Sasaki E, Tominaga K, Kuwamura H, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Synergistic antitumor effect of combined 5-fluorouracil (5-FU) with 5-chloro-2,4-dihydropyridine on 5-FU-resistant gastric cancer cells: possible role of a dihydropyrimidine dehydrogenase-independent mechanism. *J Gastroenterol.* 2007;42(10):816-22. 査読有
- ⑨ Hayakawa T, Fujiwara Y, Hamaguchi M, Sugawa T, Okuyama M, Sasaki E, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Roles of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 in rat acid reflux oesophagitis. *Gut.* 2006 ;55(4):450-6. 査読有
- ⑩ Fujiwara Y, Higuchi K, Takashima T, Hamaguchi M, Hayakawa T, Tominaga K, Watanabe T, Oshitani N, Shimada Y, Arakawa T. Roles of epidermal growth factor and Na⁺/H⁺ exchanger-1 in esophageal epithelial defense against acid-induced injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*

2006 ;290(4):G665-73. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 藤原靖弘、須川貴史、谷川徹也、渡辺俊雄、富永和作、荒川哲男 GERDと喘息の相互関連についての基礎的検討. 第36回日本潰瘍学会 2008年9月5日、札幌
- ② Fujiwara Y. Sleep disturbance in Japanese GERD patients. アジア太平洋消化器病学会. 2007年10月18日、神戸
- ③ Sugawa T, Fujiwara Y, Okuyama M, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Watanabe T, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. A novel rat model to determine the pathogenic association between reflux esophagitis and bronchial asthma 米国消化器病学会 2007年5月19日、WA, USA
- ④ Fujiwara Y. Barrett's esophagus Cancer prevention with anti-inflammatory aspects. International Symposium on Cancer Prevention, 2007年2月23日、韓国
- ⑤ Fujiwara Y. Clinical characteristic and treatment of non-erosive reflux disease in Japan 日本消化管学会国際シンポジウム、2007年2月2日、東京
- ⑥ Hayakawa T, Fujiwara Y, Hamaguchi M, Sugawa T, Okuyama M, Sasaki E, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Role of aracidonic acid metabolism in rat acid reflux esophagitis. 米国消化器病学会 2006年5月21日、LA, CA, USA
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
藤原 靖弘 (FUJIWARA YASUHIRO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40285292
- (2) 研究分担者
渡辺 俊雄 (WATANABE TOSHIO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：50336773
富永 和作 (TOMINAGA KAZUNARI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80336768
- (3) 連携研究者
樋口 和秀 (HIGUCHI KAZUhide)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：20218697