

2003/399

厚生労働科学研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

発がんの高危険度群を対象としたがん予防に関する基礎及び臨床研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 若林 敬二

平成 16 (2004) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

発がんの高危険度群を対象としたがん予防 に関する基礎及び臨床研究 若林敬二	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 大腸発がん抑制物質の検索と作用機序 の解析 若林敬二	1 4
2. ラクトフェリンの発がん抑制作用の 検討と作用機序の解明 津田洋幸	1 6
3. 前立腺がんの化学予防の実験的アプローチ 白井智之	2 3
4. 口腔及び食道発がん抑制物質の検索 田中卓二	2 6
5. 肺および膵臓発がん抑制物質の検索 堤 雅弘	3 2
6. ラクトフェリン含有食品のC型慢性肝炎 に対する臨床試験 奥坂拓志	3 5

7. <i>H. pylori</i> 感染の早期発見とその除菌による 胃がんの予防 後藤田卓志	40
8. 大腸ポリープの予防に関する研究 石川秀樹	43
9. 胃がん高危険度群の発がん予防を目的 としたフィールド・トライアル 笹月静	48
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV. 研究成果の刊行物・別刷	65

厚生労働科学研究費補助金（がん予防健康科学総合）
総括研究報告書
発がんの高危険度群を対象としたがん予防に関する基礎及び臨床研究
主任研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所副所長

研究要旨 本研究は、がんのハイリスクグループの発がん要因を把握するとともに、食品素材及び医薬品を対象としたがん予防剤、がん予防方法を開発し、臨床への応用を目指すことを目的としている。本年度の研究成果としては、Apc 遺伝子欠損マウスにおいて認められる経時的な血清脂質の上昇が、Peroxisome proliferator-activated receptor γ リガンド投与により改善されるとともに腸ポリープ形成が抑制されることがわかった。ラクトフェリン(LF)は血管内皮細胞の機能（増殖、管腔形成）を抑制すると共に小腸上皮細胞やマクロファージ等の細胞で IL-18 を産生し、腫瘍血管新生を阻害することを明らかにした。PhIP 誘発ラット前立腺発がんモデルにおける大豆イソフラボン抽出物の混餌投与は腹葉前立腺がんの発生率を低下させ、前立腺組織における遺伝子発現を変化させた。Prostaglandin E₂ receptor EP₁ の選択的阻害剤 ONO-8711 は、混餌投与によりラット舌がん発生を有意に抑制した。サメ軟骨水抽出物 (SCE) は、TIMP-1 および 2 以外の内因性 MMPs 阻害物質による MMPs 阻害を介してハムスター膝発がんを抑制することが示唆された。LF が C 型慢性肝炎患者の C 型肝炎ウイルスの RNA 量を減少させるかを調べるため、ランダム化二重マスク化プラセボコントロール試験を計画した。患者登録数は現在、2001 年 5 月の開始から 194 例が登録されている。H. pylori の除菌による胃前がん状態変化に及ぼす介入試験は、最終的に除菌群 366 例、非除菌群 338 例が登録され、現在経過観察中である。多発性大腸腺腫症患者の大腸腫瘍発生に対して小麦ふすまビスケットは促進効果、乳酸菌製剤は抑制効果を示すことが示唆された。胃がん高危険度群を対象としたビタミン C および β -カロテンによる胃がん予防のための無作為化比較試験において、酸化ストレスの指標の測定を完了した。ビタミン C (500 mg/日) 投与群は、風邪の発症率の減少と関連していた。また、胃がんの食事関連危険因子の軽減をめざした食事介入研究では、介入終了後 3-4 年経過しても介入の効果が持続していた。

分担研究者

若林敬二	国立がんセンター研究所	副所長
津田洋幸	名古屋市立大学大学院	教授
白井智之	名古屋市立大学	教授
田中卓二	金沢医科大学	教授
堤 雅弘	奈良県立医科大学	講師
奥坂拓志	国立がんセンター中央病院	医長
後藤田卓志	国立がんセンター中央病院	医員
石川秀樹	兵庫医科大学家族性腫瘍部門	助手
笹月 静	国立がんセンター研究所	研究員

A. 研究目的

がんは、1981 年以来、我が国において死亡原因の第 1 位を占め、今後もさらに増え続けるものと予測される。このようながんの増加を抑制することは極めて重要である。本研究においては食品素材及び医薬品を対象として新規がん予防剤を検索、開発する基礎研究を行うとともに、発がんの高危険度群と考えられる人々を対象とした臨床研究を行うことにより、安全性の高い有効ながん予防方法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

(1)大腸発がん抑制物質の検索と作用機序の解析

本年度は、高脂血症改善薬である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) リガンドによる腸管ポリープ形成抑制効果と血清脂質への影響について検討した。PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾン家族性大腸腺腫症のモデルである APC¹³⁰⁹ または Min マウスに 100, 200, 400 及び 1600 ppm の濃度で 14 週間混餌投与し、各々のマウスにおける小腸及び大腸ポリープの発生状況(腸の腺腫数及び大きさ)と血清中トリグリセリド (TG) 及び総コレステロール (TC)量を測定し、PPAR γ リガンドの効果を野生型マウスと比較検討した。更に野生型と両 Apc 遺伝子欠損マウスの肝臓における Lipoprotein lipase (LPL)の発現解析を RT-PCR 法で行った。

(2)ラクトフェリン(bLF)の発がん抑制作用の検討と作用機序の解明

発がん剤 AOM 投与後に LF を摂取させたラットの大腸標本作製、アポトーシス関連遺伝子の検出を試みた。また、マウスに LF および LFH を経口投与した血清、小腸、大腸組織および粘膜を採取した。腸粘

膜から AGPC 法にて RNA を抽出、RT-PCR により各種 mRNA を、蛋白は Western blot により定量した。LF による遺伝子変化をみるために、腫瘍細胞にヒト LF gene をトランスフェクトし DNA array により、その影響を検討した。血管新生阻害に関しては、マウスを用いた DAS 法および血管内皮細胞に対しての効果で検討した。

(3)前立腺発がん抑制物質の検索

F344雄ラットに PhIP 200 mg/kg を週 2 回、10 週間強制経口投与後 2 群に分け、一群は大豆フリー食を与え、他群はこれに大豆胚芽由来の混合イソフラボン抽出物であるフジフラボン P40 (フジッコ) を 0.25% 混餌投与し、60 週間後に屠殺剖検して前立腺の病理組織学的検討を行った。また、大豆フリー食、フジフラボン食各々を 2 週間与えたラットのの前立腺組織から RNA を抽出し cDNA アレイで遺伝子発現の差異を検討し定量的 RT-PCR で発現変化を確認した。

(4)口腔発がん抑制物質の検索

雄性 F344 ラット 62 匹を使用した 32 週間の動物実験を行った。舌腫瘍は、20 ppm の 4-NQO を 2 週間、25 ppm の 4-NQO を 2 週間、次いで 30 ppm の 4-NQO を 4 週間、飲水投与して誘発した。ONO-8711 は 400 ppm、800 ppm の用量で、4-NQO 投与終了後 1 週より 23 週間、混餌投与した。別に、800 ppm ONO-8711 のみの群、無処置対照群を設けた。実験終了時に屠殺後、剖検し、舌を含む全臓器の病理組織学的解析と非病変部の舌扁平上皮における細胞増殖活性 (BrdU 標識率) を行なった。

(5)膵臓発がん抑制物質の検索

ハムスター短期膵臓発生系に従い実験開始 50 日目よりサメ軟骨水抽出物(SCE)を 0.4%の濃度で基礎飼料に混じり 50 日間投与し、血清および膵臓組織を採取した。血清および膵臓組織における MMP-2、MMP-9 およびその他 MMPs 活性の阻害物質を検索した。また、その血清の MMP-2 および MMP-9 活性阻害率を計測した。

