

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07992

研究課題名(和文)肥満とGERDによる酸化ストレスの相互作用がバレット食道発生を促進する

研究課題名(英文)Oxidative stress collaboratively induced by obesity and acid reflux promotes development of Barrett's esophagus

研究代表者

浅沼 清孝 (Asanuma, Kiyotaka)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10431553

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)：本研究の目的は食道腺癌のリスクファクターであるバレット食道が、肥満とGERDが協調して酸化ストレスを増強し促進されることを示すことである。ラットを用いた検討では肥満関連ホルモンのレプチンがGERDによる粘膜傷害を惹起するT細胞の粘膜内浸潤とTNF- α などの炎症性サイトカイン分泌を増加させることで食道粘膜傷害を増悪させた。しかしレプチンは酸化ストレスを制御するNrf2-keap経路に直接的な影響を及ぼさなかった。さらにBMI増加は食道粘膜防御機能に影響を与えなかった。肥満による食道潰瘍の増悪がバレット食道発生を促進させ食道腺癌の関与するが、食道防御機能の低下には関与しない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、欧米では肥満率の急速な増加と共に食道腺癌(EAC)とその発生母地でありGERDが引き起こすバレット食道が増加している。本邦でも肥満が増加傾向であるが、EACは微増に留まっている。今後、本邦において急激な増加に転じる可能性が危惧されているが、GERD治療に用いられるPPIやH2阻害薬などの酸分泌抑制薬は普及したもののEAC抑制はなされていない。本研究は肥満の抑制が本邦におけるEAC増加を予防する上で重要であることに加え、肥満ホルモンによる炎症促進を抑制する治療薬の開発が必要であることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to demonstrate that Barrett's esophagus, a risk factor for esophageal adenocarcinoma, is enhanced and promoted by the synergistic effects of obesity and GERD (gastroesophageal reflux disease) through increased oxidative stress. In rat studies, leptin, an obesity-related hormone, exacerbated esophageal mucosal injury caused by GERD by inducing mucosal infiltration of T cells and increasing the secretion of inflammatory cytokines such as TNF- α . However, leptin did not directly affect the Nrf2-Keap pathway, which controls oxidative stress. Furthermore, an increase in BMI did not impact esophageal mucosal defense function. It is suggested that the exacerbation of esophageal ulcers due to obesity may promote the development of Barrett's esophagus and its involvement in esophageal adenocarcinoma, but it may not be associated with a decrease in esophageal defense function.

研究分野：消化器内科

キーワード：肥満 GERD 酸化ストレス バレット食道 食道腺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、欧米では肥満率の急速な増加と共に、食道腺癌(EAC)が増加している(*N Eng J Med.* 2017)。EACはGERDによって食道扁平上皮が円柱上皮化するパレット食道を発生母地とするが、肥満はこのGERDシーケンスの主要増悪因子である(Corley D., *gastroenterology* 2007)。本邦でも肥満は増加傾向にあり、特に男性において過去40年間でBMIが約8%増加し、現在20歳以上の肥満者(BMI 25)は約28%に達し、生活習慣病やガン罹患率の増加に繋がり問題となっている(厚生労働省 国民調査 2015)。本邦におけるEACは微増に留まっているが、今後、急激な増加に転じる可能性が危惧されている。肥満においてmast cellから分泌される肥満関連ホルモンleptinが上昇し炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-6分泌促進を介して炎症を惹起する(Iikuni, N., *Curr. Immunol. Rev.*2008)。GERDシーケンス促進において酸化ストレスが重要であるが、肥満ホルモンが下部食道の酸化ストレスに関与する機序など未だ解明すべき点が数多く残されている。Nrf2-Keap1経路は酸化ストレスに対する生体内防御機能の主要制御因子であり、この経路の破綻と多くの疾患関連性が報告されている(Ito K., *Free Radic Res.* 1999)。我々はパレット食道培養細胞を用いてNrf2-keap1経路の低下がEAC発生を促進することを報告した(Peng S., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014)。またNrf2活性低下がBMP4/SMADシグナルを介した食道扁平上皮の正常分化を阻害すると報告されており(Jiang M., *J Clin Invest.* 2015)。円柱上皮化に関与する細胞伝達シグナルが酸化ストレスと密接に関係しているが、Nrf2-Keap1経路活性がパレット食道/EACを予防できるか不明である。現在のGERD治療において、酸分泌抑制薬であるプロトンポンプインヒビター(PPI)が使用されて約25年が経過した。しかし本邦を含め世界中でEACは増加の一途を辿っているのは、酸分泌抑制だけではパレット食道発生を抑制できていないことが深く関与している。さらに未だパレット食道の発生機序を含む発癌機序の解明が未だ不十分である。酸化ストレスの観点から肥満によって促進されるパレット食道発生の機序を解明し、酸分泌抑制薬に変わる新たな治療戦略の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究は肥満による食道扁平上皮の円柱上皮化がNrf2-Keap1経路に関与するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

