202　GPR120経路に注目した大腸癌新規予防法の開発	日暮　琢磨

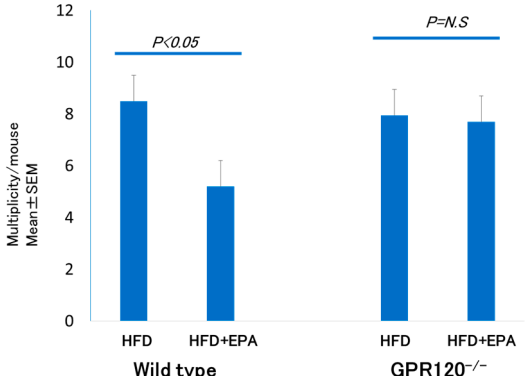
【目的】大腸癌は定期健診や内視鏡検査の普及により早期発見の機会も増えているが罹患率／死亡率ともに依然として高く、対策が必要である。大腸癌や前がん病変の早期発見/早期治療は死亡率を抑制することは既に論をまたないが、治療した患者さんはまた新規病変が出現する高リスク群であり、根本的な対策すなわち疾病／罹患予防への期待が高まっている。

すでに循環器、神経内科領域では疾病予防の取り組みとして生活習慣の変容のほか、心筋梗塞、脳梗塞のハイリスク群にはアスピリンなどの薬剤を用いて積極的に予防を行なっているが今後、癌診療においても薬剤を用いた予防策を講ずることが求められている。現在欧米を中心に、経口薬を内服することで癌を積極的に予防しようとする試みが行われており、化学予防と呼ばれている。大腸癌の危険因子として肥満・糖尿病・高脂肪血症状などの生活習慣病因子が考えられており、これらは化学予防のターゲットとして注目される。脂質異常症、閉塞性動脈硬化症において既に実地臨床で使用されている EPA や DHA などのω3 系多価不飽和脂肪酸（ω3PUFA）は、近年、家族性腺腫症患者の大腸腺腫を減少・縮小させたという報告やマウス大腸腫瘍モデルにおいても腫瘍を抑制したという報告があり、大腸腫瘍の化学予防薬としての可能性を有しているといえる。ω3PUFA の化学予防作用機序としては、既に存在する大腸腫瘍に対しては COX-2 の抑制作用が主経路と考えられているが、正常大腸上皮での COX-2 の発現は低く、腫瘍の発生予防機序としては別の経路が関与している可能性が高い。近年ω3PUFA の受容体として G 蛋白共役受容体 120（GPR120）が発見され特に糖尿病領域において注目されている。それによると、ω3PUFA は GPR120 を介して抗炎症効果を示し、抗炎症作用や細胞増殖抑制作用を示すことが実証されている。しかし消化器領域においてはまだ GPR120 に注目したω3PUFA の抗腫瘍効果を検討した報告はない。しかし腸管には GPR120 が豊富に発現しており、糖尿病領域で報告されたようにω3PUFA が GPR120 を介して活性化している JNK や NFκβを抑制するという機序で EPA が大腸腫瘍の初期段階で抗腫瘍効果を発揮していると推測している。今回我々はω3PUFA による大腸腫瘍予防における GPR120 の役割について、*GPR120* 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて解析を行う。

【方法】野生型マウスと *GPR120* 欠損マウスに大腸発癌物質であるアゾキシメタン（AOM）を投与して大腸前がん病変である ACF、さらに長期投与で大腸ポリープを誘導する。そこにω3PUFA である EPA を投与し、抗腫瘍作用、GPR120 経路の役割や、ω3PUFA による大腸腫瘍予防の機序を、免疫組織学的、生化学的に解析する

【結果】高脂肪食（HFD）投与により WT、*GPR120* 欠損マウスともに普通食（ND）投与のモデルと比較して ACF（図 1）、大腸ポリープの誘導が亢進された（図 2）。EPA を投与すると、WT では ND、HFD ともに ACF、大腸ポリープの発生が有意に抑制されたが、*GPR120* 欠損マウスでは ACF の抑制効果は認めなかった。ウエスタンブロットで蛋白発現を確認すると、GPR120 経路の顆粒である TAK1、JNK のリン酸化が EPA 投与で抑制されており、GPR120 経路を介して EPA が抗腫瘍作用を示したことが示唆された。

