

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011 年

課題番号：21590787

研究課題名（和文） 胃食道逆流症の発症およびバレット食道癌への進展におけるアディポネクチンの役割

研究課題名（英文） A role of adiponectin in the pathogenesis of GERD and the development of adenocarcinoma from Barrett's esophagus

研究代表者

渡部健二（Kenji WATABE）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50379244

研究成果の概要（和文）：

最近肥満は食道・胃の粘膜傷害に関与することがわかり、特に食道ではそれに引き続くがん化にも関与すると報告されている。本研究の目的は、脂肪組織から分泌される生理活性分子アディポネクチン（APN）がこれらの過程に及ぼす影響を明らかにすることである。1) 臨床研究：人間ドック受験者を対象に、食道炎・胃炎の有無と血中アディポネクチン濃度の相関を調べ、血中 APN 濃度の低下は食道炎・胃炎のリスク因子であることを示した。2) 動物実験：APN 遺伝子欠損マウス（APN-KO）を用いて食道炎・胃炎のモデル作成を試みた。食道炎は技術的に難しく断念したが、胃炎はエタノール（EtOH）胃炎モデルで検討した。EtOH 処理された APN-KO の胃は対照マウス（WT）と比べて胃炎が悪化し、プロスタグランジン（PG）E₂ の発現誘導が WT と比べて不完全であることを示した。3) 細胞実験：APN は EtOH 処理されたラット胃上皮細胞 RGM1 の PGE₂ 発現量を亢進させた。傷つけアッセイにおいて APN は PGE₂ 発現を高めて RGM1 の創傷治癒を増強し、COX-2 阻害剤セレコキシブはこれを阻害した。以上より、APN は EtOH 胃炎において保護的作用を示し、その機序として胃上皮の PGE₂ 発現増強による創傷治癒の亢進が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It has been recently demonstrated that obesity is related to the esophagitis and gastritis. Obesity is also reported to associate with adenocarcinoma arised from Barrett epithelium of the esophagus. In this study, we intended to clarify whether adiponectin (APN) secreted from adipose tissue is involved in these steps. 1) Clinical study. We analyzed medical records of participants of a routine health check-up examination. Lower serum level of APN is associated with an increased risk for erosive esophagitis as well as erosive gastritis. 2) Animal experimental study using APN knockout mice (APN-KO). We first failed to demonstrate the surgical model of reflux esophagitis due to technical reasons. We then examined the gastric injury induced by oral administration of ethanol (EtOH), and showed that severe gastric injury was induced in APN-KO accompanied by the impaired induction of PGE₂ in the injured stomach. 3) Cell culture study using rat gastric mucosal cells (RGM1). APN induced the expression level of PGE₂ in RGM1 cell treated with EtOH. RGM1 cells exhibited efficient wound repair accompanied by increased PGE₂ expression in the presence of adiponectin that is inhibited by coadministration with celecoxib, a COX-2 inhibitor. Collectively, APN showed protective effect in gastric injury induced by EtOH which may be partially mediated by the efficient wound repair of epithelial cells through increased PGE₂ expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：胃炎、食道炎、食道癌、肥満、アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

食道および胃の粘膜障害を発生させる原因として最近肥満が注目され、食道においてはバレット上皮からの発がんにも関与することが報告されている。近年内臓脂肪はレプチン、アディポネクチン、TNF α など種々の生理活性物質を産生していることが示され、肥満の本態として注目されている。我々は消化器疾患の中で肥満が病態に関わるものを対象として、アディポネクチンの抗炎症作用や発がん作用を明らかにしてきた。内臓脂肪蓄積による低アディポネクチン血症は、胃や食道粘膜の防御機構を低下させて胃や食道の粘膜傷害を悪化させ、その蓄積により発がんのリスクを増大させることが想像される。

2. 研究の目的

低アディポネクチン血症が食道炎、胃炎、食道がん発症のリスクとなるか検討する。

3. 研究の方法

1) ヒトを対象とした臨床研究

人間ドック受診者を対象としたレトロスペクティブな横断的観察研究。同受診者は上部内視鏡検査を受けており、アディポネクチン血中濃度、各種生活習慣病関連マーカーが測定されている。低アディポネクチン血症が逆流性食道炎およびびらん性胃炎のリスク因子であるか検討した。