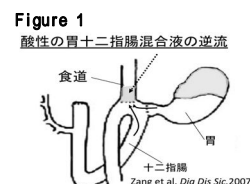
(1) 動物モデル(短期投与モデル)を用いた検討

10-12週齢Wistar ratの前胃結紮と十二指腸球部を直径2mmのカテーテルで狭小化した逆流性食道炎モデルを作成し、Alzet浸透圧ポンプを用いて0.6mg/Kg-weight/dayのleptinを1週間連続で皮下投与した。Vehicleとしてleptin希釈に用いた10mM phosphate buffer salineを同様の方法で投与した。食道潰瘍面積の測定ならびに粘膜傷害レベル(0; なし、1; 浮腫・過形成、2; びらん、3; 単発潰瘍、4; 癒合・出血性潰瘍)を評価し、食道潰瘍発症の際に誘導されるCD3+ T-lymphocyteを免疫染色とwestern blotにて測定した。そして、食道組織を用いてT Lymphocyte

から炎症性サイトカインを誘導する Macrophage inhibitory factor (MIF) と、肥満による炎症に密接に関連すると報告されている炎症性サイトカインの TNF- α 、IL-6、IL-1 β 発現を ELISA にて測定した。

(2) 動物モデル (長期投与) モデルを用いた検討

F344 rat の Nrf2 exon5 に 1 塩基付加した雌雄 Nrf2 rat (+1/WT) (東北大学医化学分野 山本雅之教授から供与) を交配して作成した雄 Nrf2 Knock-out rat (+1/+1) にバレット食道発生手術を施行する (Figure 1)。



(3) 培養細胞を用いた検討

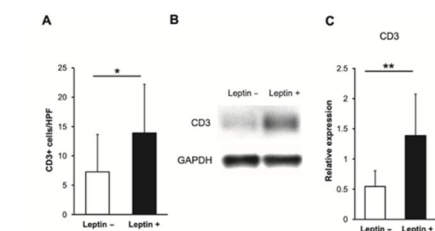
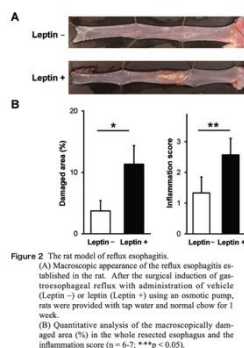
テロメラーゼ不活化ヒト食道扁平上皮細胞 (NES-B10T) を 1.0 nM leptin human recombinant で 24 時間刺激し Nqo-1 mRNA 発現を測定することで Nrf2-keap1 経路の活性化の有無を評価した。さらに円柱上皮化に重要な CDX-2、BMP-4 の発現も測定した。使用した primer は、NQO1 (F; 5'-AGCGTTCGGTATTACGATCC-3', R; 5'-AGTACAATCAGGGCTCTTCTCG-3'), BMP4 (F; 5'-TTGAGTATCCTGAGCGC-CCG-3', R; 5'-GTTTATACGGTGGAAAGCCCC-3'), CDX-2 (F; 5'-CTCGGCAGCCAAGT-GAAA AC-3', R; 5'-GATGGTGATGTAGCGACTGTAGTGA-3'), GAPDH (F; 5'-TCGACA-GTCAGCCGCATCT-3', R; 5'-AGTTAAAAGCAGCCCTGGTGA-3)。

