

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860517

研究課題名(和文) 経内頸静脈的脂肪酸持続投与が大腸発癌に与える影響および分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism underlying the effect of fatty acid on colorectal carcinogenesis

研究代表者

遠藤 宏樹 (ENDO, HIROKI)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：70468164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸発癌に関連する可能性があるとしてされている飽和脂肪酸の発癌促進効果を、大腸発癌マウスモデルに対してパルミチン酸を経内頸静脈持続投与および腹腔内投与することによって評価する方法を確立した。飽和脂肪酸は大腸上皮細胞の増殖を有意に亢進することを確認した。またその分子メカニズムとして、飽和脂肪酸/Toll-like receptor (TLR) 4/JNK経路が関与する可能性についてTLR4欠損マウスを用いて実証した。

研究成果の概要(英文)：We established the method how to evaluate the effect of saturated fatty acid on colorectal carcinogenesis by continuous jugular infusion or intraperitoneal injection of fatty acid. We clarified that saturated fatty acid (palmitate) acts as a growth factor for colonic epithelial cell proliferation in colon carcinogenesis via saturated fatty acid/Toll-like receptor 4/JNK pathway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸発癌 脂肪酸

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は近年我が国をはじめ欧米で急激に増加してきており、国内では2009年の年齢調整死亡率では女性で1位、男性で3位となっており、本疾患が国民生活に与える影響は極めて高く、その対策は急務である。大腸癌の発生に関して、運動不足や欧米食摂取に伴う肥満を背景とした生活習慣が大腸癌のリスクを押し上げるとする疫学・動物研究が数多く報告される一方で、これら肥満因子がどのようなメカニズムで大腸癌を促進するのかはいろいろな仮説が報告されているがまだはっきりしていないのが現状である。

高脂肪食摂取は大腸癌を促進することが証明されているが、脂肪酸摂取についてはその種類により発癌へ及ぼす影響は様々である(2)。WHO報告(2003年)で大腸癌との関連性「可能性あり」とされる飽和脂肪酸の大腸癌促進作用もはっきりしたエビデンスを得ていない。脂肪食投与の実験では様々な肥満因子が交絡し、*in vivo*で単一遊離脂肪酸と発癌との因果関係の証明は難しく、その分子機序についてもほとんど解明されていない。脂肪酸による大腸への直接的な影響・分子機序解明の困難さを背景として本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでマウス発癌モデルの研究を精力的に行ってきた(*Gastroenterology* 2004; 124: 361-367)。今回の研究はこのマウス発癌モデル研究のノウハウを背景に、1種類の血中遊離脂肪酸を上昇させることが可能な経内頸静脈的脂肪酸投与モデルを用いて飽和脂肪酸がどのような分子メカニズムで大腸上皮細胞増殖さらには発癌に影響するのかを世界で初めて*in vivo*での実験で解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 飽和脂肪酸投与条件の確立

*In vivo*での脂肪酸投与に関する研究は乳化させた中性脂肪を投与する方法が行われてきたが、これは種々の遊離脂肪酸が血中で上昇し、さらには体内から誘導されたりリポタンパク質などの交絡因子が重なり、現象に対する原因の特定が困難であった。しかし、乳化させたエチル化脂肪酸を経内頸静脈的に投与することで、血中ですばやく水酸化されて、1種類の血中遊離脂肪酸を上昇させる江口らが確立した方法(*Cell Metab* 2012; 15: 518-533)を直接彼らと連絡をとりあい修得した。パルミチン酸を0.2 $\mu$ l/minで24時間経内頸静脈的に持続投与することで大腸上皮のインスリン抵抗性の出現のみならずJNKも活性化(リン酸化)していることを確認し、さらに長時間脂肪酸を投与することで大腸

上皮の細胞増殖が亢進していることが確認され、本投与方法を用いた大腸発癌モデルの可能性を見出した。今回の研究では、発癌実験に対する脂肪酸長期投与も見据えた条件設定のため、さらなる追加検討を加える。①脂肪酸の投与時間、投与濃度での違いを確認する。②投与する脂肪酸の種類をオレイン酸やリノール酸など他のもので検討する。③各条件で、上皮細胞の増殖亢進をBudU、Ki67の取り込みおよびc-Junの標的遺伝子cyclinD1やCD44の発現解析により確認する。この経内頸静脈的投与がうまくいかないときには腹腔内投与など別の脂肪酸投与方法を検討する。