(6)ラクトフェリン(LF)含有食品の C 型慢性肝炎に対する効果

C 型慢性肝炎患者を LF 群(1.8 g/日)と placebo 群に無作為化割り付けする。LF 群では LF 摂取 12 週後の時点で、HCV RNA 量または GPT 値の 50%以上の減少が認められた場合、LF をさらに 1 年間摂取する。主要評価項目は LF 摂取 12 週後の時点でのウイルス学的効果(HCV RNA 量の 50%以上の減少)である。

本試験は当初 7 施設で 2003 年 3 月末までの約 2 年間に 250 例の患者登録を予定していたが、2003 年 3 月末の時点で集積が不十分であったため、試験期間を 1 年間延期し、さらに 4 施設を新たに追加して登録の拡大を図った。

(7)ヘリコバクター・ピロリの除菌による胃前がん状態

の変化

胃の限局性病変を有さない 20-59 歳の *H. pylori* 感染者に、*H. pylori* 除菌群および非除菌群の無作為割付を施行し、各群における胃粘膜萎縮の発生および進展を比較検討する。除菌には Lansoprazole (常用量、7 日間：経口)、Clarithromycin(常用量、7 日間：経口)、Amoxicillin(常用量、7 日間：経口)の三剤併用経口療法を用いる。6 カ月後の培養法にて除菌不成功の場合には、同療法 14 日間投与を施行し、さらに不成功の場合には他剤(Plaubenolol、Ecbeto-Na、Sofalcon 等)の併用による治療を試みる。ただし、いかなる治療法においても除菌治療は 1 年の間に 2 回以内の施行とする。

(8)大腸ポリープの予防

対象は家族性大腸腺腫症患者である。参加者を以下の 2 群に分けた。A 群は食生活指導+緑茶抽出物 (GTE 錠)、B 群は食生活指導+乳糖錠 (NF 錠) である。緑茶抽出物(GTE 錠)は 1 日に緑茶抽出物約 1 g (959.4 mg)であり、この量は、日本茶として約 10 杯に相当する。乳糖錠(NF 錠)は乳糖を主体とした緑茶抽出物と外見上見分けのつかない錠剤である。これらを 2 年間投与する。主エンドポイントは肛門縁から 20 cm の範囲における大腸腫瘍の 2 年間の増減である。

(9)胃がん高危険度群の発がん予防を目的としたフィールド・トライアル

実験 1：平成 7 年度より無作為に 2 群 (高用量群 (500 mg/日)・低用量群 (50 mg/日)) に分けてビタミン C を 5 年間投与し、胃がん罹患率あるいはバイオマーカーの評価を行う。

実験 2：参加者を無作為に 2 群に分類し、半数を前期指導群として 1 年目に調査結果に基づいた指導を行い、半数を後期指導群として 2 年目に指導を行う。食事習慣の変化を食事調査と生体指標で評価する。平成 15 年度に最終継続者を対象として追跡調査を実施する。

(倫理面への配慮)

人を対象とする研究はすべて厳密なインフォームド・コンセントを本人から得て、倫理委員会の承諾後に進めている。有害事象が生じて研究を中止する場合も本人に十分な説明をし、了解を得ている。また、動物実験は各研究者の所属施設の実験動物取り扱い (倫理) 規定を遵守して行っている。

C. 研究結果

(1)大腸発がん抑制物質の検索と作用機序の解析

12 週齢 APC^{J309} マウスの TG は 6 週齢時の 10 倍、TC は 2 倍高値を示した。また、Min マウスも同様に 8 週齢から 15 週齢までに高脂血症を呈することが明らかとなった。

次に、6 週齢 APC^{J309} マウスに 100、200 ppm ビオグリタゾンを 6 週間混餌投与した結果、TG、TC 量は

用量依存的に低下し、TG は対照群の 50% まで低下した。腸ポリープ数は非投与群の 67% にまで減少した。また、6 週齢雄 Min マウスにピオグリタゾンを 100-1600 ppm 投与すると、TG 量は用量依存的に減少し、1600 ppm 投与群で野生型マウスのレベルにまで低下した。腸ポリープ数は非投与群の 63% から 9% までに低下した。また、Apc 遺伝子欠損マウスにおいて減少していた肝臓の LPL の発現は、ピオグリタゾンの投与により野生型マウスのレベルにまで回復した。以上のことより、ピオグリタゾンは Apc 遺伝子欠損マウスの高脂血症を改善するとともに腸ポリープ形成を抑制することが明らかとなった。

(2) ラクトフェリンの発がん抑制作用の検討と作用機序の解明

1) 胎生 6 日齢の CAM における血管形成は、LF により著しく阻害された。その阻害効果は用量依存的であった。2) 3LL 細胞を用いた DAS 法で、LF の腹腔内投与および経口投与により著しい血管新生阻害が認められた。特に経口投与で強い阻害効果が確認できた。3) bFGF 処理 BPAE 細胞をマトリゲル上に置くと、管腔形成が始める。10⁻⁷ M 以上の濃度の LF により管腔形成は著しく阻害された。一方、bFGF で KOP.216 細胞を刺激すると、細胞は増殖を始める。しかし、LF の添加により濃度依存的に阻害された。さらに、VEGF でも同様な結果が得られた。マウス繊維芽細胞 A31 およびリス肺がん細胞では、抑制効果は認められなかった。4) LF の腹腔内投与では、血清 IL-18 濃度に変化はなかった。マクロファージ培養液に LF を添加することにより、経時的に IL-18 が産生された。

以上の結果から、LF は血管内皮細胞の管腔形成や増殖の抑制、IL-18 の産生増加を介して腫瘍血管新生を阻害すると考えられた。

(3) 前立腺発がん抑制物質の検索

最終体重、相対臓器重量はイソフラボン投与による有意な影響を受けなかった。腹葉前立腺がんの発生率は大豆フリー群で 62.5%、イソフラボン群で 21.4% と後者で有意な低下を認めた。前がん病変とされる PIN の発生率は両群で差がなかった。イソフラボン群では大豆フリー群より PIN の病巣数が有意に多かったが PIN とがんの合計病巣数は両群で同等であった。cDNA アレイ解析ではイソフラボン投与により、ornithine decarboxylase (ODC)、prothymosin alpha (PTA) の遺伝子発現低下 (それぞれ 0.52 倍、0.36 倍) が前立腺腹葉において特異的に認められた。血清テストステロン、性腺刺激ホルモンのレベルはイソフラボン投与により有意な変化は認められなかった。

(4) 口腔発がん抑制物質の検索

実験終了時における舌扁平上皮がんの平均発生頻度・発生個数は 4-NQO 群: 16/25 (64%)・0.88±0.88、4-NQO→400 ppm ONO-1711 群: 5/17 (29%)・0.35±0.61、4-NQO→800 ppm ONO-8711 群: 5/17 (29%)・0.29±0.47 であり、4-NQO→400 ppm

ONO-8711 群、4-NQO→800 ppm ONO-8711 群のいずれにおいても舌扁平上皮がんの発生頻度と発生個数が有意 (P<0.05) に減少していた。しかし、明らかな用量相関は認められなかった。舌前がん性病変 (高度異形成) の平均発生頻度と発生個数は、4-NQO 群: 20/275 (80%)・0.92±0.64、4-NQO→400 ppm ONO-8711 群: 6/17 (35%)・0.35±0.49、4-NQO→800 ppm ONO-8711 群: 4/17 (24%)・0.24±0.44 と、4-NQO→400 ppm ONO-8711 群、4-NQO→800 ppm ONO-8711 群のいずれにおいても有意 (P<0.05) に減少していた。非病変部舌扁平上皮における BrdU 標識率は、4-NQO 群: 10.33±2.36% (n=25)、4-NQO→400 ppm ONO-8711 群: 7.52±2.82% (n=17)、4-NQO→800 ppm ONO-8711 群: 8.81±2.99% (n=17)、ONO-8711 群: 5.07±1.63% (n=12)、無処置対照群: 4.82±1.88% (n=11) と 4-NQO 群は無処置対照群に比べ有意 (P<0.05) に高く、4-NQO→400 ppm ONO-8711 群では 4-NQO 群に比べ有意 (P<0.05) な低下を認めた。実験期間中、ONO-8711 投与による毒性を示唆する臨床徴候はみられず、病理組織学的にも主要臓器に毒性所見は認められなかった。