(4) ヒト検体を用いた検討

バレット食道患者と非びらん性逆流性食道炎 (NERD) 患者の上部消化管内視鏡で採取した生検検体を用いて食道粘膜バリア機能を mini-Ussing chamber 装置にて測定する (東北大学病院倫理委員会 2014-1-734, 2017-2-129)。また凍結検体から mRNA を抽出し、炎症性サイトカイン (IL-8, IL-1 β) と TJP である occludin (OCLN) の発現を RT-PCR にて測定し、健常者、NERD 患者、バレット食道患者で得られた遺伝子発現の違いについて body mass index (BMI) と関連を検討した。使用した primer は、IL-8 (F; 5'-CTTGGCAGCCTTCCTGATTT-3', R; 5'-TTCTTTAGCACTCCTTGGCAAAA-3'), IL-1 β (5'-TCGCCAGTGAAAGATGGCT-3', R; 5'-GGTCGGAGATTCGTAGCTGG-3'), OCLN (R; 5'-AACTCGAAG AAAGATGGACAGGT-3', R; 5'-CCACATAGTCAGATGG-GGGTG-3')。

4. 研究成果

(1) leptin 投与によって粘膜傷害の面積と傷害レベルの増加を認め逆流性食道炎は悪化した



(Figure 2)。さらに組織学的に粘膜内に CD3+ T lymphocyte の浸潤増加を認めた (Figure 3)。Leptin 投与によって組織中の MIF、TNF- α 、IL-6、IL-1 β に増加を認めた (Figure 4, 5)。

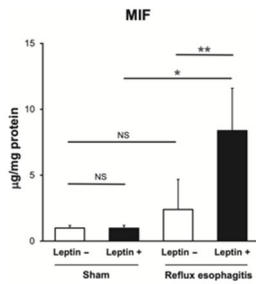


Fig. 4. Esophageal tissue concentrations of MIF in rats with reflux esophagitis. The esophageal tissue protein samples were collected from the surgically induced rat reflux esophagitis model and sham rats with 1-week treatment of leptin or vehicle (n = 6; **p < 0.05, Tukey-Kramer test). NS, not significant.

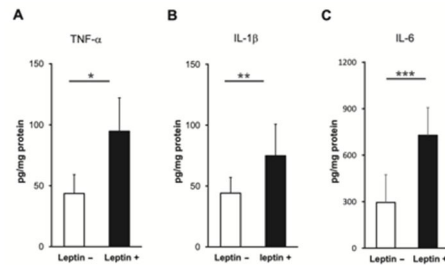


Fig. 5. Pro-inflammatory cytokine levels in the esophageal tissues of reflux esophagitis. The esophageal tissue protein samples were collected from the model with 1-week treatment of leptin or vehicle. The tissue expression levels of TNF-α (A), IL-1β (B), IL-6 (C) were measured using ELISA (n = 5-6; ****p < 0.05).

(2) 雄性 F344 rat (WT/WT) ; wild rat 10 匹と雄性 Nrf2 Knock-out rat (+1/+1) ; KO rat 10 匹に慢性逆流性食道炎モデルを作成した。4 週間一般飼料 (CE-2; 日本クレア) で飼育したところ、wild rat 3 匹、KO rat 2 匹が生存した。食道胃接合部直下の扁平上皮に近接して円柱上皮化生を認めたが (Figure 6) 各群 1 匹のみであった。さらに wild rat 10 匹、KO rat 10 匹を 8 週間 (CE-2) で飼育したが生存できなかった。

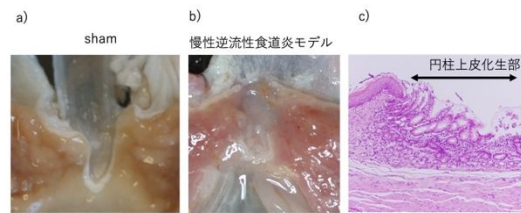
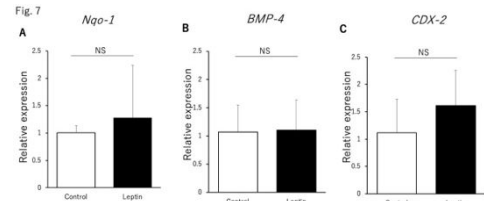


Figure 6. macroscopic finding; a) sham術の食道胃接合部の扁平上皮、b)円柱上皮に置換されている。c) b)のmicroscopic finding、円柱上皮を認めた。

(3) テロメラゼ不活化ヒト食道扁平上皮細胞 (NES-B10T、NES-B3T) を 1.0 nM leptin human recombinant の発現に差を認めなかった。さらに、BMP-4 と CDX-2 発現も変化を認めなかった (Figure 7)。



Figures show representative experiments for qRT-PCR of (A) Nqo-1, (B) BMP-4, and (C) CDX2 mRNA expression in NES-B10T cells following 1 days of treatment with 1 nM leptin. mRNAs were collected on the following day. Bar graphs represent the mean ± SEM. NS, not significant.