野生型と GPR120 欠損マウスの ACF 数の比較



202. GPR120 経路に注目した大腸癌新規予防法の開発

日暮　琢磨

*横浜市立大学附属病院 消化器内科

Key words：大腸発癌，化学予防，GPR120 経路，ω3PUFA

緒　言

大腸癌は定期健診や内視鏡検査の普及により早期発見の機会も増えているが罹患率/死亡率ともに依然として高く、対策が必要である。大腸癌や前がん病変の早期発見／早期治療は死亡率を抑制することは既に論をまたないが、治療した患者さんはまた新規病変が出現する高リスク群であり、根本的な対策すなわち疾病/罹患予防への期待が高まっている。

すでに循環器、神経内科領域では疾病予防の取り組みとして生活習慣の変容のほか、心筋梗塞、脳梗塞のハイリスク群にはアスピリンなどの薬剤を用いて積極的に予防を行なっているが今後、癌診療においても薬剤を用いた予防策を講ずることが求められている。現在欧米を中心に、経口薬を内服することで癌を積極的に予防しようとする試みが行われており、化学予防と呼ばれている。大腸癌の危険因子として肥満、糖尿病、高脂肪血症状などの生活習慣病因子が考えられており、これらは化学予防のターゲットとして注目される。脂質異常症、閉塞性動脈硬化症において既に実地臨床で使用されている EPA や DHA などのω3 系多価不飽和脂肪酸（ω3PUFA）は、近年、家族性腺腫症患者の大腸腺腫を減少・縮小させたという報告［1］やマウス大腸腫瘍モデルにおいても腫瘍を抑制したという報告があり［2］、大腸腫瘍の化学予防薬としての可能性を有しているといえる。ω3PUFA の化学予防作用機序としては、既に存在する大腸腫瘍に対しては COX-2 の抑制作用が主経路と考えられているが、正常大腸上皮での COX-2 の発現は低く、腫瘍の発生予防機序としては別の経路が関与している可能性が高い。

近年ω3PUFA の受容体として G 蛋白共役受容体 120（GPR120）が発見され特に糖尿病領域において注目されている［3］。それによると、ω3PUFA は GPR120 を介して抗炎症効果を示し、抗炎症作用や細胞増殖抑制作用を示すことが実証されている［4］。

消化器領域においてはまだ GPR120 に注目したω3PUFA の抗腫瘍効果を検討した報告はない。しかし腸管には GPR120 が豊富に発現しており、糖尿病領域で報告されたようにω3PUFA が GPR120 を介して活性化している JNK や NFκβ を抑制するという機序で EPA が大腸腫瘍の初期段階で抗腫瘍効果を発揮していると推測している。今回我々はω3PUFA による大腸腫瘍予防における GPR120 の役割について、*GPR120* 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて検討を行う。

GPR120 の機能異常がヒトとマウスどちらにおいても肥満を来たすことが、報告され、リスク因子となる遺伝子多型が既に同定されている［5］。大腸腫瘍においても特に予防や進展抑制において GPR120 経路が重要な役割を果たしている可能性が高いことが予想され、ω3PUFA／GPR120 経路をターゲットにした大腸癌化学予防の研究は、世界でも先駆的であり、当該分野において新たな展開をもたらすものと期待されている。

*現在の所属：横浜市立大学 医学研究科 肝胆膵消化器病学教室

方法および結果

実験 1. ACF モデル

7 週齢オスの BL6J マウスに高脂肪食を投与しアゾキシメタン（AOM）を 10 ㎎/kg腹腔内投与を 2 週間行った。その後に高脂肪食を続ける高脂肪食（HFD）群と、高脂肪食に 5%EPA 投与した高脂肪食＋EPA 群（HFD+EPA 群）に分けて 13 週まで飼育し Sacrifice を行い大腸に分布する ACF の個数を比較した。（図 1）ACF の測定はホルマリンに 24 時間固定後に実体顕微鏡を用いて測定した。測定はマウスの群を盲検化して評価を行った。細胞増殖活性の評価のために BrdU を sacrifice1 時間前に腹腔内注射を行い、免疫染色で評価を行った。また GPR120 経路を解析するために、GPR120 の下流である TAK-1、JNK、c-Jun についてウエスタンブロットでリン酸化蛋白について評価を行った。

野生株マウスは高脂肪食に EPA を投与すると ACF の個数（平均±SE）が有意に減少した（HFD：8.75±0.75、HFD＋EPA：5.25±1.06、p＝0.02）が、*GPR120* 欠損マウスにおいて減少は認められなかった（HFD：7.87±0.74、HFD＋EPA：7.5±0.63、p＝0.70）（図 2）。

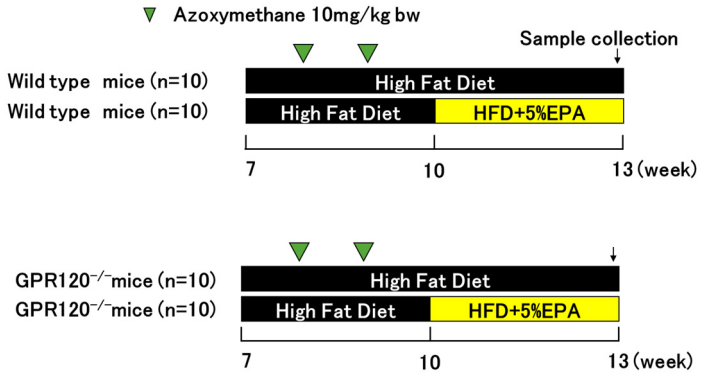


図 1. 実験プロトコール

7 週齢 BL6J マウスに高脂肪食を投与しアゾキシメタン（AOM）を 10 mg/kg 腹腔内投与を 2 週間行った。その後に高脂肪食とそれに 5%EPA 投与した高脂肪食群に分けて 13 週まで飼育し Sacrifice を行い大腸に分布する ACF の個数を比較した。

結果 1. WT と *GPR120*KO マウスの ACF 数の比較（図 2）

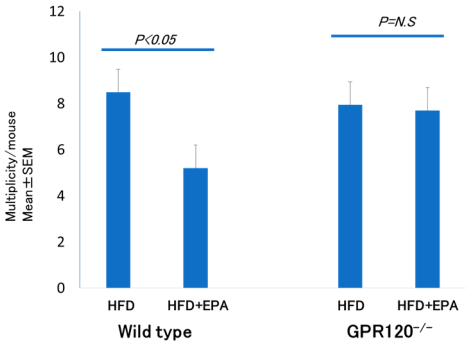


図 2. WT と *GPR120* 欠損マウスの ACF 数の比較

野生型マウスは高脂肪食に EPA を投与すると ACF の個数が有意に減少したが、*GPR120* 欠損マウスにおいて減少は認められなかった。統計処理は、student-t 検定。

結果 2. EPA の大腸上皮増殖への影響（図 3）

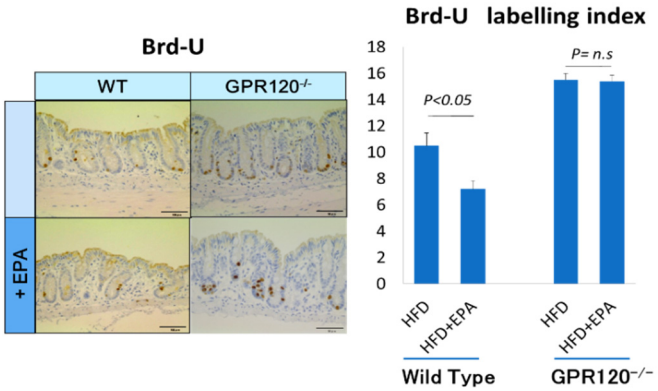


図 3. 野生型と *GPR120* 欠損マウスの Brd-U の取り込みの比較
野生型マウスでは EPA 投与により Brd-U の取り込みが低下したが、*GPR120* 欠損マウスにおいて取り込みは変化がなかった。統計処理は、student-t 検定。

結果 3. GPR120 経路解析（図 4）

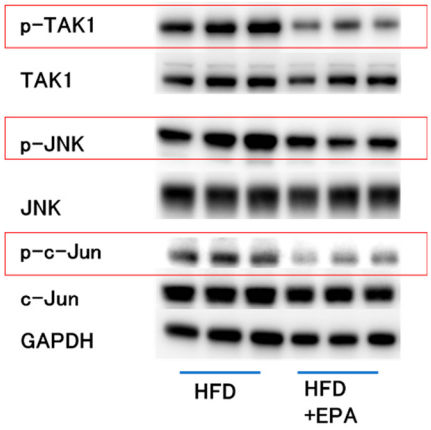


図 4. EPA 投与により TAK1、JNK、c-Jun のリン酸化が抑制された

マウスの ACF は大腸 carcinogenesis の初期にあたり、腫瘍の発生（initiation）をみていると考えられている。EPA 投与により野生株マウスは ACF の発生が抑制され、細胞増殖活性が低下し、GPR120 経路の下流シグナルが抑制されたが、これらの事象は *GPR120* 欠損マウスにおいては認められなかった。このことは、EPA は GPR120 を通して腫瘍の発生を抑制することが示された。

実験 2. 腫瘍モデル

7 週齢 BL6J マウスに高脂肪食を投与し、アゾキシメタン（AOM）を 10 mg/kg 腹腔内投与を 6 週間行った。その後高脂肪食を続ける高脂肪食（HFD）群と、高脂肪食に 5%EPA 投与した高脂肪食＋EPA 群（HFD+EPA 群）に分けて 29 週まで飼育し腫瘍の個数、大きさを比較した（図 5、6）。腫瘍の測定はホルマリンに 24 時間固定後に実体顕微鏡を用いて測定した。測定は ACF の測定と同様にマウスの群を盲検化して評価を行った。

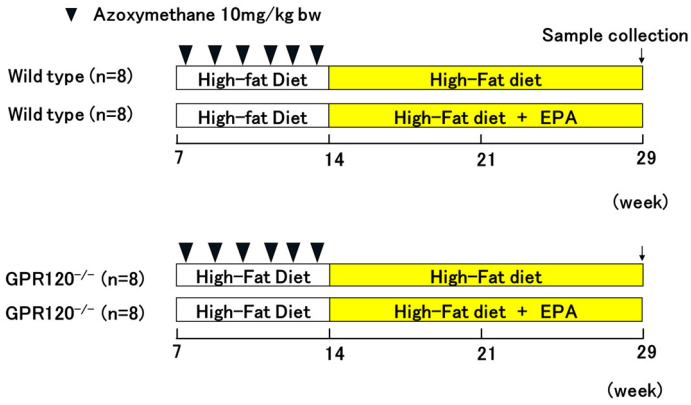


図 5. 実験プロトコール

7 週齢 BL6J マウスに高脂肪食を投与し、アゾキシメタン（AOM）を 10 mg/kg 腹腔内投与を 6 週間行った。その後、高脂肪食後に高脂肪食とそれに 5%EPA 投与した高脂肪食群に分けて 29 週まで飼育し腫瘍の個数、大きさを比較した。

