

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501262

研究課題名(和文)炎症関連大腸発がんにおけるレプチンシグナル系の関与

研究課題名(英文)Role of leptin signal in inflammation-related colorectal carcinogenesis

研究代表者

甲野 裕之(KOHNO, Hiroyuki)

金沢医科大学・看護学部・教授

研究者番号：20221236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は炎症関連大腸発がんへのレプチンシグナルの関与を解析し、レプチンシグナル系修飾による大腸発がんの予防や治療の可能性を探ることを目的とした。

ob/obマウス(レプチン欠損マウス)へのレプチン投与により大腸がんの発生が抑制され、この作用には血清総コレステロール、LDLコレステロールの低下、大腸粘膜の炎症メディエーター産生低下が関与していることを明らかにし、レプチンの炎症性大腸がん発生予防の可能性を示唆した。

またC57BLKS/J遺伝背景マウス(ob/ob、db/dbマウス系統)は炎症関連大腸がん低感受性であることを示し、肥満マウスを用いた動物大腸がん実験における有用な情報を提供した。

研究成果の概要(英文)：Leptin is elevated in obesity and may be involved in carcinogenesis including colorectal cancers. The objective of this study was to investigate the role of leptin signal on colitis-related colon carcinogenesis.

In current study, we indicated that Leptin was effective in inhibiting colitis-related colon carcinogenesis through suppression of mucosal inflammation and hyperlipidemia in the ob/ob mice (leptin-deficient obese genetic background). Our results suggest that the leptin might be useful for prevention of inflammation-related colon cancers.

Furthermore, we showed that C57BL/KsJ mice strains are less sensitive to inflammation-related colon carcinogenesis compared with C57BL/6J mice and these differences may be due to the difference in their levels of mucosal inflammation of the colon. These results provided the useful information in the inflammation-related mouse colon carcinogenesis model.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：炎症とがん レプチン 発がん 大腸がん 高脂血症

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関する国内・国外の研究動向および位置づけ

近年、内臓脂肪蓄積を基盤とした肥満と大腸発がんとの関連が注目され、肥満と発がんを繋ぐ分子機構が徐々に解明されつつある。大腸発がんに関与する要因として、脂肪細胞から分泌される一群のアディポサイトカインの分泌異常、特に肥満による高レプチン血症と大腸がんのリスクとの関係や低アディポネクチンと大腸がんリスクとの関係などアディポサイトカインの分泌異常と大腸発がんとの関連性が注目されている。一方、肥満関連の動物発がん実験においても、レプチン受容体異常により肥満となる C57BLKS-*db/db* (*db/db*) マウスでは大腸発がん誘発物質である azoxymethane (AOM) の投与により大腸がん前駆病変が増大すること、また polygenic な肥満マウスの KK-*Ay* マウスでは AOM 投与により大腸がん前駆病変および腫瘍が増大し、血中レプチン値も有意に増加することが報告され、動物モデルにおいてもレプチンシグナル系の異常と大腸発がんとの関連性が示唆されている。レプチンは種々の免疫担当細胞に作用し、自然免疫/獲得免疫のいずれの面からも炎症反応に関与し、慢性炎症性疾患の成立・維持に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、レプチン欠損の C57BLKS-*ob/ob* (*ob/ob*) マウスでは免疫組織重量や免疫機能が低下していることが知られており、これらの低下はレプチンの投与により回復することが示されている。しかし、肥満における過剰な血中レプチン分泌、末梢のレプチンレセプターの発現や感受性の変化による免疫系を介した発がんとの関連に言及した研究は極めて少ない。

(2) 研究代表者のこれまでの研究成果を踏まえて着想に至った経緯

申請者はこれまでに炎症関連マウス大腸発がんモデルを用いたメカニズムの解析を行い、

db/db マウスでは AOM による大腸がん前駆病変が増加とともに血中レプチン値が上昇し、化学予防物質の投与によりいずれも低下する、炎症関連大腸発がんマウスの大腸粘膜ではアディポサイトカインの1種である Tumor Necrosis Factor (TNF) α が有意に上昇しているなどを報告した。さらに、*db/db* (レプチン受容体異常マウス) マウスおよび *ob/ob* マウス (レプチン欠損マウス) を用いた炎症関連大腸発がん実験を行ったところ、polygenic な肥満マウスである KK-*Ay* マウスとは異なり、大腸がん前駆病変が増大するものの腫瘍は有意に減少することを見出した。以上を基に申請者は、レプチンシグナル系異常マウスでは、がん誘発物質による大腸がん前駆病変は増加しているものの、レプチンシグナルの異常による免疫担当細胞の機能低