(4) NERD 患者 15 人と無症状健常者 11 人で検討した。NERD 患者の食道逆流は 85% が弱酸であった為、pH4.0 HCl に対する粘膜防御能を測定したと

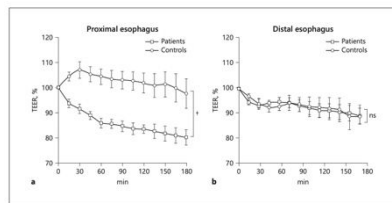


Fig. 8 TEER in the proximal esophagus. Biopsy samples obtained from esophageal mucosa were exposed to pH 4 normal saline for 180 min. The mucosal integrity was evaluated by TEER using a mini-Using chamber. Changes in the TEER are expressed as percentages relative to the initial values. Each plotted data point represents the mean ± SEM. a) Proximal esophageal TEER (17 cm above the squamocolic junction). b) Distal esophageal TEER (5 cm above the squamocolic junction). Open circle, healthy controls (n = 11); open square, PPI-refractory patients with nonerosive reflux disease (n = 15); *p < 0.05, significant difference at each time point using Student's t test; †p < 0.05, significant difference evaluated using generalized linear mixed-effect model. TEER, transepithelial electrical resistance; ns, not significant.

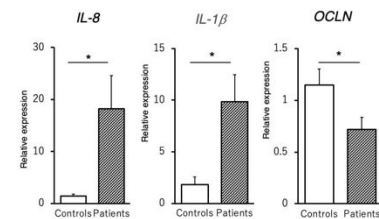


Fig. 9 Gene expression profiles of proximal esophageal mucosa. qPCR analysis of proximal esophageal tissue mRNA levels. Values represent gene expression relative to healthy controls. PPI-refractory patients with nonerosive reflux disease, n=14; controls, n=10. OCLN, occludin; *p < 0.05, Student t-test.

Table 1. Association of TEER and clinicopathological features

	Control	N	Patient	N	p value, control versus patient
Gender					
Male	109.1±4.7	ns ^a	5	87.7±2.0	ns ^a
Female	100.4±3.5		6	84.6±2.9	9 < 0.05 ^a
Age					
<50	106.8±3.9	ns ^a	8	82.1±1.9	ns ^b
51-70	98.0±0.4		3	86.9±2.2	7 < 0.05 ^a
>71	n/a		0	86.7±4.9	5 n/a
BMI					
<22	104.6±2.6	ns ^a	6	83.8±2.1	ns ^b
≥22	104.2±6.2		5	87.7±3.3	8 < 0.05 ^a
FSSG score					
<14	104.4±3.0	n/a	11	88.5±1.9	ns ^b
≥14	n/a		0	82.9±3.2	8 n/a
Gastric mucosal atrophy					
None-mild	105.9±3.5	n/a	9	84.7±2.8	ns ^b
Moderate	98.0		1	82.8±1.6	6 n/a
Severe	97.3		1	93.0±3.6	5 n/a

Values are %change of TEER at the time of 60 min and expressed as mean ± standard error of the means (SEM). The gastric mucosal atrophy was evaluated by the classification of Kimura and Takemoto; none-mild (none, C-1, and C-2), moderate (C-3, O-1), or severe (O-2, O-3). FSSG, frequency scale for symptoms of gastroesophageal reflux disease; ns, not significant; n/a, not available. ^a Student's t test. ^b Tukey-Kramer test.

ころ、NERD 患者の近位食道粘膜の防御能低下を認めた (Figure 8) また NERD 患者の近位食道で炎症性サイトカイン (IL-8、IL-1b) の増加と TJP である occludin の低下を認めた (Figure 9) しかし BMI と粘膜防御能に関係を認めなかった (table 1)。