2) マウスを用いた *in vivo* 研究

アディポネクチン欠損マウス (APN-KO) を用いて、食道炎および胃炎を惹起させ、それぞれの粘膜傷害の程度を評価した。

3) 培養細胞を用いた *in vitro* 研究

2) の結果に基づき、培養細胞を用いてアディポネクチンが食道炎および胃炎に関わる機構を分子レベルで検討した。

4. 研究成果

1-1) 食道炎、臨床研究

2405 名を対象に解析を行ない、逆流性食道炎は 235 名であった。背景を調べると、逆流性食道炎は男性の比率が高値、BMI が高値、アディポネクチンが低値、食道裂孔ヘルニア合併率が高値であった。(図 1)

アディポネクチンの血中濃度に関する 4 分位を作成し、それぞれの逆流性食道炎発生率を調べると、濃度が低くなるにつれて段階的な増加を認めた。(図 2)

図1 食道炎患者の背景

	Erosive esophagitis		p value
	Present (n=235)	Absent (n=2170)	
Age (mean \pm SD)	55.3 \pm 0.729	55.1 \pm 0.240	0.803
Gender (Male, %)	194 (82.6%)	1343 (61.9%)	<0.0001*
BMI (mean \pm SD)	24.3 \pm 0.199	22.5 \pm 0.0655	<0.0001*
BMI (\geq 25, %)	87 (37.0%)	411 (18.9%)	<0.0001*
APN (mean \pm SD)	8.17 \pm 0.365	10.1 \pm 0.120	<0.0001*
Hiatal hernia	85 (36.2%)	179 (8.25)	<0.0001*
Smoking	36 (15.3%)	384 (17.7%)	0.355
Drinking	51 (21.7%)	454 (20.9%)	0.781

図2 アディポネクチン血中濃度と食道炎発生率

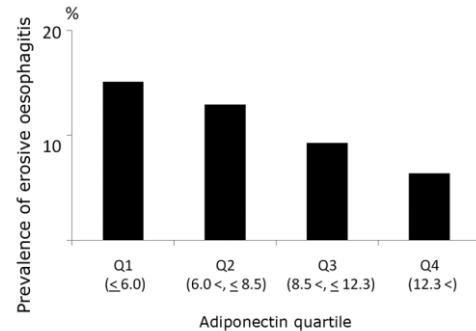
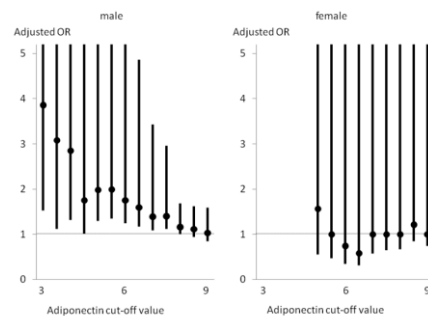


図 1 で逆流性食道炎との関係を認めた各因子 (BMI、ウエスト、ヘルニア) で調整してもなおアディポネクチンが逆流性食道炎発生に影響を与えるか男女に分けたブートストラップ法で調べた。最初にヘルニアと BMI で調整すると、男性ではアディポネクチン血中濃度 7 μ g/ml 以下では持続して調整後 odds ratio の下限が 1 以上であった。(図 3) 一方、女性ではいずれの濃度でも下限が 1 以下であった。

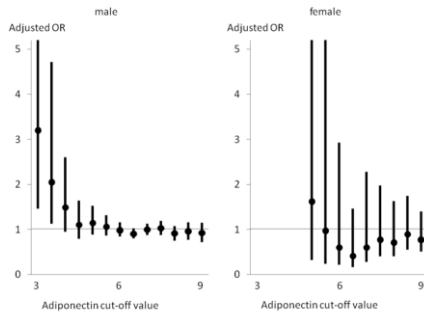
図3 各cut off値における食道炎発症リスク (BMI調整)



次にヘルニアとウエストで調整すると、男

性では血中濃度 3.5 μ g/ml 以下で調整後 odds ratio の下限が 1 以上であった。(図 4) 一方、女性ではいずれの濃度でも下限が 1 以下であった。

図 4 各 cut off 値における食道炎発症リスク (ウエスト周囲径調整)