(5) 膵臓発がん抑制物質の検索

ハムスターにおいて、0.4% SCE 投与群では基礎食投与群に比較し動物 1 匹あたりの膵がん発生個数は有意に減少した。膵がん組織において MMP-2 および MMP-9 の発現と活性化がみられた。SCE 投与により Tissue inhibitor of MMPs (TIMP)-1 および TIMP-2 の発現量に差異はみられなかった。一方、SCE を投与した動物の血清中に MMP-9 阻害活性が認められた。

(6) ラクトフェリン含有食品の C 型慢性肝炎に対する効果

2001 年 5 月より患者登録を開始し、2004 年 3 月現在、194 例が登録されている。また、最初の 125 症例の患者調査票を各施設から回収しており、その結果を基に中間解析が現在行われている。

(7) ヘリコバクター・ピロリの除菌による胃前がん状態の変化

2001 年 2 月 8 日 751 例をもって参加登録を終了し、適格例は除菌群 336 例、非除菌群 328 例の計 664 例である。性別では男性 369 例、女性 293 例 (男女比=1.26) で、年齢別では壮年層 (40-59 歳) 552 例、若年層 (20-39 歳) 110 例 (若年・壮年比=5.02) である。一方、参加登録 751 例中 87 例が脱落し、脱落率は 11.6% である。脱落理由別では、検査の苦痛 18 と最も多く、次いで例割付不満が 17 例、検査料の自己負担に不満 11 例、転勤・転居 10 例、多忙 6 例などの順で、この他、結婚・出産、薬剤による副作用、除菌失敗が各 3 例、また当初の研究目的の変更に不満が 1 例である。

(8) 大腸ポリープの予防

2000 年 8 月より参加呼びかけ開始、予備登録では

185 人が参加し、これまでに 83 人が試験食品の服用を開始した。現在、投与試験は順調に進捗している。参加時に実施した乳酸上昇閾値から計算した最大酸素摂取量と大腸腫瘍の関係を断面調査として検討したところ、最大酸素摂取量と大腸腫瘍径、発がん率は負の相関を持つことを見いだした。

(9)胃がん高危険度群の発がん予防を目的としたフィールド・トライアル

実験 1: 本年度は疾病(がん、循環器疾患)発症登録を継続して実施するとともに、酸化ストレスの指標である Total Antioxidant Status、CoQ-10、D-ROM の測定を完了した。ビタミン C 剤の服用と血清脂質および風邪の罹患との関連について検討した。ビタミン C は高 TG 血症の女性を除いて血清の脂質レベルと関連がみられなかった。ビタミン C は風邪の期間や重症度とは関連がみられなかったが、風邪の発症率の減少と関連していた。3 回以上風邪に罹患するリスクは低用量群を基準とすると高用量群で 0.29 (95% CI: 0.10-0.80)であった。

実験 2: 平成 12 年度に全調査を終了し(最終継続者は 502 人)、平成 15 年度は最終継続者の一部に食事調査による追跡調査を実施した。308 人の対象者のうち 282 人より回答を得た。指導目標としていたナトリウム、ビタミン C、カロテンの摂取量について介入終了直後と本年度の結果を比較すると、変化量はわずかで有意な差は認められなかった ($p=0.36-0.48$)。また、介入前の結果との比較では有意な差が認められた ($p<0.01$)。

D. 考察

(1)大腸発がん抑制物質の検索と作用機序の解析

大腸発がんのリスクは高脂肪食の摂取により増加し、血清 TG 値または TC 値との間に相関性の認められることが疫学調査により示唆されている。また、PPAR γ リガンドはインスリン抵抗性改善作用及び血清脂質低下作用を有するとともに、各種がん細胞の増殖を抑制し分化を誘導することが知られている。

我々は、2 種類の Apc 遺伝子欠損マウスの血清脂質、特に血清中 TG が経時的に急激に上昇することを見出した。更に、PPAR γ リガンドは Apc 遺伝子欠損マウスの高脂血症を改善するとともに腸ポリープ形成を抑制することを見出した。肝臓における LPL の発現抑制が高脂血症の原因の 1 つであると考えられるが、PPAR γ が直接 LPL の発現調節に関わることを考えると PPAR γ リガンドによる LPL の誘導促進が TC や TG の低下に関わっていると考えられた。また、2 種類の Apc 遺伝子欠損マウスにおけるポリープ生成や血清脂質値の違いが Apc 遺伝子上の変異部位による違いを表わしているのならば、Apc 遺伝子はポリープ生成のみならず、血清脂質代謝にも積極的に関与している可能性が考えられる。血清脂質とポリープ生成との相互関係を明らかにすることで、より詳細な大腸発がんの機序や大腸発がん予防方策が得られるものと考えられる。

(2)ラクトフェリンの発がん抑制作用の検討と作用機序の解明

本研究では、LF が CAM 法、マウスでの DAS 法等で、強い血管新生阻害作用を示すことが明らかになった。また LF が IL-18 の産生を増加させることも明らかにした。CAM 法に用いられる 4-6 日の受精卵では免疫応答が不全であることから、血管新生阻害作用は血管内皮細胞に直接作用した結果と考えられ、さらに *in vitro* で血管内皮細胞の増殖や管腔形成の阻害が認められたことから、LF が直接内皮細胞に作用したことが裏付けられた。一方、LF の阻害作用は CAM 法で血管新生因子 bFGF を添加すると減弱することから、bFGF を介する血管新生の過程を阻害することが示唆された。マウス腹腔内から得たマクロファージによっても IL-18 の産生は濃度依存的経時的に増加した。LF によってマクロファージや他の細胞から産生された IL-18 は免疫応答や内皮細胞への直接作用によって血管新生の阻害に貢献していると推察される。

(3)前立腺発がん抑制物質の検索

PhIP を用いた前立腺発がんモデルはヒトの疫学的背景と照らし合わせるとより適切なモデルと考えられる。イソフラボンはエストロゲン受容体との親和性を示すことから抗男性ホルモン効果が前立腺がん抑制作用の機序のひとつとして示唆されている。しかしながら、今回の検討では比較的高用量のイソフラボンを投与しているにもかかわらず男性ホルモンへの影響は認められず抗アンドロゲン作用の関与は否定的であった。組織学的検討から、がんと PIN の総数が同等にも関わらず、イソフラボン投与群ではがん病巣の比率が低いことからイソフラボンが PIN からがんへの進展を抑制する可能性が示唆された。また、cDNA アレイ解析により前立腺で発現低下の認められた ODC、PTA についてはいずれもがんにおける発現と悪性度の間に正の相関があることが報告されている。従って、これらの事象がイソフラボンの前立腺発がん抑制に関与している可能性が示唆された。

(4)口腔発がん抑制物質の検索

大腸や乳腺発がんと同様に EP $_1$ 選択的阻害剤 ONO-8711 はラット舌発がんを効果的に抑制することが明らかとなった。今回の実験で用いた ONO-8711 の用量は、大腸や乳腺での実験の場合と同じ量を用いた。ONO-8711 による大腸・乳腺発がん抑制では、用量相関がみられているが、今回の舌発がん抑制には明らかな用量相関は認められなかった。ONO-8711 によるラット舌発がん抑制の機構の 1 つとして、細胞増殖活性の修飾が考えられる。今後、COX-2、iNOS 発現、apoptosis、EP $_{1-4}$ 発現への影響を検討し、その詳細なメカニズムにつき検討する必要がある。