#### (2) 飽和脂肪酸投与の大腸発癌における役割解明

これまで高脂肪食摂取が大腸癌を有意に促進することは数々の論文により証明されてきたが、飽和脂肪酸の大腸上皮への作用を報告したものは皆無である。我々は飽和脂肪酸投与により上皮細胞の増殖が亢進することを確認済みである。本結果は飽和脂肪酸投与が正常上皮の増殖亢進を介して癌化を促進する可能性を示唆している。次に飽和脂肪酸の発癌における関与を明らかにするためにアゾキシメタンによる発癌モデルを用いて飽和脂肪酸投与がACF形成促進するのかを確認する。他の発癌モデルとして、ApcMinマウスおよびxenograftモデルを用いた脂肪酸投与による腫瘍細胞の増殖促進の解析も合わせて行う。

さらに飽和脂肪酸投与をした大腸上皮でJNKがリン酸化していることをウエスタンブロット解析で確認している。そこで我々は以下の機序仮説を立て検証することにした。脂肪酸はシグナル伝達物質としてその受容体TLR4を介してJNKをリン酸化した結果、c-Jun/AP-1転写因子を刺激する。上皮の増殖亢進機序として、c-Jun標的遺伝子であるcyclinD1、CD44などの発現亢進のほか、JNKとリンクするWntシグナルの関与に注目した。JNK経路の活性化によりAP-1とWnt両方の標的遺伝子の発現が亢進する。Wntシグナルは腸幹細胞における主要な経路であり、Lgr5はWntの標的遺伝子である。このLgr5が脂肪酸投与によりJNK活性を介して発現亢進し、細胞増殖が亢進する仮説を立てた。この仮説検証のために以下の計画を行う。

①経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与(+)/投与(-)それぞれのマウス大腸上皮の蛋白解析をJNK、c-Junに関してリン酸化特異的抗体を用いて行う。さらに転写因子としてのAP-1の脂肪酸による転写亢進はEMSA(ゲルシフト)にても解析する ②脂肪酸投与(+)/投与(-)それぞれのマウス大腸上皮陰窩におけるリン酸化 $\beta$ カテニン<sup>552</sup>(p- $\beta$ カテニン)陽性のCBC細胞数解析。これにより脂肪酸投与が幹細胞における $\beta$ カテニン活性を制御しているかを検証。③脂肪酸投与(+)/投与(-)それぞれのマウス大腸上皮における遺伝子

発現解析 (c-jun, cyclinD1, CD44, axin2, lgr5)。Lgr5 に関しては PCR、in situ hybridization で解析。④ JNK ノックアウトマウスに脂肪酸投与して、JNK を介した反応かの検証。⑤ 受容体 TLR4、GPR120 を介したメカニズムかどうかの検証のために、それぞれの受容体ノックアウトマウスを用いての脂肪酸投与発癌実験。⑥ 脂肪酸投与による上皮回転の亢進が可逆性を、脂肪酸投与を中止したマウスで検証。④⑤の計画が遂行困難な場合は、JNK 阻害薬および TLR4 アンタゴニスト使用による代替実験を検討する。

本脂肪酸投与研究で仮説として立てている、大腸発癌で最も主要な経路である Wnt シグナルと JNK 経路のリンクは非常にインパクトが高く、他の研究へ与える影響も非常に大きいと考える。Wnt シグナル関与証明のため、さらに下記の解析を行う。

- ① 脂肪酸投与 (+)/投与 (-) それぞれのマウス大腸上皮での JNK 活性と p-β カテニン、TCF4 発現の解析
- ② 脂肪酸投与マウスへ JNK 阻害薬 SP600125 を投与して、p-β カテニン、TCF4 発現解析
- ③ 培養大腸癌細胞へ飽和脂肪酸を添加し、JNK 阻害薬を追加して c-Jun と TCF4 発現を解析
- ④ 培養大腸癌細胞で c-jun をノックダウンし、飽和脂肪酸を添加して TCF 発現を解析
- ⑤ ApcMin マウスの腺腫を用いて共焦点顕微鏡により c-Jun と TCF4 の発現の局在を検証
- ⑥ アゾキシメタン誘発の発癌実験でマウス屠殺 2 週間前 (実験開始から 18 週目) から経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与を開始し、得た腫瘍の細胞増殖評価・蛋白解析を行う。共焦点顕微鏡により c-Jun と β カテニンの発現の局在を検証。