考察

ラット逆流性食道炎を用いた検討で、肥満関連ホルモンのレプチンは GERD による粘膜傷害を惹起する CD 3+ T lymphocyte の粘膜内浸潤と MIF 分泌の促進を介して炎症性サイトカイン分泌を増加させることで食道粘膜傷害を増悪させたと考えられた。肥満者では重症逆流性食道炎が多いが、その機序として肥満患者で血中濃度が上昇するレプチンの関与を示した研究結果であった。そこでラット慢性逆流性食道炎モデルの作成し、扁平上皮の円柱上皮化率の検討を試みたが生存率が低くまた、低活性 Nrf2-keap1 状態ではコントロールと比較し円柱上皮化に差を認めなかった。Nrf2-keap1 により炎症が抑制されたことが原因と考えられた。培養細胞を用いた実験でも leptin 単独では Nrf2-keap1 系に影響を与えなかった。ラットを用いた研究では leptin が CD3+ lymphocyte を活性化した可能性が示唆されることから、leptin 単独では食道扁平上皮に影響を与えないと考えられた。

NERD 患者を用いた検討では近位食道へ達する弱酸逆流が同部位の炎症と TJP 発現低下を介した粘膜防御能を低下させ逆流症状の出現に関与すると考えられた。しかし BMI との間に関連を認めなかったが、今回の検討において 25 BMI の肥満患者がエントリーできなかったことも要因と考えた。バレット食道患者を含めエントリーを継続し、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujiya Taku, Asanuma Kiyotaka, Koike Tomoyuki, Okata Tomoki, Saito Masahiro, Asano Naoki, Imatani Akira, Masamune Atsushi	4. 巻 322
2. 論文標題 Nitric oxide could promote development of Barrett's esophagus by S-nitrosylation-induced inhibition of Rho-ROCK signaling in esophageal fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G107 ~ G116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00124.2021	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 Murata Tsugihiko, Asanuma Kiyotaka, Ara Nobuyuki, Iijima Katsunori, Hatta Waku, Hamada Shin, Asano Naoki, Koike Tomoyuki, Imatani Akira, Masamune Atsushi, Shimosegawa Tooru	4. 巻 245
2. 論文標題 Leptin Aggravates Reflux Esophagitis by Increasing Tissue Levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 45 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.245.45	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 Norita Kazuaki, Asanuma Kiyotaka, Koike Tomoyuki, Okata Tomoki, Fujiya Taku, Abe Yasuaki, Nakagawa Kenichiro, Hatta Waku, Uno Kaname, Nakamura Tomohiro, Nakaya Naoki, Asano Naoki, Imatani Akira, Shimosegawa Tooru, Masamune Atsushi	4. 巻 102
2. 論文標題 Impaired Mucosal Integrity in Proximal Esophagus Is Involved in Development of Proton Pump Inhibitor-Refractory Nonerosive Reflux Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 404 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508661	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 Okata Tomoki, Asanuma Kiyotaka, Nakagawa Kenichiro, Hatta Waku, Koike Tomoyuki, Imatani Akira, Masamune Atsushi	4. 巻 23
2. 論文標題 The Impact of Duodenal Mucosal Vulnerability in the Development of Epigastric Pain Syndrome in Functional Dyspepsia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13947 ~ 13947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232213947	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazuaki Norita, Kiyotaka Asanuma, Tomoyuki Koike, Tomoki Okata, Yasuaki Abe, Hiroki Kikuchi, Waku Hatta, Kaname Uno, Naoki Asano, Akira Imatani, Atsushi Masamune and Tooru Shimosegawa
2. 発表標題 The impact of esophageal mucosal barrier function on the PPI refractory nonerosive reflux disease
3. 学会等名 AGA2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuaki Norita, Kiyotaka Asanuma, Tomoyuki Koike, Atsushi Masamune
2. 発表標題 Impaired mucosal integrity in the proximal esophagus is associated with reflux symptoms in patients with proton pump inhibitor-refractory nonerosive reflux disease
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taku Fujiya, Kiyotaka Asanuma, Tomoyuki Koike, Atsushi Masamune
2. 発表標題 Severe wound contraction promotes Barrett 's esophagus via up-regulated Rho-ROCK signaling
3. 学会等名 AGA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤谷 拓、浅沼 清孝、小池 智幸、正宗 淳
2. 発表標題 食道潰瘍の創傷治癒異常はRho-ROCKシグナルを介してバレット食道発生を促進させる
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019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
研究協力者	乗田 一明 (Norita Kazuaki)	東北大学・大学院医学系研究科消化器病態学分野 (11301)	
研究協力者	藤谷 拓 (Fujiya Taku)	東北大学・大学院医学系研究科消化器病態学分野 (11301)	
研究協力者	大方 智樹 (Okata Tomoki)	東北大学・大学院医学系研究科消化器病態学分野 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------