(5)膵臓発がん抑制物質の検索

SCE の膵臓発がん抑制作用は、MMPs の活性を阻害することによることが示唆された。この阻害作用は、MMP-2 および MMP-9 発現や活性化を阻害するもの

ではなく、また、TIMP-1 および TIMP-2 を介するものでもないことが示された。SCE はプロテオグリカンやコラーゲンを主とする生体高分子化合物の複合体であり、吸収されたものがどのような形に代謝されるか、どのような機序で MMPs を阻害するかについては、今後の検討が必要である。また、MMPs 阻害活性の検索は SCE の有効性を判定するためのバイオマーカーとして利用しうることが推測される。

(6)ラクトフェリン含有食品の C 型慢性肝炎に対する効果

HCV の持続感染は慢性肝炎など慢性肝疾患の主たる原因であり、我が国では慢性肝疾患の 70%以上が抗 HCV 抗体陽性である。また慢性肝疾患は経過観察中に高率に肝細胞がんを合併するため、HCV に対する有効な抗ウイルス剤の開発は慢性肝疾患の原因療法として、さらには肝細胞がんの予防法として切望されている。

これまでに行った C 型慢性肝炎患者を対象とした用量反応試験では、GPT 値と LF 摂取量との間に用量反応関係は認めなかったが、LF(1.8-7.2g/日)の摂取により、HCV RNA 量は 45 例中 9 例(20%)、GPT 値は 6 例(13%)で 50% 以上の減少がみられた。以上の成績に基づき、LF が C 型慢性肝炎患者の HCV RNA 量を減少させるかを調べるため、ランダム化二重マスク化プラセボコントロール試験を計画、2001 年 5 月より患者登録を開始し、2004 年 3 月現在、194 例が登録されている。現在行われている 125 症例の中間解析の結果、予定していた 250 症例まで集積することが決定した場合は、研究期間の延長とともに、参加施設の拡大を検討する。

(7)ヘリコバクター・ピロリの除菌による胃前がん状態の変化

近年、同一国内においても地域差により *H. pylori* 感染率と胃癌発生率は相関しないとする疫学的観察研究報告が相次いでおり、胃癌における *H. pylori* 感染、環境因子、宿主因子の相互作用が重要視されている。臨床研究において、早期胃癌の内視鏡的切除後の除菌による異時性胃癌の発生抑制、胃前がん状態とされる萎縮性胃炎、腸上皮化生、腺腫の除菌後の改善などの報告があるが、相反する報告も多く、consensus は得られていない。一方、除菌後の胃食道逆流症(GERD)の発生、さらに食道腺がん・胃噴門部がんの増加が危惧されている。従って、現時点では胃癌予防のために全感染者を除菌することは説得力に欠けると言わざるを得ず、本研究の成果が待たれるところである。

(8)大腸ポリープの予防

家族性大腸腺腫症に対する予防試験は、順調に参加募集が進んでおり、2005 年には家族性大腸腺腫症患者に対する緑茶抽出物の影響の評価ができると考えられる。

体力と大腸ポリープの関係の知見は、体力が大腸腺腫の発生に影響を与えることを見いだした初めての

報告である。疫学的研究において、身体活動が大腸がんを予防する可能性が示唆されているが、それを裏付ける結果と考えられる。

(9)胃がん高危険度群の発がん予防を目的としたフィールド・トライアル

実験 1：風邪とビタミン C との関連についての先行研究に比べて本研究は服用期間が長く、季節変動や年による風邪ウイルスの違いなどの問題もクリアできており、風邪とビタミン C との関連について正確に検証できている可能性がある。

実験 2：追跡調査の実施および結果の解析により、介入終了から 3-4 年後も指導の効果が維持されていることが示唆された。食塩や野菜・果物摂取量に絞った簡易スクリーニング調査票を作成し、より大規模な集団に対して実行可能な簡便で効果的な食事指導システムを開発する必要がある。

E. 結論

Apc 遺伝子欠損マウスにおいて腸管ポリープ形成と並行して血清脂質が上昇することを初めて報告した。さらに、PPAR γ アゴニストがポリープ形成と血清脂質値の両方を抑制し、高脂血症改善薬を用いるがん予防方法が可能であると考えられた。また、食の欧米化にともなって、大腸がん及び高脂血症患者が増加している事を考えると、従来報告されていた高脂血症と大腸がんとの関連性について今後さらに詳細な機序の解明が必要である。

LF が CAM 法、マウスでの DAS 法において強い血管新生阻害作用を示すことが明らかになった。ラクトフェリンは血管内皮細胞の機能(増殖、管腔形成)を抑制すると共に小腸上皮細胞やマクロファージ等の細胞で IL-18 を産生し、腫瘍血管新生を阻害することが示唆された。以上の結果から、LF の抗腫瘍作用は血管新生の阻害が関与していることが明らかになった。

加熱食肉由来の発がん物質である PhIP によるラット前立腺発がんに対し混合イソフラボン抽出物であるフジフラボンを投与したところ腹葉前立腺におけるがんの発生率及び腫瘍性病変の病巣数に占めるがんの割合が有意に減少した。また cDNA アレイによる解析ではがんに対して促進的に作用すると考えられる ODC、PTA が前立腺特異的に発現低下を示した。これらの結果から、大豆イソフラボンは前立腺発がんにおいて PIN からがんへの進展を抑制することが考えられた。よって大豆イソフラボンの摂取がヒト前立腺がんの予防において有用であることが期待される。

PGE₂ receptor EP₁ の選択的阻害剤 ONO-8711 をラットにおいて舌発がん物質 4-NQO 投与後に混餌投与すると、毒性作用を示さず効果的に舌発がん抑制作用を示すことが判明した。その抑制機構として、現在のところ initiate された舌扁平上皮細胞増殖活性の修飾作用が考えられるが、今後詳細な検討が必要である。

サメ軟骨から水およびエタノールを用いて MMPs

阻害作用を有する分画(SCE)を抽出することに成功した。SCE はハムスターに経口投与すると機序は不明であるが、血清のMMP-9阻害活性を上昇させ、膵癌がんを抑制することが示唆された。また、SCE 投与期間中ハムスターにおいて毒性作用は検出されなかった。これらの結果より、SCE は膵がん患者にも適用しうる可能性が示唆された。

LF が C 型慢性肝炎患者の HCV RNA 量を減少させるかを調べるため、ランダム化二重マスク化プラセボコントロール試験を計画。2001 年 5 月より患者登録を開始し、2004 年 3 月現在、194 例が登録されている。今後、研究期間の延長および参加施設の拡大にて目標の 250 症例を集積する予定である。

本研究においては、ヒトにおける胃がん発生と *H. pylori* 感染の因果関係については決着がつけられないが、萎縮性胃炎、腸上皮化生などの前がん状態の進展と *H. pylori* 感染との関連性については明確になるものと考えられる。本研究の経過観察期間は 2004 年 3 月までであるが、この間脱落例を阻止し慎重に経過観察する予定である。

多発性大腸腺腫患者において、食物繊維の投与により大腸腫瘍が増大すること、乳酸菌の投与により、異型の強い腺腫の発生が抑制出来る事を見いだした。また、家族性大腸腺腫症患者において体力が大腸腺腫の増大を抑制することを見いだした。これらの所見は大腸がん予防のための情報として有用と考えられる。

胃がん高危険度群を対象としたビタミン C および β -カロテンによる胃がん予防のための無作為化比較試験において、酸化ストレスの指標の測定を完了した。その結果、ビタミン C 投与は風邪の発症率の減少と関連していることがわかった。また、胃がんの食事関連危険因子の軽減をめざした食事介入試験では、介入終了後 3-4 年経過しても介入の効果が持続していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究論文

1. 論文発表

- 1) Niho, N., Takahashi, M., Kitamura, T., Shoji, Y., Itoh, M., Noda, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in *Apc*-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res.*, 63: 6090-6095 (2003).
- 2) Niho, N., Takahashi, M., Shoji, Y., Takeuchi, Y., Matsubara, S., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a PPAR γ ligand. *Cancer Sci.*, 94: 960-964 (2003).
- 3) Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T.,

Wakabayashi, K. Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E₂ administration. *Carcinogenesis*, 24: 985-990 (2003).

- 4) Kitamura, T., Itoh, M., Noda, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., Ohuchida, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Combined effects of prostaglandin E receptor subtype EP₁ and subtype EP₄ antagonists on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice. *Cancer Sci.*, 94: 618-621 (2003).
- 5) Tanaka, T., Kohno, H., Nomura, E., Taniguchi, H., Tsuno, T. and Tsuda, H. A novel geranylated derivative, ethyl 3-(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-propenoate, synthesized from ferulic acid suppresses carcinogenesis and inducible nitric oxide synthase in rat tongue. *Oncology*, 64: 166-175 (2003).
- 6) Moore, M. A., Tajima, K. and Tsuda, H. Epidemiology of the major cancers in the Asian Pacific. *Proc. Jpn. Acad.*, 79: 27-33 (2003).
- 7) Fukushima, S., Moore, M.A. and Tsuda, H. Appropriate models and an understanding of carcinogenic mechanisms-requirements for hazard risk assessment. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4: 75-78 (2003).
- 8) Moore, M.A., Kunimoto, T., and Tsuda, H. Cancer screening literature in the period 2000-2002: Pointers to future research avenues. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4: 57-60 (2003).
- 9) Tsuda, H., Naito, A., Kim, C.K., Fukamachi, K., Nomoto, H. and Moore, M.A. Carcinogenesis and its modification by environmental endocrine disruptors: *In vivo* experimental and epidemiological findings. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 33: 259-270 (2003).
- 10) Matsuoka, Y., Fukamachi, K., Hamaguchi, T., Toriyama-Baba, H., Kawaguchi, H., Kusunoki, M., Yoshida H., and Tsuda, H. Rapid emergence of mammary preneoplastic and malignant lesions in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats: possible application for screening of chemopreventive agents. *Toxicol. Pathol.*, 31: 632-637 (2003).
- 11) Goldberg, G.S., Alexander, D.B., Pellicena, P., Zhang, Z-Y., Tsuda, H. and Miller, W.T. Src phosphorylates cas on tyrosine 253 to promote migration of transformed cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 46533-46540 (2003).
- 12) Iigo, M., Shimamura, M., Matsuda, E., Fujita, K., Nomoto, H., Satoh, J., Kojima, S., Alexander, D.B., Moore, M.A. and Tsuda, H.

- Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Cytokine*, 25: 36-44 (2004).
- 13) Hamaguchi, T., Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ueda, S., Shimizu, K., Ohki, M., Kusunoki, M., Sakakura, T., Yoshida, H. and Tsuda, H. Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human *c-Ha-ras* protooncogene transgenic rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 83: 43-56 (2004).
 - 14) Park, C.B., Fukamachi, K., Takasuka, N., Han, B.S., Kim, C.K., Hamaguchi, T., Fujita, K., Ueda, S. and Tsuda, H. Rapid induction of skin and mammary tumors in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats by treatment with 7,12-dimethylbenz [a] anthracene followed by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Sci.*, (inpress).
 - 15) Shimamura, M., Yamamoto, Y., Ashino, H., Oikawa, T., Hazato, T., Tsuda, H. and Iigo, M. Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, (in press).
 - 16) Alexander, D.B., Ichikawa, H., Bechberger, J.F., Valiunas, V., Ohki, M., Naus, C.C.G., Kunimoto, T., Tsuda, H., Miller, W.T. and Goldberg, G.S. Normal cells control the growth of neighboring transformed cells independent of gap junctional communication and *src* activity. *Cancer Res.*, (in press).
 - 17) Cho, Y.-M., Takahashi, S., Asamoto, M., Suzuki, S., Inaguma, S., Hokaiwado, N. and Shirai, T. Age-dependent histopathological findings in the prostate of probasin/SV40 T antigen transgenic rats: Lack of influence of carcinogen or testosterone treatment. *Cancer Sci.*, 94: 153-157 (2003).
 - 18) Takeshita, F., Ogawa, K., Asamoto, M. and Shirai, T. Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Lett.*, 194: 25-35 (2003).
 - 19) Cheng, J.-L., Futakuchi, M., Ogawa, K., Iwata, T., Kasai, M., Tokudome, S., Hirose, M. and Shirai, T. Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 196: 161-168 (2003).
 - 20) Ichihara, T., Yoshino, H., Imai, N., Tsutsumi, T., Kawabe, M., Tamano, S., Inaguma, S., Suzuki, S. and Shirai, T. Lack of carcinogenic risk in the prostate with transplacental and lactational exposure to bisphenol A in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 28: 165-171 (2003).
 - 21) Inaguma, S., Takahashi, S., Ohnishi, H., Suzuki, S., Cho, Y.-M. and Shirai, T. High susceptibility of the ACI and spontaneously hypertensive rat (SHR) strains to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) prostate carcinogenesis. *Cancer Sci.*, 94: 974-979 (2003).
 - 22) Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Shirai, T., Nakae, D., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A. Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 16: 259-266 (2003).
 - 23) Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.-M., Tsuda, H. and Shirai, T. Lack of effect of human *c-Ha-ras* proto-oncogene overexpression on prostate carcinogenesis in *probasin/SV40 T antigen* transgenic rats. *Cancer Sci.*, 94: 1042-1045 (2003).
 - 24) Hikosaka, A., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Kato, K., Kuzutani, K., Kohri, K. and Shirai, T. Inhibitory effects of soy isoflavones on rat prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, 25: 381-387 (2004).
 - 25) Yoshida, K., Tanaka, T., Kohno, H., Yanaida, Y., Yamada, Y., Hirose, Y., Sugie, S., Kawamori, T., Wakabayashi, K. and Mori, H. A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically-induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression. *Histol. Histopathol.*, 18: 39-48 (2003).
 - 26) Tanaka, T., Kohno, H., Nomura, E., Taniguchi, H., Tsuno, T. and Tsuda, H. A novel geranylated derivative, ethyl 3(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-propenoate, synthesized from ferulic acid suppresses carcinogenesis and inducible nitric oxide synthase in rat tongue. *Oncology*, 64: 166-175 (2003).
 - 27) Yoshida, K., Hirose, Y., Tanaka, T., Yamada, Y., Kuno, T., Kohno, H., Katayama, M., Qiao, Z., Sakata, K., Sugie, S., Shibata, T. and Mori, H. Inhibitory effects of troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor γ