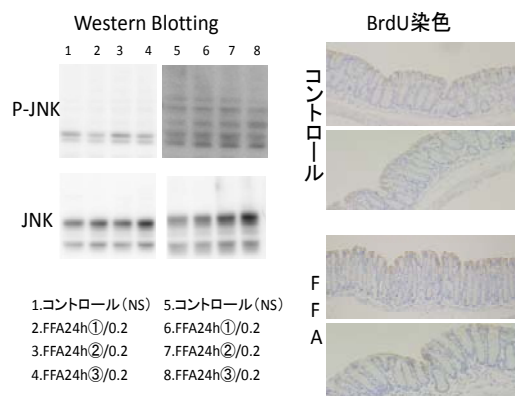
経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与により大腸上皮細胞増殖が亢進すること、上皮で JNK が活性化していることを予備実験で確認しており、今回の研究計画が妥当性のあるものであることが理解いただけると考える。予備実験で解析項目を決めているので実現可能と考えるが、うまくいかない場合、発癌モデルの切り替えや遺伝子発現に関しては網羅的解析、蛋白に関してはプロテオミクス解析に切り替えるなどの対応を考えている。

#### 4. 研究成果

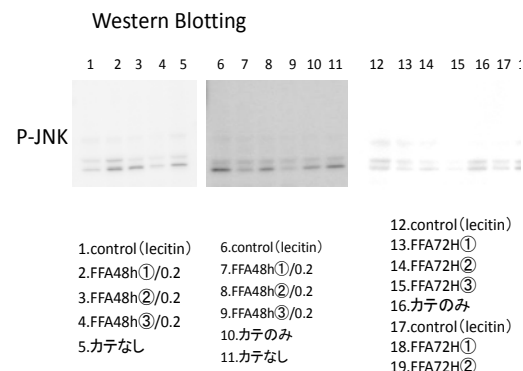
##### (1) 経静脈投与モデル

大腸上皮の増殖を BrdU で、またウエスタンブロッティングで JNK、p-JNK を検討した。まず、脂肪酸濃度を 600mM、速度を 0.2 μl/min

に固定し、投与時間を 24 時間 [図 1]、48 時間、72 時間 [図 2] で検討した。p-JNK は 24 時間、72 時間投与で上昇していたが、デ



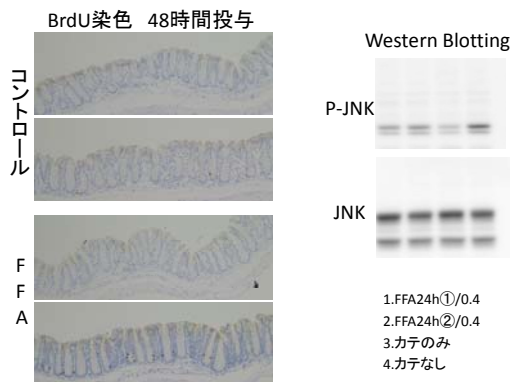
[図 1]



[図 2]

ータのばらつきも大きく有意差は認められなかった。大腸上皮増殖についても BrdU 染色では明らかにならなかった。そのため、600mM で速度を 0.4 μl/min に上げ、総投与量を増加し検討した [図 3]。しかし、投与量を 2 倍にしてもあまりはっきりとした結果は得られなかった。

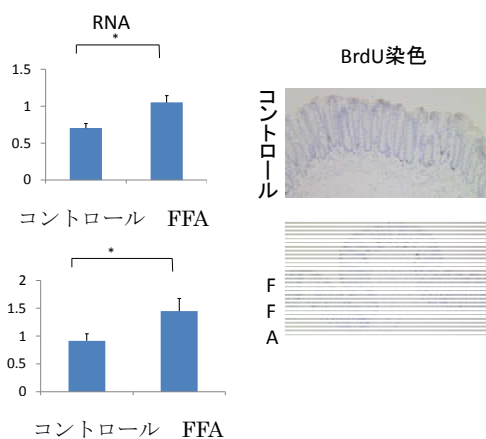
経静脈投与には 1 匹につき 1 ゲージ必要であり、n 数が確保できないということがあった。1 種類の血中遊離脂肪酸を上昇させることが可能な、n 数も確保できる他の方法を模索していたところ、腹腔内投与で 1 種類の血中脂肪酸濃度を上昇させる方法に注目した。



〔図 3〕

### (2) 腹腔内投与モデル

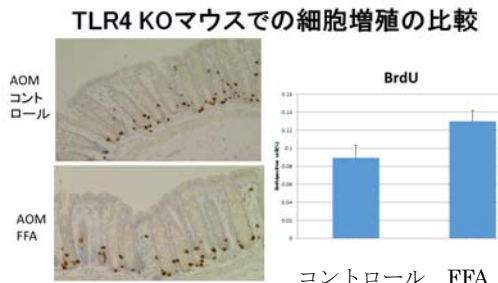
1日1回、150mMのパルミチン0.02ml/gを腹腔内投与した。5日間連続投与を行い、脂肪酸投与群で有意にcMyc、CyclinD1が上昇しており、細胞増殖を引き起こしている可能性が示唆された〔図4〕。今後は経静脈持続投与から腹腔内投与に変更し、投与量、濃度を変更し細胞増殖が最大となる条件を検討し、その後TLR4 KOマウス、JNK KOを使用し検討することで、分子機序についても解明を目指すこととした。