以上より、低アディポネクチン血症は男性において逆流性食道炎のリスク因子であることが示唆された。

1-2) 胃炎、臨床研究

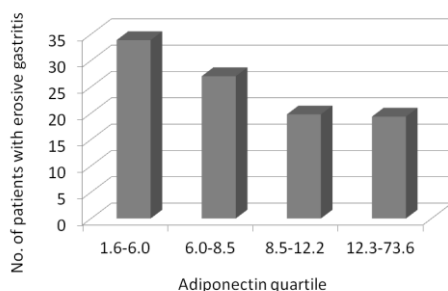
2400 名を対象として解析を行ない、びらん性胃炎は 248 名であった。背景を調べると、びらん性胃炎は BMI が高値、血中アディポネクチン濃度が低値、ウエストが高値、血圧が高値、中性脂肪が高値、インスリン抵抗性が高値であった。(図 5)

図 5 びらん性胃炎患者の背景

	びらん性胃炎		p-value
	あり (n = 248)	なし (n = 2152)	
Sex, Male/total	182 / 248	1350 / 2152	0.001
Age, Y	55.4 \pm 10.2	55.1 \pm 11.3	NS
BMI, kg/m ²	23.5 \pm 3.1	22.6 \pm 3.1	<0.0001
Adiponectin, μ g/ml	8.7 \pm 4.7	10.1 \pm 5.7	0.0002
Alcohol drinker	45 / 248	460 / 2152	NS
WC, cm	84.7 \pm 8.9	82.7 \pm 9.0	0.0007
SBP, mmHg	128.2 \pm 15.4	124.6 \pm 15.5	0.0005
DBP, mmHg	80.4 \pm 10.0	77.5 \pm 10.4	<0.0001
HDL-C, mg/dL	62.9 \pm 15.1	64.3 \pm 16.3	NS
LDL-C, mg/dL	128.1 \pm 29.4	125.3 \pm 30.7	NS
TG, mg/dL	135.4 \pm 93.7	120.2 \pm 94.6	0.0170
FPG, mg/dL	98.0 \pm 19.0	95.9 \pm 17.1	NS
IRI, μ U/ml	6.3 \pm 3.6	5.7 \pm 3.7	0.0204

アディポネクチンの血中濃度に関する 4 分位を作成し、それぞれのびらん性胃炎患者数を調べると、濃度が低くなるにつれて段階的な増加を認めた。(図 6)

図 6 アディポネクチン血中濃度とびらん性胃炎発症率



びらん性胃炎と関連する背景因子を単変量ロジスティック解析で検討した。BMI、血中アディポネクチン濃度、喫煙歴、拡張期血圧 (DBP)、中性脂肪などが相関関係を示した。(図 7)

図 7 単変量解析

variable	odds ratio	95% CI	p value
sex; male	1.64	1.23-2.21	0.001
age	1	0.99-1.01	0.69
BMI	1.09	1.05-1.13	<0.0001
Adiponectin	0.95	0.92-0.97	<0.0001
non vs current & past smoker	1.47	1.13-1.92	0.0041
past & non vs current	2.33	1.52-3.76	<0.0001
Alcohol habit	0.82	0.58-1.14	0.2445
DBP	1.03	1.01-1.04	<0.0001
HDL-C	0.99	0.99-1.00	0.13
LDL-C	1	1-1.01	0.18
TG	1	1.00-1.00	0.02
FPG	1.01	1-1.01	0.07
IRI	1.04	1-1.07	0.02
Reflux esophagitis	1.67	1.12-2.42	0.01
Duodenitis	2.36	1.32-4.01	0.002

次に、ステップワイズ法による多変量ロジスティック解析で検討した結果、血中アディポネクチン濃度、喫煙、拡張期血圧などがびらん性胃炎の独立したリスク因子であることが示された。(図 8)

図 8 多変量解析
びらん性胃炎ありに対するオッズ比

Variable	Odds ratio	95% CI	P value
Adiponectin	0.96	0.93-0.99	0.0125
Smoking*	0.50	0.30-0.80	0.0056
DBP	1.02	1.01-1.03	0.0051
Duodenitis	1.80	1.00-3.09	0.0407

* Smoker vs past & non smoker

臨床研究のまとめ：低アディポネクチン血症は逆流性食道炎・びらん性胃炎いずれにおいても発症のリスクとなる可能性が示された。本臨床研究はピロリ菌の感染状況や NSAIDs や PPI など粘膜傷害関連薬剤の服薬状況が不明であるため、研究精度に限界があることに留意する必要がある。

次に我々はアディポネクチン遺伝子ノックアウトマウスを用いてこの臨床研究結果の妥当性およびアディポネクチンが疾患に関与する仕組みを検討した。

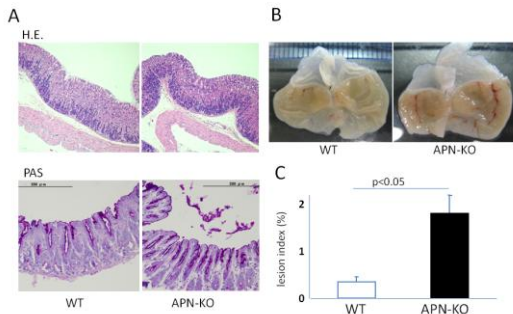
2-1) 食道炎、動物実験

逆流性食道炎のモデル疾患動物は、手術操作で作成するのが一般的である。しかし、我々の検討では、腸管を吻合する術式はすべて手術関連死となり、幽門を機械的に狭窄する術式は手術関連死を回避しても逆流の程度が安定しなかった。既報の動物はほぼすべてラットであり、マウスは技術的に困難であると判断し、この実験を断念した。

2-2) 胃炎、動物実験

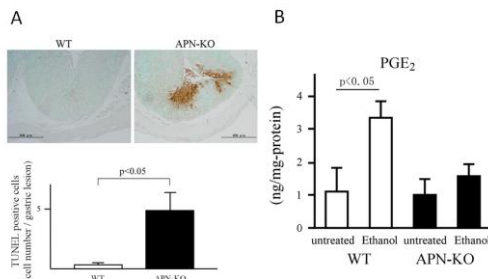
マウスの胃炎モデルはエタノール経口投与による方法が一般的であり、我々もこのモデルで安定した実験を行なうことが出来た。アディポネクチン遺伝子ノックアウトマウス (APN-KO) の胃粘膜は対照と変わらず (図 9A)、エタノール投与で惹起される胃粘膜傷害は APN-KO において増強されていた (図 9B)。

図9 アディポネクチンノックアウトマウスのエタノール胃炎



傷害された胃粘膜におけるアポトーシス細胞を TUNEL 法で検出すると、APN-KO において多く観察された。(図 10A) 次に胃粘膜における PGE₂ 産生量を ELISA 法で測定すると、対照である正常マウスは傷害後に PGE₂ が増加するのにに対し、APN-KO ではその増加を認めなかった。(図 10B)

図10 エタノールで傷害された胃粘膜におけるアポトーシスとPGE₂産生量



以上の結果より、APN-KO ではエタノールによる胃粘膜傷害を強く認め、その原因として粘膜保護作用を示す PGE₂ が適切に誘導されないことが原因として関与する可能性が示唆された。

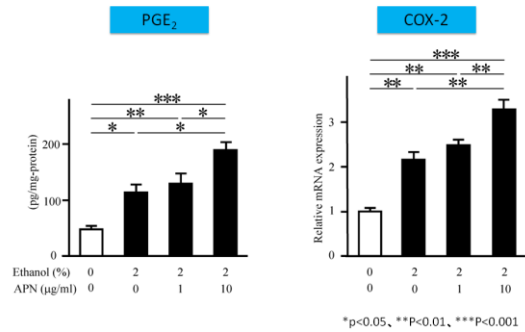
そこで、胃上皮細胞における PGE₂ の役割を培養細胞で詳しく検討した。

3) 胃上皮培養細胞を用いた in vitro 研究

ラット胃上皮由来の RGM1 細胞を用いて検討を行なった。まず細胞をエタノールで処理すると PGE₂ の発現量が増加し、事前にアディポネクチンでこの細胞を処理するとの増加が増強された。(図 11 左) 次に、COX-2 発現量を調べると、PGE₂ と類似し

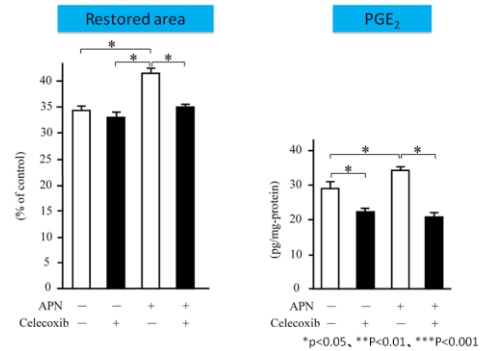
た結果が得られた。(図 11 右)

図11 胃上皮細胞におけるPGE₂、COX-2発現



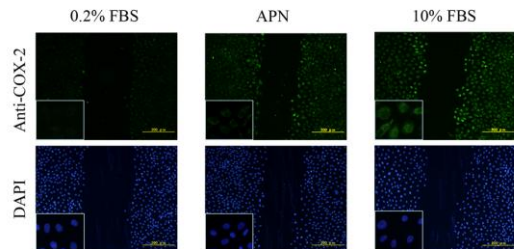
エタノールで傷害されたマウス胃粘膜の修復機序の一部に胃上皮細胞の遊走が関与することが知られている。RGM1 を用いた傷つけアッセイで検討したところ、アディポネクチンは細胞遊走能を亢進させ (図 12 左)、培養液中の PGE₂ 濃度を増加させた (図 12 右)。COX-2 阻害薬 celecoxib で細胞を前処理すると、この効果はキャンセルされた。

図12 傷つけアッセイにおける胃上皮細胞の遊走とPGE₂産生



傷つけアッセイにおける胃上皮細胞の COX-2 産生を免疫染色で検討すると、アディポネクチン添加で COX-2 が遊走細胞に誘導されることを確認した。(図 13)

図13 傷つけアッセイにおける胃上皮細胞のCOX-2産生



以上より、アディポネクチンは胃上皮細胞における COX-2-PGE₂ 系を賦活化することで傷創傷治癒を亢進させる可能性が示された。APN-KO がエタノール胃粘膜傷害に脆弱であった理由として、胃上皮細胞にお

る COX-2-PGE₂ 系が十分に賦活化されず、組織修復に必要な細胞遊走が十分に誘導されなかった可能性が示唆される。

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 4 件、いずれも査読あり)

(1) Yamamoto S, Watabe K, Araki H, Kamada Y, Kato M, Kizu T, Kiso S, Tsutsui S, Tsujii M, Kihara S et al. Protective role of adiponectin against ethanol-induced gastric injury in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012 Apr;302(8):G773-780.

(2) Yamamoto S, Watabe K, Takehara T. Is obesity a new risk factor for gastritis? Digestion. 2012;85(2):108-110.

(3) Kato M, Watabe K, Hamasaki T, Umeda M, Furubayashi A, Kinoshita K, Kishida O, Fujimoto T, Yamada A, Tsukamoto Y, Yamamoto S, Kamada Y, Yoshida Y, Kiso S, Tsutsui S, Kihara S et al. Association of low serum adiponectin levels with erosive esophagitis in men: an analysis of 2405 subjects undergoing physical check-ups. J Gastroenterol. 2011;46:1361-1367.

(4) Yamamoto S, Watabe K, Tsutsui S, Kiso S, Hamasaki T, Kato M, Kamada Y, Yoshida Y, Kihara S et al. Lower Serum Level of Adiponectin Is Associated with Increased Risk of Endoscopic Erosive Gastritis. Dig Dis Sci. 2011;56:2354-2360.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 山本俊祐、渡部健二など. 胃粘膜傷害におけるアディポネクチンの防御的役割. Japan Digestive Disease Week 2011. 2011 年 10 月 20 日. 福岡.

(2) 山本俊祐、渡部健二など. 低アディポネクチン血症はびらん性胃炎のリスクファクターである. 第 97 回日本消化器病学会総会. 2011 年 5 月 15 日. 東京.

(3) Yamamoto S, Watabe K et al. Hypoadiponectinemia increases the presence of endoscopic erosive gastritis: An epidemiologic study of 2400 Japanese subjects. Digestive Disease Week (American Gastroenterological Association). May 9, 2011. Chicago, USA.

(4) Yamamoto S, Watabe K et al. Protective role of adiponectin against ethanol induced gastric injury in mice. Digestive Disease Week (American Gastroenterological Association). May 8, 2011. Chicago, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 健二 (WATABE KENJI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50379244

(2) 研究分担者

筒井 秀作 (TSUTSUI SHUSAKU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10359846
平成 23 年 6 月 30 日まで分担者として参画

木曾 真一 (KISO SHINNICHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40335352

吉田 雄一 (YOSHIDA YUICHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30457014

辻井正彦 (TSUJII MASAHIKO)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40303937
平成 23 年 7 月 1 日から分担者として参画

(3) 連携研究者

木原 進士 (KIHARA SHINJI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20332736

濱崎 俊光 (HAMASAKI TOSHIMITSU)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40379243
平成 22 年度より連携研究者として参画