- ligand, in rat tongue carcinogenesis initiated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Sci.*, 94: 365-371 (2003).
- 28) Murakami, A., Hayashi, R., Tanaka, T., Kwon, K.H., Ohigashi, H. and Safitri, R. Suppression of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice by zerumbone, a subtropical ginger sesquiterpene, and nimesulide: separately and in combination. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 1253-1261 (2003).
- 29) Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T. and Mori, H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Lett.*, 199: 139-145 (2003).
- 30) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S. and Tanaka, T. Dietary protocatechuic acid during the progression phase exerts chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4: 319-326 (2003).
- 31) Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S. and Mori, H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, 94: 965-973 (2003).
- 32) Rahman, K.M.W., Sugie, S., Watanabe, T., Tanaka, T. and Mori, H. Chemopreventive effects of melatonin on diethylnitrosamine and Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Nutr. Cancer*, 47: 148-155 (2003).
- 33) 田中卓二. NSAIDsによる癌の化学予防. *医学のあゆみ*, 204: 105-111 (2003).
- 34) 田中卓二. 動物を用いた大腸がんの化学予防研究. *癌の臨床*, 49: 169-177 (2003).
- 35) Okusaka, T., Okada, S., Nakanishi, T., Fujiyama, S., and Kudo, Y. Phase II trial of intra-arterial chemotherapy using a novel lipophilic platinum derivative (SM-11355) in patients with hepatocellular carcinoma. *Invest New Drug*, 22: 169-176 (2003).
- 36) Okusaka, T., Matsumura, Y. and Aoki, K. New approach for pancreatic cancer in Japan. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2003 (in press).
- 37) Okusaka, T. and Kosuge, T. Systemic chemotherapy for pancreatic cancer (including gemcitabine). *Pancreas*, 28: 2003 (in press).
- 38) Morizane, C., Okada, S., Okusaka, T., Hideki, U., and Saisho, T. Phase II study of cisplatin, epirubicin, and continuous-infusion of 5-fluorouracil (5-FU) (CEF therapy) for advanced biliary tract cancer. *Oncology*, 64: 475-476 (2003).
- 39) Tokuyue, K., Sumi, M., Kagami, Y., Muramatsu, S., Ikeda, H., Ikeda, M., Okusaka, T., Ueno, H. and Okada, S. Small-field radiotherapy in combination with concomitant chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Radiother Oncol*, 67: 327-330 (2003).
- 40) 奥坂拓志. 肝がん・膵がん. *化学療法の領域* 19:140-146 (2003).
- 41) 奥坂拓志. 膵癌の化学療法. *肝胆膵* 46: 635-642 (2003).
- 42) 奥坂拓志. 化学療法. 特集: 肝細胞癌とどう戦うべきか. IV再発治療とその予防. *外科* 65: 925-931 (2003).
- 43) 奥坂拓志. 膵癌. 1.内科. *臨床腫瘍学* 第3版. 有吉 寛他編集. 癌と化学療法. 東京. pp707-716, 2003.
- 44) 奥坂拓志. 総論: 膵癌の化学療法の位置付け. *胆と膵* 24: 621-626 (2003).
- 45) 上野秀樹, 竹迫賀子, 奥坂拓志. 肝内胆管癌. *化学療法の現状*. *肝胆膵*, 46: 603-607 (2003).
- 46) 小菅智男, 島田和明, 佐野 力, 奥坂拓志, 上野秀樹, 池田公史. 膵癌の集学的治療—臨床試験による評価—. *肝胆膵*, 46: 761-766 (2003).
- 47) Tsujiuchi, T., Sasaki, Y., Kubozoe, T., Konishi, Y. and Tsutsumi, M. Alterations in the Fhit gene in pancreatic duct adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in hamsters. *Mol. Carcinogenesis*, 36: 60-66 (2003).
- 48) Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M. and Konishi, Y. Molecular aspects during multi-step chemical induced carcinogenesis in the lung and pancreas. *J. Toxicol Pathol.*, 16: 133-138 (2003).
- 49) 後藤田卓志, 佐野 武: 内視鏡的粘膜切除術(EMR)とは?. *医学のあゆみ*, 205: 661-666 (2003).
- 50) 濱中久尚, 後藤田卓志: 早期胃癌におけるEMRの現状. *病理と臨床*, 21:1086-1091 (2003).
- 51) 濱中久尚, 蓮池典明, 後藤田卓志: IT ナイフを用いたEMR. *消化器内視鏡*, 15: 1140-1145 (2003).
- 52) 小田一郎, 後藤田卓志, 蓮池典明, 他: 胃型分化型早期胃癌の内視鏡像. *胃と腸*, 38: 684-692 (2003).
- 53) Owen, R.J., Xerry, J., Gotoda, T., Naylor, G. and Tompkins, D. Analysis of geospecific markers for *Helicobacter pylori* variants in patients from Japan and Nigeria by triple locus nucleotide sequence typing. *Microbiology* (in press)
- 54) Soetikno, R., Gotoda, T. and Soehendra, N. Endoscopic mucosal resection. *Gastrointest. Endosc.*, 57: 567-579 (2003).
- 55) Eguchi, T., Gotoda, T., Oda, I., Hamanaka, H. Hasuike, N. and Saito, D. Is endoscopic one-piece mucosal resection essential for early

- gastric cancer? *Digestive Endoscopy*, 15: 113-116 (2003).
- 56) Kondo, H., Gotoda, T., Ono, H., Oda, I., Kozu, T., Fujishiro, M., Saito, D. and Yoshida, S. Percutaneous traction-assisted EMR by using an insulation-tipped electrosurgical knife for early stage gastric cancer. *Gastrointest Endosc.*, 58: 1-5 (2003).
- 57) Ishikawa, H., Akedo, I., Umesaki, Y., Tanaka, R., Imaoka, A. and Otani, T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J. Am. n College of Nutr.*, 22: 56-63 (2003).
- 58) Setoyama, H., Imaoka, A., Ishikawa, H. and Umesaki, Y. Prevention of Gut Inflammation by Bifidobacterium in Dextran Sulfate-Treated Gnotobiotic Mice associated with Bacteroides Strains Isolated from Ulcerative Colitis Patients. *Microbes and Infection*, 5: 115-122 (2003).
- 59) 石川秀樹. 癌予防の臨床試験における課題 - 食物繊維と大腸癌の関係を例に - . *医学のあゆみ*, 204: 95-100 (2003).
- 60) 石川秀樹. 大腸発癌予防のための臨床試験. *癌の臨床*, 49:179-183 (2003).
- 61) 松田賢一、宅見央子、大西律子、米谷俊、木村靖子、島田玲子、石川秀樹. 小麦ふすまおよび難消化性デキストリンを含有するビスケットの摂取がヒトの排便状況に及ぼす影響. *健康・栄養食品研究*, 6: 1-12 (2003).
- 62) 石川秀樹. 大腸癌とプロバイオティクス. *医学のあゆみ*, 207: 881-884 (2003).
- 63) Uedo, N., Ishikawa, H., Narahara, H., Akedo, I., Ioka, T., Kaji, I., Otani, T., Hukuda, S. and Morimoto, K. Reduction in salivary cortisol level by music therapy during colonoscopic examination. *Hepato-Gastroenterol.*, (in press).
- 64) Montani, A., Sasazuki, S., Inoue, M., Higuchi, K., Arakawa, T. and Tsugane, S. Food/Nutrient Intake and Risk of Atrophic Gastritis among the Helicobacter pylori-Infected Population of Northeastern Japan. *Cancer Sci.*, 94: 372-377 (2003).
- 65) Sasazuki, S., Sasaki, S., Tsubono, Y., Okubo, S., Hayashi, M. and Tsugane, S. The effect of 5-year vitamin C supplementation on serum pepsinogen level and Helicobacter pylori infection: a randomized controlled trial in high-risk area of gastric cancer in Japan. *Cancer Sci.*, 94: 378-382 (2003).
- 66) Kim, M.K., Sasazuki, S., Sasaki, S., Okubo, S., Hayashi, M. and Tsugane, S. Effect of 5-year oral supplementation of vitamin C on serum vitamin C concentration and consumption of vegetables and fruits: a randomized controlled trial. *J. Am. College Nutr.*, 22: 208-216 (2003).
- 67) Tsugane, S., Sasazuki, S., Kobayashi, M. and Sasaki, S. Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *Br J Cancer*, 90: 128-134 (2004).
- 68) Kim, M.K., Sasaki, S., Sasazuki, S., Okubo, S., Hayashi, M. and Tsugane, S. Long-term vitamin C supplementation has no markedly favorable effect on serum lipids in middle-aged Japanese subjects. *Br J Nutr.*, 91: 81-90 (2004).
- 69) Kim, M.K., Sasaki, S., Sasazuki, S. and Tsugane, S. Prospective study of three major dietary patterns and risk of gastric cancer in Japan. *Int J Cancer*, (in press).
- 70) Montani, A.M., Sasazuki, S., Inoue, M., Natsukawa, S., Shaura, K., Koizumi, Y., Kasuga, Y., Hanaoka, T. and Tsugane, S. Association of Helicobacter infection and environmental factors in non-cardia gastric cancer in Japan. *Gastric Cancer*, (in press).