下により腫瘍の発生をプロモートする炎症反応が减弱し、その結果前駆病変から腫瘍形成の過程が阻害され大腸がんの発生が低下していると推論し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究ではアディポサイトカインの一つで肥満のみならず炎症や免疫にも関わることが知られているレプチンに注目し、レプチンシグナル系異常肥満マウスならびにレプチンシグナル系に異常がなく高レプチン血症をきたしている肥満マウスを用いて、レプチンシグナル系による炎症関連大腸発がんへの関与について検討を行い、レプチンシグナル系の修飾による大腸発がんの予防や治療の可能性を探ることを目的としている。そのために、レプチンシグナル系異常の修復により、低下した炎症関連大腸発がんが回復あるいは促進される可能性を明らかにすること、レプチンシグナル系に異常がなく高レプチン血症を生じる条件においてレプチンアンタゴニストによる炎症関連大腸発がんの修飾の可能性を明らかにすることを目的とした。

さらに、C57BLKS/Jを遺伝背景にもつレプチンシグナル系異常肥満マウス (*db/db* マウスおよび *ob/ob* マウス) では大腸がん前駆病変が増大するものの腫瘍は有意に減少することから、C57BLKS/Jを遺伝背景にもつマウスと C57BL/6J マウスにおける炎症関連大腸発がん感受性についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) *ob/ob* マウスを用いた炎症関連大腸がんの誘発とレプチンによる修飾作用

ob/ob マウス (5 週齢) および野生型マウス (C57BL/6J マウス) (5 週齢) に azoxymethane (AOM) 100mg/kg を投与し、投与 1 週後から 2% dextran sodium sulfate (DSS) を 1 週間飲水投与した。レプチン投与群は、レプチン 1mg/kg を DSS 飲水投与終了後から実験終了時までの期間、腹腔内投与した。DSS 投与後 3 週目に一部のマウスを屠殺し大腸粘膜を回収し、炎症関連因子の mRNA 発現解析を行った。また DSS 投与後 14 週目に各マウスを屠殺し、採血後、大腸を摘出し、大腸腫瘍の病理学的解析・免疫組織学的解析および血清成分の解析を行った。

(2) *db/db* マウスを用いた炎症関連大腸がんの誘発と免疫担当細胞移入による発がんの修飾

db/db マウス (5 週齢) に AOM 100mg/kg を投与し、投与 1 週後から 2% DSS を 1 週間飲水投与した。DSS 投与開始時、DSS 投与終了時、DSS 投与後 3 週目、DSS 投与後 8 週目の時期に C57BL/6J マウス (5 週齢) 野生型マウスの脾臓より採取した免疫担当細胞を細胞移入し (3×10^5 cells/mice)、DSS 投与後 14 週目に各マウスを屠殺後、大腸を摘

出し病理学的解析を行った。

(3) C57BLKS/J系統マウスの炎症関連大腸発がん感受性の検討

C57BLKS/Jを遺伝背景にもつレプチン受容体変異マウス(db/dbマウス)ヘテロ接合体マウス(db/+)、野生型マウス(+/+)およびC57BL/6Jマウスを用いて、炎症関連大腸発がん感受性を検討した。各マウス(5週齢)にAOM 100mg/kgを投与し、投与1週間後から2% DSSを1週間飲水投与した。DSS投与後3週目に各群の一部のマウスを屠殺し大腸粘膜を回収し、炎症関連因子のmRNA発現解析を行った。またDSS投与後14週目に各マウスを屠殺し、採血後、大腸を摘出し、大腸腫瘍の病理学的解析・免疫組織学的解析および血清成分の解析を行った。

(4) polygenicな肥満マウスにおける炎症関連大腸発がんに対するレプチンアンタゴニストによる大腸発がんの修飾作用

KK-A^yマウス(5週齢)にAOM 100mg/kgを投与し、投与1週間後から2% DSSを1週間飲水投与した。レプチンアンタゴニスト投与群は、レプチンアンタゴニスト1mg/kgをDSS飲水投与終了後から実験終了時までの期間、腹腔内投与した。DSS投与後14週目に各マウスを屠殺し、大腸腫瘍の病理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) *ob/ob*マウスを用いた炎症関連大腸がんの誘発とレプチンによる修飾作用