〔図 4〕

(3) 発癌モデルにおける脂肪酸投与の影響 飽和脂肪酸の発癌における関与を明らかにするためにアゾキシメタンによる発癌モデルを用いて大腸上皮細胞増殖およびそれに関わる分子発現を検討した。脂肪酸腹腔内投与により細胞増殖が有意に亢進したが、JNK活性(リン酸化)は脂肪酸投与で亢進するものの有意差は認めなかった。またcMycやCyclinD1の発現にも有意差はなかった。さらにTLR4 KOマウスを用いた発癌モデルで、脂肪酸が大腸上皮細胞増殖に与える影響を評

価した。TLR4 KOマウスの大腸上皮の細胞増殖は脂肪酸投与の有無により差がなかった〔図5〕。脂肪酸投与における飽和脂肪酸/TLR4経路の関与が示唆される結果であった。本研究は脂肪酸投与モデルの確立にかなりの時間を有してしまい、研究計画が一部予定通り検討できないものがあつた。ただし、今後脂肪酸の大腸発癌における役割



〔図 5〕

をさらに解明することで欧米食・肥満など生活習慣を背景として増加している発癌促進機序が明らかになると考えられ、大腸癌の化学予防の標的分子の同定につながっていくことが期待される。

### 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30件)

- ① Ezuka A, Sakai E, Kawana K, Nagase H, Kakuta Y, Uchiyama S, Ohkubo H, Higurashi T, Nonaka T, Endo H, Takahashi H, Nakajima A. Association between factors associated with colorectal cancer and rectal aberrant crypt foci in humans. *Oncol Lett.* 2015 Dec;10(6):3689-3695. 査読有. doi: 10.3892/ol.2015.3763.
- ② 内山詩織、日暮琢磨、梅沢翔太郎、遠藤宏樹、中島淳. 【栄養・食と消化器】食物と消化管癌研究の最前線. *分子消化器病* (1348-995X) 12巻2号 Page159-164(2015.06). 査読無. <https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ae6mogab&ye=2015&vo=12&issue=2>
- ③ Umezawa S, Higurashi T, Uchiyama S, Sakai E, Ohkubo H, Endo H, Nonaka T, Nakajima A. Visual distraction alone for the improvement of colonoscopy-related pain and satisfaction. *World J Gastroenterol.* 2015 Apr 21;21(15):4704-14. 査読有. doi: 10.3748/wjg.v21.i15.4707.
- ④ Endo H, Kato T, Sakai E, T, Umezawa S,