2. 学会発表

- 1) 仁保直子、高橋真美、庄司 豊、杉村 隆、若林敬二、PPAR γ リガンドによる Apc 欠損マウスの腸ポリープ形成の抑制、第 10 回日本がん予防研究会、札幌、(2003 年 6 月)
- 2) 庄司 豊、渡部浩治、北村知宏、高橋真美、成宮周、杉村 隆、若林敬二、プロスタグランジン E2 受容体サブタイプ EP3 の AOM 誘発大腸発がんに及ぼす影響、第 10 回日本がん予防研究会、札幌、(2003 年 6 月)
- 3) 仁保直子、高橋真美、北村知宏、庄司 豊、野田哲生、杉村 隆、若林敬二、PPAR リガンドによる Apc 遺伝子欠損マウスの高脂血症改善および腸ポリープ形成抑制作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 4) 庄司 豊、高橋真美、渡部浩治、北村知宏、成宮周、杉村 隆、若林敬二、大腸発がんにおけるプロスタグランジン E2 受容体 EP4 の役割、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 5) 若林敬二、がん化学予防のための基礎研究、第 62 回日本癌学会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 6) 津田洋幸、がん遺伝子トランスジェニックラットを用いた発がん研究、第 9 2 回日本病理学会、福岡、(2003 年 4 月)
- 7) 高須賀信夫、津田洋幸、ヒトプロト型 C-Ha-ras トランスジェニックラットの乳腺発がんにおける nonylphenol, atrazine の修飾効果、第 9 2 回日本病理学会、福岡、(2003 年 4 月)
- 8) 松岡洋一郎、川口博明、濱口哲也、高須賀信夫、吉田緑、深町勝巳、吉田浩己、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラ

- ット乳腺の生物学的特性と発がん高感受性の関連、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
- 9) 大西隆仁、内藤暁宏、上田しのぶ、泉啓介、津田洋幸、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* transgenic rat(Tg)の乳腺発がんを指標とした環境発がん物質中期検索モデルの開発、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
 - 10) 上田しのぶ、内藤暁宏、津田洋幸、ヒト変異型 *c-Ha-ras* コンディショナル・トランスジェニックラットにおける発がん性の検討、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
 - 11) Tsuda, H., Iigo, M., Fujita, K., Sekine, K., Ohkubo, S., Takahashi, T., Nomoto, H. and Kunimoto, K., Alexander, D.B., Okada, S. and Kozu, T. Cancer chemoprevention by lactoferrin and analysis on the mechanisms. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)
 - 12) Iigo, M., Fujita, K., Shimamura, M., Yamamoto, F., Nomoto, H., Alexander, D.B., Sekine, K., Tamura, Y. and Tsuda, H. Induction of cytokines in the intestinal mucosa by oral administration of bovine lactoferrin-A possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis-. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)
 - 13) Fujita, K., Takahashi, T., Sekine, K., Tamura, Y., Iigo, M. and Tsuda, H. Lactoferrin enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand(trail)-induced apoptosis on human colon carcinoma cell lines. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)
 - 14) 藤田健一、高橋徹行、関根一則、飯郷正明、津田洋幸、ラクトフェリンによる AOM 投与ラット大腸における Bcl-2 関連遺伝子の発現変動、第10回日本がん予防研究会、札幌、(2003年6月)
 - 15) 野本博、飯郷正明、浜田博喜、大谷修一、小島周二、津田洋幸、プロアントシアニン類緑物質の AOM 誘発ラット大腸 ACF への修飾作用、第10回日本がん予防研究会、札幌、(2003年6月)
 - 16) 濱口哲也、松岡洋一郎、津田洋幸、ヒト正常型 *c-Ha-ras* 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析-Ras 情報伝達系活性化により乳腺上皮に何が起こるか、第22回分子病理学研究会、稲敷郡、(2003年7月)
 - 17) 松岡洋一郎、濱口哲也、川口博明、吉田浩己、津田洋幸、ヒト正常型 *c-Ha-ras* 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析-笹最終報 Ras 情報伝達系活性化により乳腺上皮に何が起こるか、第13回乳癌基礎研究会、鳥取、(2003年8月)
 - 18) 津田洋幸、天然成分の生理活性とがん予防-動物実験からヒトへ、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
 - 19) 飯郷正明、藤田健一、野本博、大久保重敏、関根一則、國元武彦、飯沼元、神津隆弘、奥坂拓志、岡田周市、津田洋幸、ウシラクトフェリンを用いた介入研究の基礎と応用、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
 - 20) 藤田健一、高橋徹行、松田栄治、飯郷正明、津田洋幸、ラクトフェリンによるヒト大腸がん細胞株における TRAIL 誘発細胞死増強作用、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
 - 21) 高須賀信夫、飯郷正明、Kim, C.K., 津田洋幸、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラット-Hras128-(Tg)の γ -線照射に対する乳腺発がん感受性について、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
 - 22) 濱口哲也、松岡洋一郎、川口博明、高須賀信夫、深町勝巳、吉田浩己、津田洋幸、ヒト正常型 *c-Ha-ras* 遺伝子トランスジェニックラット乳がんの発生母地について-化学発がんと自然発がんの比較-、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
 - 23) 松田栄治、飯郷正明、高須賀信夫、藤田健一、小島周二、矢澤一良、関根一則、津田洋幸、マウス大腸発がんに対するラクトフェリンと不飽和脂肪酸併用による抑制効果の検討、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
 - 24) Tsuda, H. Models for Assessment of Chemopreventive Agents Chemopreventive Agents Chemoprevention-Past, Present and Future. 7th Thai National Cancer Conference Satellite Symposium, Bangkok, (Nov. 2003)
 - 25) ニ口充、高橋育志郎、朝元誠人、白井智之、ラット前立腺癌骨浸潤モデルを用いた bisphosphonate の抑制効果、第92回日本病理学会総会、福岡、(2003年4月)
 - 26) 朝元誠人、外岩戸尚美、白井智之、がん予防物質による遺伝子発現変化、第10回日本がん予防研究会、北海道、(2003年6月)
 - 27) 白井智之、ラット前立腺癌モデルを用いてのイソフラボンによる化学予防、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)。
 - 28) 朝元誠人、外岩戸尚美、白井智之、2次元電気泳動法によるラット前立腺癌血清マーカーの同定、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
 - 29) 杉浦諭、小川久美子、ニ口充、彦坂敦也、高橋育志郎、加藤浩司、白井智之、Phenylethyl isothiocyanate (PEITC)のマウス膀胱発がんに対する影響、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
 - 30) 大西浩之、辻村和也、朝元誠人、白井智之、植