レプチンシグナル系異常の修復により、低下した炎症関連大腸発がんが回復あるいは促進される可能性を明らかにするために、レプチン欠損マウスである*ob/ob*マウスを用いて、レプチン投与による炎症関連大腸発がんに対する影響を観察した。*ob/ob*マウスでは、レプチン投与群において腫瘍の発生頻度ならびに個体あたりの平均腫瘍数が有意に低下していた。血液生化学的検査では、レプチン投与群で血清総コレステロール濃度ならびにLDLコレステロール濃度の有意な低下が観察され、また大腸粘膜における炎症関連因子のmRNA発現の解析では、レプチン受容体を介して活性化されるSignal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3のmRNA発現量の上昇ならびに炎症メディエーターであるTNF α のmRNA発現量の著明な低下が観察された。これらの結果より、レプチンは炎症関連大腸発がんに対して抑制的に作用し、レプチンによる大腸腫瘍形成の抑制には血清コレステロール濃度の改善ならびにSTAT3を介したTNF α 、inducible nitric oxide synthase (iNOS)などの炎症メディエーター産生の低下が関わっている可能性が示唆された。

さらに、*ob/ob*マウスは、対照群として用いたC57BL/6Jマウスに比べ大腸腫瘍の発生

率ならびに発生個数の有意な低下しており、C57BLKS/Jを遺伝背景にもつ*ob/ob*マウスでは、C57BL/6Jマウスに比べ、炎症を背景とする腫瘍形成の過程が抑制され大腸腫瘍の発生低下をきたしている可能性が示唆された。

(2) *db/db*マウスを用いた炎症関連大腸がんの誘発と免疫担当細胞移入による発がんの修飾

レプチンシグナル系異常のマウスでは免疫組織重量やT細胞をはじめとする免疫担当細胞による免疫機能が低下していることが知られていることから、免疫機能に異常がなく炎症関連大腸発がん感受性をもつC57BL/6Jマウスより免疫担当細胞を回収し、これらの細胞を*db/db*マウスに移入することにより炎症関連大腸発がんにどのような影響がみられるかについて検討を行った。*db/db*マウスにC57BL/6Jマウス由来の免疫担当細胞を様々なタイミングで移入したが、C57BL/6Jマウス由来免疫担当細胞移入による*db/db*マウスでの大腸発がんへの影響は観察されなかった。

(3) C57BLKS/J系統マウスの炎症関連大腸発がん感受性の検討

レプチンシグナルに異常のあるマウス(*db/db*マウス、*ob/ob*マウス)では、対照マウスとして頻用されるC57BL/6Jマウスに比べ大腸腫瘍の発生頻度が低下していたことから、C57BLKS/J系統マウスとC57BL/6Jマウスの炎症関連大腸発がん感受性について検討を行った。C57BLKS/Jを遺伝背景にもつ*db/db*マウスではC57BL/6Jマウスに比べ大腸がん発生頻度が有意に低下しており、さらに*db/db*マウスと同じC57BLKS/Jを遺伝背景にもつ*db/+*マウス、*+/+*マウスでは大腸がんの発生がほとんど認められなかったことから、C57BLKS/J遺伝背景マウスは炎症関連大腸発がんに対して低感受性であることが示唆された。さらにC57BLKS/J遺伝背景マウスでは、大腸粘膜におけるiNOS、interleukin (IL)-6などの炎症関連因子の発現が著明に低下しており、大腸粘膜におけるiNOSやIL-6などの炎症関連因子発現低下が炎症関連大腸発がんにおける低感受性に関わっている可能性が示唆された。

(4) polygenicな肥満マウスにおける炎症関連大腸発がんに対するレプチンアンタゴニストによる大腸発がんの修飾作用

レプチンシグナル系には異常がなく高レプチン血症を伴い肥満となるKK-A^yマウスを用いて炎症関連大腸がん発生に対するレプチンアンタゴニストの発がん修飾作用に関する検討を行ったが、レプチンアンタゴニスト(1mg/kg経口投与)には炎症関連大腸発がんに対する修飾作用は認められな

った。レプチンアンタゴニスト投与群では、血糖値、血清コレステロール濃度、体重などにも大きな変化はなかったことから、レプチンアンタゴニスト投与濃度(1mg/kg)では高レプチン血症を伴っているKK-A^yマウスに対する修飾作用を示さない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

H. Kohno, T. Oyama: Leptin suppresses inflammation-related large bowel carcinogenesis in male *ob/ob* mice. 72th Annual Meeting of Japanese Cancer Association (2013 年 10 月 4 日、Yokohama)

T. Oyama, R. Nakamura, H. Kohno: The Effect of the Hedgehog Signaling Pathway in Colonic Carcinogenesis. 71th Annual Meeting of Japanese Cancer Association (2012 年 9 月 20 日、Sapporo)

6. 研究組織

(1)研究代表者

甲野 裕之 (KOHNO, Hiroyuki)
金沢医科大学・看護学部・教授
研究者番号：20221236

(2)研究分担者

尾山 武 (OYAMA, Takeru)
金沢大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00515314