- Higurashi T, Ohkubo H, Nakajima A. Small bowel injury in low-dose aspirin users. *J Gastroenterol.* 2015 Apr;50(4):378-86. 査読有.  
doi: 10.1007/s00535-014-1028-x.
- ⑤ Endo H, Sakai E, Taniguchi L, Kessoku T, Komiya Y, Ezuka A, Kawamura H, Taguri M, Higurashi T, Ohkubo H, Yamada E, Takahashi H, Inamori M, Maeda S, Sakaguchi T, Hata Y, Nagase H, Nakajima A. Risk factors for small-bowel mucosal breaks in chronic low-dose aspirin users: data from a prospective multicenter capsule endoscopy registry. *Gastrointest Endosc.* 2014 Nov;80(5):826-34. 査読有.  
doi: 10.1016/j.gie.2014.03.024.
- ⑥ Taniguchi L, Higurashi T, Uchiyama T, Kondo Y, Uchida E, Uchiyama S, Jono F, Hamanaka J, Kuriyama H, Hata Y, Endo H, Takahashi H, Nagase H, Matsushashi N, Nakajima A. Metabolic factors accelerate colorectal adenoma recurrence. *BMC Gastroentrol.* 2014 Oct 23;14(1):187. 査読有.  
doi: 10.1186/1471-230X-14-187.
- ⑦ Sakai E, Ohata K, Chiba H, Matsushashi N, Doi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Tsuji S, Yagi K, Matsusaka K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Methylation epigenotypes and genetic features in colorectal laterally spreading tumors. *Int J Cancer.* 2014 Oct 1;135(7):1586-95. 査読有.  
doi: 10.1002/ijc.28814.
- ⑧ Higurashi T, Endo H, Uchiyama T, Uchiyama S, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Takahashi H, Maeda S, Wada K, Natsumeda Y, Hippo Y, Nakajima A, Nakagama H. Conditional knockout of the leptin receptor in the colonic epithelium revealed the local effects of leptin receptor signaling in the progression of colonic tumors in mice. *Carcinogenesis* 2014 Sep;35(9):2134-41. 査読有.  
doi:10.1093/carcin/bgu 135.
- ⑨ 日暮琢磨、酒井英嗣、内山詩織、梅沢翔太郎、遠藤宏樹、高橋宏和、中島淳。【生活習慣と消化管・痔疾患】肥満関連疾患をターゲットとしたメトホルミンによる大腸腫瘍の化学予防の可能性。消化器内科(1884-2895)58巻5号 Page612-616(2014.05)。査読無。  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020113290>
- ⑩ 日暮琢磨、内山崇、内山詩織、山田英司、大久保秀則、酒井英嗣、遠藤宏樹、高橋宏和、中島淳。摂食・代謝をコントロールするレプチンは腫瘍に発現するレセプターを介して大腸腫瘍の増殖を促進する。消化と吸収(0389-3626)36巻2号 Page226-232(2014.04)。査読無。  
<http://archive.jsge.org/congress/detail/68022>
- ⑪ 日暮琢磨、内山詩織、山田英司、大久保秀則、酒井英嗣、遠藤宏樹、高橋宏和、中島淳。エイコサペントエン酸(EPA)は大腸上皮の増殖を抑制し直腸ACFを減少させる。二重盲検無作為対照試験。消化と吸収(0389-3626)36巻2号Page238-242(2014.04)。査読無。  
<http://www.jsdaa.org/pdf/kaishi/vol136no2.pdf>
- [学会発表] (計18件)
- ① Higurashi T, Hosono K, Umezawa S, Uchiyama S, Uchiyama T, Endo H, Nakajima A : Metformin efficacy and safety for colorectal polyps: A double-blind randomized controlled trial. United European Gastroenterology Week. Free Paper Session Colorectal cancer: Biomaekers and screening, 2015年10月16日, Barcelona (Spain) .
- ② 内山詩織、日暮琢磨、梅沢翔太郎、遠藤宏樹、中島淳：大腸上皮における飽和脂肪酸の影響。第23回日本消化器関連学会週間(JDDW 2015) デジタルポスターセッション(消化器病学会)大腸(基礎)2, 2015年10月10日, グランドプリンスホテル高輪(東京都港区)。
- ③ 梅沢翔太郎、遠藤宏樹、鹿野島健二、稲生優海、松浦瑞恵、冬木晶子、内山詩織、酒井英嗣、大久保秀則、日暮琢磨、飯田洋、野中敬、中島淳：当院における大腸カプセル内視鏡施行例の検討。第101回日本消化器病学会総会 一般演題 口演 カプセル内視鏡, 2015年4月25日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)。
- ④ 梅沢翔太郎, 日暮琢磨, 内山詩織, 酒井英嗣, 遠藤宏樹, 中島淳: GPR120 経路をターゲットとしたエイコサペントエン酸(EPA)による大腸腫瘍化学予防。第131回日本薬理学会関東部会(癌1), 2014年10月11日, 横浜市立大学(神奈川県横浜市)。
- ⑤ 日暮琢磨, 梅沢翔太郎, 内山詩織, 酒井英嗣, 細野邦弘, 遠藤宏樹, 中島淳: Young Investigator Award AMPK-mTOR 経路をターゲットとしたメトホルミンによる大腸腫瘍化学予防。第131回日本薬理学会関東部会(癌1), 2014年10月11日, 横浜市立大学(神奈川県横浜市)。
- ⑥ 酒井英嗣, 梅沢翔太郎, 内山詩織, 大久保秀則, 日暮琢磨, 遠藤宏樹, 松坂恵介, 船田さやか, 高根希世子, 金田篤志, 油谷浩幸, 中島淳: 大腸前がん病変の遺伝子変異およびエピジェネティック異常の解析。第73回日本癌学会学術総会 ポ

スター DNAメチル化(3), 2014年9月  
25日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜  
市).

[その他]

横浜市立大学附属病院消化器内科 肝胆膵消  
化器病学教室

<http://ycuhepabiligi.wix.com/home>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 宏樹 (ENDO, Hiroki)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号: 70468164

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: