

## 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 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591695

研究課題名（和文） 胆汁酸受容体 FXR 阻害によるバレット食道腺癌の化学予防

研究課題名（英文） Chemoprevention for Barrett's esophageal adenocarcinogenesis by inhibiting bile acid receptor, FXR.

研究代表者

藤村 隆 (FUJIMURA TAKASHI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：50262580

研究成果の概要（和文）：

胆汁酸受容体の一つ farnesoid X receptor のアンタゴニストであるガグルステロン(GS)が、バレット食道癌の発癌過程を抑制できるか否かを、ラット胃全摘後十二指腸食道逆流モデルを用いて検討した。ラットを GS 高投与群、GS 低投与群、非投与群の 3 群に分けて、20, 40, 50 週目に屠殺し検討した。過形成、円柱上皮化生、異形成、癌の発生率は、いずれの時期においても、3 群間で差が認められなかった。以上より、GS は本モデルにおいてバレット食道腺癌の発癌を予防できないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We examined chemopreventive effect of guggulesterone (GS), an antagonist of farnesoid X receptor, on Barrett's esophageal cancer using rodent duodeno-esophageal reflux model. Animals were divided into 3 groups, high GS group, low GS group and control and sacrificed 20, 40, 50 weeks after operation. There were no significant differences between 3 groups in the incidences of hyperplasia, columnar epithelia, dysplasia, and carcinoma in all terms. These results suggested that GS had no preventive effect on the esophagocarcinogenesis in this model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：十二指腸食道逆流、食道腺癌、Farnesoid X receptor (FXR)、ガグルステロン、Cyclooxygenase-2 (COX-2)

1. 研究開始当初の背景

我が国では近年の食生活の欧米化に従って、大腸癌、乳癌、膵癌が激増しているが、バレット食道を背景にした食道腺癌もそのひとつである。その原因の一つとして胃食道逆流症が考えられているが、胃酸のみの逆流では食道炎は発症するものの、発癌までは至らないとされている。これに対して、十二指腸液のようなアルカリ逆流により、食道に炎症からバレット食道化生や異形成を経て食道癌を発生することが、判明してきた(Kauer WK et al.: Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. The need for surgical therapy re-emphasized. *Ann Surg* 222:525-531,1995.)。アルカリ逆流液の成分の中でも原因と考えられるものとして、胆汁が挙げられているが、中でも胆汁酸(特にリトコール酸、デオキシコール酸など)は、食道上皮に重篤な炎症を惹起することが知られている。

近年、バレット食道において胆汁酸の核内受容体の一つ farnesoid X receptor (FXR)の発現が非常に亢進していることが報告されており、胆汁酸が FXR を介して下流の PPAR $\alpha$  や cyclooxygenase-2 (COX2)を誘導し、細胞増殖の促進やアポトーシスの抑制などに関与していることが示唆されている (De Gottardi A et al.: Expression of the bile acid receptor FXR in Barrett's esophagus and enhancement of apoptosis by guggulsterone in vitro. *Mol Cancer*. 5:48,2006.)。インドに広く分布するコミフォラ・ムクルと呼ばれる植物に含まれるガグルステロン(guggulesterone, GS) は、植物ステロールの一つで、これまでコレステロール低下作用や抗炎症作用などを有することが知

られていた。最近、GS が FXR のアンタゴニストであることが報告され、FXR を介した各種のシグナル伝達を抑制する可能性が期待されている。

当科では以前より、ラットを用いて十二指腸液を食道に逆流させるモデルを作成し、食道炎から腸上皮化生を介してバレット食道腺癌の発生すること、またCOX2阻害剤による化学予防の可能性を報告してきた(Miwa K et al.: Reflux of duodenal or gastro-duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int J Cancer*. 67:269-274, 1996. Oyama K et al: A COX-2 inhibitor prevents esophageal inflammation-metaplasia adenocarcinoma sequence in rats. 26:565-570,2005)。

## 2. 研究の目的

今回我々は、上記のラット十二指腸食道逆流モデルを使用して、GS によりバレット食道癌の発癌過程が予防できるか否と、FXR の関与の有無について明らかにすることを計画した。

十二指腸液の食道への逆流は、意外と多く認められ、バレット食道癌は肥満者の多い欧米において、非常に頻度が高いことが知られている。最近我が国でも肥満者は増加しており、過食による腹圧の上昇などから逆流性食道炎を経て食道癌に進む可能性が高いと思われる。すなわちバレット食道腺癌の予備軍は、我が国でも増えつつあると考えられる。

癌の発症の予防という観点から「化学予防」という言葉が台頭しているが、確かなエビデンスがなければ机上の空論となる。今回の我々の実験により、胆汁酸の食道発癌への関わりと、それらの阻害剤の有効性が示されると考えている。その結果、GS が増加しつつある逆流性食道炎患者において、食道腺癌

に進展するリスクを低減させることにより社会に貢献することが、本研究の最終的な目的である。

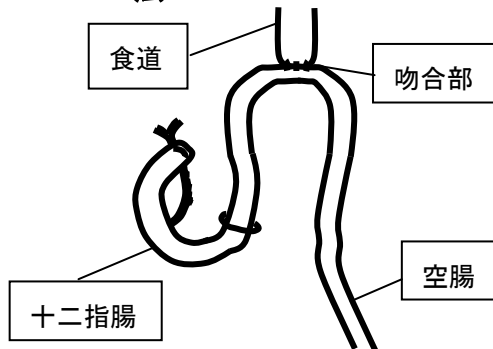
### 3. 研究の方法

#### (1), 十二指腸食道逆流モデル作成

7週齢のWistar雄性ラットを用いて、十二指腸食道逆流モデルを作成する。すなわち、図のように胃を全摘後、空腸を起始部から約4cmの部位で食道の断端に端側吻合する(Schlatter法)。

図 十二指腸食道逆流モデル

#### Schlatter 法



手術を施行したラットをGS高投与群、GS低投与群、非投与群(コントロール群)の3群に分けて、40週間観察する。GS高投与群は2 mg/kg/day、GS低投与群は1 mg/kg/dayを経口的に投与する。また各群において投与後10,20,30週目に各10頭ずつ屠殺し、最終的に40週目に30頭屠殺する。

#### (2), 実験動物の検討

以下の検討を、ラットの屠殺時期に応じて順次行う。

##### ①、病理組織学的検査

食道を切開し、肉眼的観察、写真撮影を行った後、炎症の有無を判定し、腫瘍が発生している場合は腫瘍の個数、大きさを調べる。後のprostaglandin E2 (PGE2)測定用に粘膜を少し剥離採取する。ホルマリン固定後、

HE染色を行い、組織学的診断を行う。

##### ②、免疫組織学的検査

食道粘膜での関連タンパクの発現を見るために、LSAB法により染色する(FXR, PPAR $\alpha$ , COX-2)。また細胞動態を把握するため、BrdU染色, TUNEL法を行う。

##### ③、分子生物学的検査

RT-PCR法により食道粘膜のmRNAの発現、Southern blotting法によりタンパクの発現を調べる。(FXR, PPAR $\alpha$ , COX2) またRIA kitを用いて、COX2の産物のひとつであるPGE2産生量を測定する。

### 4. 研究成果

ラットを20, 40, 50週目に屠殺して、各群における食道の炎症の有無を判定し、腫瘍が発生している場合は腫瘍の個数、大きさを測定した。50週目における病理組織学的な過形成の発生頻度はコントロール群、GS低用量投与群、GS高用量投与群ともに100%で差は認められなかった。円柱上皮化生はコントロール群75%に対して、GS低用量投与群80%、GS高用量投与群83%と差が認められなかった。また異形成、癌の頻度もコントロール群がそれぞれ50%, 38%に対して、GS低用量投与群は40%, 50%、GS高用量投与群は40%, 33%といずれも差が認められなかった。癌の種類は、扁平上皮癌、腺癌、腺扁平上皮癌、粘液癌がほぼ同じ頻度で見られたが、各群で発生率に差は認められなかった。

また経時的な変化では、コントロール群の過形成は20週から認められ、40, 50週では100%となり、円柱上皮化生も20週から認められ40週で57%、50週で75%と増加した。一方異形成は40週から認められ(14%)、50週では50%に達し、癌は50週目に発生が認められた。GS低用量投与群、GS高用量投

与群においても、これらの病変の経時的な発生頻度に差は認められなかった。さらに、免疫組織学的検討では FXR, COX2, PPAR $\alpha$  の発現に 3 群間で差はみられなかった。

以上の結果から、ガグルステロンはラット胃全摘後十二指腸液食道逆流モデルにおいて、過形成、円柱上皮化生、異形成から腺癌にいたる発生経路を抑制することはできないと考えられた。

#### 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 11 件)

- ① 宮下知治, 藤村 隆 (他 7 名, 2 番目)(Barrett 食道腺癌の予防はどこまで可能か-プロトンポンプ阻害剤によるラット食道腺癌発生抑制効果-)消化器の臨床 14(2011),480-487,査読無
- ② Macke RA, Fujimura T (他 14 名, 5 番目)(Barrett's esophagus and animal models) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1232(2011),392-400,査読無
- ③ 藤村 隆(食道腺癌と発癌予防 -ラット十二指腸食道逆流モデルから-)金沢大学十全医学学会雑誌 120(2011),99-103,査読無
- ④ Fujimura T, Oyama K, Sasaki S, Nishijima K, Miyashita T, Ohta T, Miwa K, Hattori T. (Inflammation-related carcinogenesis and prevention in esophageal adenocarcinoma using rat duodenoesophageal reflux models) Cancers 3(2011)3206-3224,査読有
- ⑤ 藤村 隆, 尾山勝信, 宮下知治, 二宮 致, 太田哲生, 三輪晃一, 服部隆則(Barrett 食道癌の発生に COX-2 の発現は関与しているか)分子消化器病 7(2010)51-57,査読無
- ⑥ 藤村 隆, 尾山勝信, 宮下知治, 二宮 致, 太田哲生, 三輪晃一, 服部隆則(COX-2 阻害剤のラット食道腺癌発生抑制効果) G.I.Research 18(2010)37-44,査読無
- ⑦ 宮下知治, 藤村 隆(他 8 名, 2 番目)(ラベプラゾールによるバレット食道および食道発癌の予防)消化器科 49(2009)489-493,査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Fujimura T (Surgical intervention to reduce postgastrectomy syndrome in gastric cancer), 10th Congress of The

Korean Society for Parenteral and Enteral Nutrition, 2011.8.26, Grand Hilton, Seoul (Korea)

- ② 宮下知治,藤村 隆,二宮 致,伏田幸夫,太田哲生(十二指腸液の逆流量が発生する食道癌の組織型に関与するか?) 第 22 回日本消化器癌発生学会総会, 2011 年 11 月 25 日, ホテルニューオータニ佐賀 (佐賀県)
- ③ 宮下知治,藤村 隆,太田哲生(逆流性食道炎から Barrett 食道、食道腺癌への進展機序) 第 97 回日本消化器病学会総会, 2011 年 5 月 13 日, 京王プラザホテル(東京都)
- ④ Fujimura T (Function-preserving gastrectomy navigated with sentinel node mapping for early gastric cancer), 9th International Gastric Cancer Congress, 2011.4.22. Coex Center, Seoul (Korea)
- ⑤ Fujimura T, Sasaki S, Oyama K, Miyashita T, Ohta T, Miwa K, Hattori T. (Chemoprevention for esophageal adenocarcinoma using rat duodenoesophageal reflux model), 10th World conference, World organization for specialized studies on diseases of the esophagus, 2010,8,30. Seaport World Trade Center, Boston (USA)
- ⑥ 宮下知治,藤村 隆,太田哲生(プロトンポンプインヒビター(PPi)による Barrett 食道および食道発癌の予防) 第 79 回日本消化器内視鏡学会総会, 2010 年 5 月 13 日, グランドプリンス新高輪ホテル (東京都)

[図書] (計 1 件)

- ① 宮下知治, 藤村 隆, John W Harmon, 二宮 致, 伏田幸夫, 谷 卓, 西村元一, Guy Martin, 萱原正都, 太田哲生, 医学書院, (消化器病学の進歩 I・消化管領域), 2009 年, 76 頁~81 頁

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 隆 (FUJIMURA TAKASHI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号 : 50262580