結果 4. 腫瘍モデルにおける野生型と *GPR120* 欠損マウスの比較

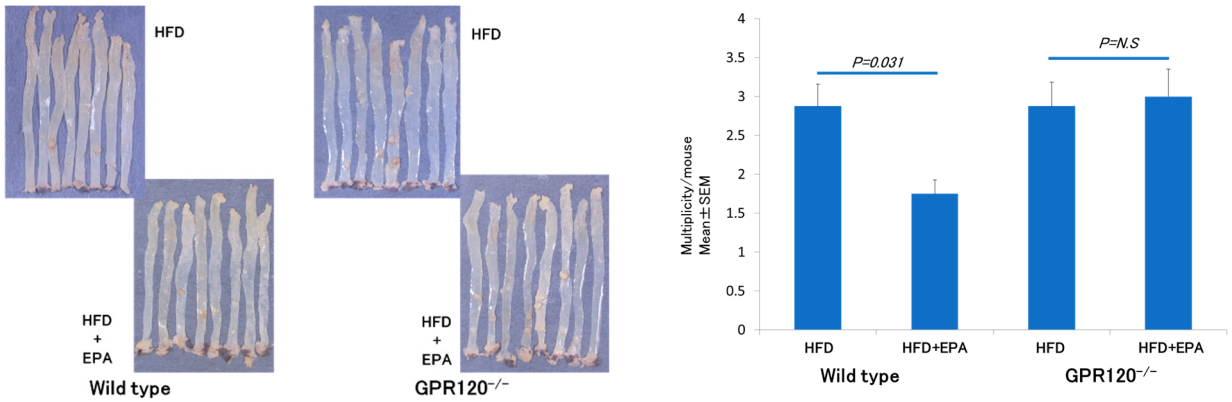


図 6. 野生型と *GPR120* 欠損マウスの腫瘍のマクロ像（左）と個数の比較（右）

野生型マウスでは EPA を投与すると腫瘍の発生が抑制されたが、*GPR120* 欠損マウスでは変化が認められなかった。統計処理は、student-t 検定。

考　察

大腸癌の化学予防としては、アスピリンや COX-2 阻害薬などの有効性が報告されているが、アスピリンは消化管出血の副作用があり、また COX-2 選択的阻害剤は重篤な心疾患などの副作用があることが報告されている。一方、本研究で用いた EPA などのω3PUFA は脂質異常症/閉塞性動脈硬化症の治療薬として既に臨床に用いられており、副作用なども少なく、コンプライアンスも高いので、より安全な化学予防が期待される。

今回の検討では腫瘍の発生をみることができる ACF モデルおよび腫瘍の増殖をみることができる腫瘍モデル両方において抗腫瘍作用を示した。またその機序としては、GPR120 を介してその下流の増殖シグナル抑制していることが示された（図 7）。

EPA などのω3PUFA は青魚に多く含まれ、機能性食品としての側面ももつので、今後、大腸癌ハイリスク群の食事への応用など、食事/栄養面からの大腸癌への予防医療がより具体的になることが期待される。

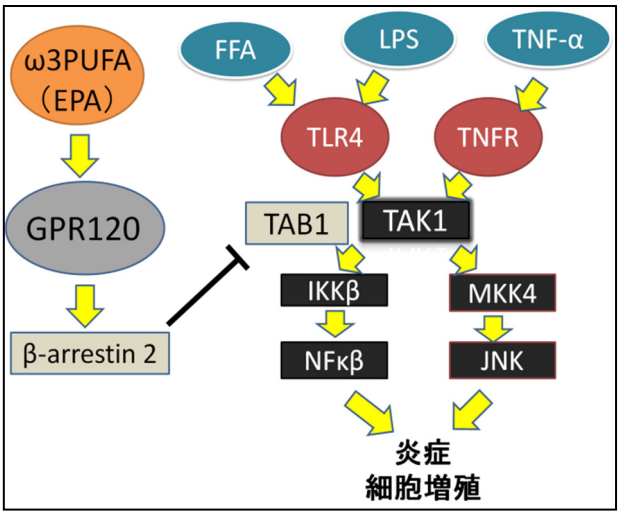


図 7.　ω3PUFA/GPR120 経路

共同研究者・謝辞

本研究のご指導を頂いた横浜市立大学肝胆膵消化器病学の中島淳教授および教室員の先生方に御礼申し上げます。

文　献

1）West NJ, Clark SK, Phillips RK, Hutchinson JM, Leicester RJ, Belluzzi A, Hull MA. Eicosapentaenoic acid reduces rectal polyp number and size in familial adenomatous polyposis. Gut. 2010;59(7):918-25. PMID:20348368

2）Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer.Gut. 2012;61(1):135-49. PMID:21490374

3）Oh DY[1], Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects.Cell 2010;142(5):687-98. PMID:20813258

4）Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K, Ohta Y, Toshimitsu K, Nakazato Y, Kawasaki K, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, Sato T. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. Cell Stem Cell. 2016;18(6):827-38. PMID:27212702

5）Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, Choquet H, Besnard P, Lecoeur C, Vivequin S, Ayukawa K, Takeuchi M, Ozawa K, Tauber M, Maffeis C, Morandi A, Buzzetti R, Elliott P, Pouta A, Jarvelin MR, Körner A, Kiess W, Pigeyre M, Caiazzo R, Van Hul W, Van Gaal L, Horber F, Balkau B, Lévy-Marchal C, Rouskas K, Kouvatsi A, Hebebrand J, Hinney A, Scherag A, Pattou F, Meyre D, Koshimizu TA, Wolowczuk I, Tsujimoto G, Froguel P. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. Nature. 2012 19;483(7389):350-4. PMID:22343897