- 物由来各種がん抑制候補物質の肝発がん修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 31) Ohnishi, H., Tsujimura, K., Asamoto, M., Kuribayashi, M., Suzuki, S., Ogiso, T. and Shirai, T. Chemopreventive effects of plant derived compounds in a rat medium term liver bioassay and on hepatocellular carcinoma cell lines and gene expression analysis by a microarray. JSTP/IFSTP(IATP), Kobe, (Feb. 2004).
- 32) 甲野裕之、鈴木里加子、山口かずえ、米谷 俊、田中卓二、酵素処理 hesperidin (glycosyl hesperidin) の 4-nitroquinoline 1-oxide 誘発ラット舌発がん修飾効果、第 92 回日本病理学会総会、福岡市、(2003 年 4 月)
- 34) 田中卓二、がんの化学予防、第 92 回日本病理学会総会 ワークショップ WS-12-5、福岡市、(2003 年 4 月)
- 35) Tanaka, T., Yoshida, K., Kohno, H., Suzuki, R., Yamaguchi, K., Kawamori, T., Mori, H. and Wakabayashi, K., A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically-induced tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression. 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Minisymposium, Washington, D.C., (July 2003).
- 36) Kohno, H., Tanaka, T., Suzuki, R., Yamaguchi, K., Nomura, E., Taniguchi, H., Tsuno, T. and Tsuda, H., A novel geranylated derivative, ethyl 3(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-propenoate, synthesized from ferulic acid suppresses carcinogenesis and iNOS expression in rat tongue. 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Poster Discussion, Washington, D.C., (July 2003).
- 37) 田中卓二、食べ物と発癌、その予防、第 30 回日本電顕皮膚生物学会総会および学術集会、金沢市、(2003 年 9 月)
- 37) 田中卓二、動物モデルによる大腸発がん発生の予防、第 14 回日本消化器癌発生学会総会、金沢市、(2003 年 9 月)
- 38) 甲野裕之、鈴木里加子、佐々木啓子、吉村昭毅、和田敬爾、田中卓二、Azoxymethane 誘発大腸 ACF に対するイチョウ葉エキスおよび biobalide による修飾効果、第 14 回日本消化器癌発生学会総会、金沢市、(2003 年 9 月)
- 39) 加藤恵三、杉江茂幸、吉田浩二郎、田中卓二、甲野裕之、盛 弘強、テイ キョウ、久野寿也、坂田佳子、廣瀬義信、山田泰広、原 明、森 秀樹、3,3'-methylenediindole (DIM) の N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA) 誘発ラット食道発癌における修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 40) 杉江茂幸、加藤恵三、吉田浩二郎、田中卓二、甲野裕之、盛 弘強、久野寿也、坂田佳子、廣瀬義信、山田泰広、原 明、森 秀樹、N-Nitrosomethylbenzylamine (NMBA) 誘発食道発癌における Indole-3-carbinol (I3C) の修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 41) 甲野裕之、鈴木里加子、岡田忠司、杉江茂幸、田中卓二、発芽ブロッコリーパウダーによる azoxymethane (AOM) 誘発大腸 ACF の抑制、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 42) 鈴木里加子、甲野裕之、山口かずえ、細川雅史、宮下和夫、田中卓二、ニガウリ種子油(BGO)による azoxymethane (AOM) 誘発大腸発がん抑制、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 43) 坂田佳子、原 明、廣瀬義信、久野壽也、山田泰広、Zheng Qiao、村上 明、大東 肇、Ikemoto Kohei、小清水弘一、田中卓二、森 秀樹、柑橘類由来 AUraptene の F344 ラット N,N-Diethylnitrosamine 誘発肝癌モデルに対する抑制作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 44) 田中卓二、甲野裕之、鈴木里加子、山田泰広、杉江茂幸、森 秀樹、炎症関連マウス大腸発がんモデル作製の試み、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 45) 村上 明、田中卓二、金 河元、川畑球一、中村宜督、大東 肇、Zerumbone の皮膚発がん抑制作用とその分子機構、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 46) 下地由美、甲野裕之、南田久美子、西川 泰、大東 肇、田中卓二、黒酢エキスによる azoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸発癌に対する抑制効果、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 47) Suzuki, R., Kohno, H., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H. and Tanaka, T., Citrus nobilletin inhibits azoxymethane (AOM)-induced large bowel carcinogenesis in rats. The 3rd International Conference on Food Factors: Physiologic Functions and Disease Risk Reduction (ICoFF-3), Tokyo, (December 2003).
- 48) Okusaka, T., Ito, Y., Ueno, H., Ikeda, M., Takezako, Y., Kawachi, S., Kagami, Y., Ikeda, H. and Okada, S. Phase II trial of chemotherapy using weekly gemcitabine (GEM) in patients with locally advanced pancreatic cancer. 39th ASCO, Chicago, (May 2003).
- 49) Ueno, H., Okusaka, T., Ikeda, M., Kuriyama, H., Saisho, T., Morizane, C., and Okada, S. A phase II and pharmacokinetic trial of S-1 in patients with advanced biliary tract cancer (BTC). 39th ASCO, Chicago, (May 2003).
- 50) Hamaguchi, T., Matsumura, Y., Shirao, K., Shimada, Y., Yamada, Y., Muro, K., Okusaka, T., Ueno, H., Ikeda, M. and Watanabe, N. Phase I study of novel drug delivery system, NK911, a polymer micelle encapsulated doxorubicine. 93yj ASCO, Chicago, (May 2003).

- 51) 上野秀樹、奥坂拓志、池田公史. 進行膵癌に対する新しい治療法の開発. 第 103 回日本外科学会定期学術集会、札幌市、(2003 年 6 月)
- 52) 池田公史、奥坂拓志、上野秀樹、竹迫賀子、川内伸哉、森実千種. 肝外転移を有する肝細胞癌に対する FMP 療法の第 2 相試験. 第 39 回日本肝癌研究会、金沢市、(2003 年 6 月)
- 53) 竹迫賀子、奥坂拓志、上野秀樹、池田公史、川内伸哉. 進行肝内胆管がんに対するシスプラチン、エピルピシン、5-FU 併用科学療法(CEF 療法)の第 2 相試験. 第 39 回 日本肝癌研究会、金沢市、(2003 年 6 月)
- 54) Ueno, H., Okusaka, T., Ikeda, M., Takezako, Y., Morizane, C. The efficacy, toxicity and pharmacokinetic findings of S-1 in patient (pts) with advanced biliary tract cancer (BTC): A phase II trial. 12th ECCO, Copenhagen, (Sept. 2003).
- 55) 奥坂拓志、伊藤芳紀. 膵がんに対する放射線化学療法の現状と展望. 第 41 回日本癌治療学会、札幌、(2003 年 10 月)
- 56) 池田公史、奥坂拓志、上野秀樹、竹迫賀子、森実千種. 肝外転移を有する肝細胞癌に対する FMP 療法の第 2 相試験. 第 41 回日本癌治療学会、札幌、(2003 年 10 月)
- 57) 森実千種、奥坂拓志、上野秀樹、池田公史、竹迫賀子、川内伸哉. 進行胆道癌患者のにおける S-1 前期臨床第 II 相試験. 第 41 回日本癌治療学会、札幌、(2003 年 10 月)
- 58) Okusaka, T., Ito, Y., Ueno, H., Ikeda, M., Takezako, Y., Morizane, C., Kagami, Y. and Ikeda, H. Phase II study of radiotherapy combined with gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer. 2004 Gastrointestinal Cancers Symposium, San Francisco, (Jan. 2004).
- 59) Ikeda, M., Okusaka, T., Ueno, H., Takezako, Y. and Morizane, C. A phase II trial of continuous-infusion 5-fluorouracil, mitomycin and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. 2004 Gastrointestinal Cancers Symposium, San Francisco, (Jan. 2004).
- 60) 堤雅弘、ハムスターにおける膵癌発生の形態的特徴と遺伝子異常. 第 9 2 回日本病理学会総会、福岡、(2003 年 4 月)
- 61) 堤雅弘、岡保夫、辻内俊文、実験膵発がんにおける形態と分子の異常. 第 6 2 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年、9 月)
- 62) 石川秀樹、食物繊維と大腸がん予防. 第 57 回日本栄養・食糧学会大会、福岡、(2003 年 5 月)
- 63) 石川秀樹、食生活指導による大腸癌予防. 第 10 回日本癌予防研究会、札幌、(2003 年 6 月)
- 64) 石川秀樹、大腸発癌予防のための臨床試験. 第 14 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、(2003 年 9 月)
- 65) 石川秀樹、家族性腫瘍をターゲットにしたがん化学予防. 第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 66) 石川秀樹、乳酸菌製剤と小麦ふすまによる大腸がん予防介入研究. 日本消化器病学会、大阪、(2003 年 10 月)
- 67) 伊藤道哉、濃沼信夫、石川秀樹、佐伯智子、家族性腫瘍診断の社会的側面. 日本癌治療学会、札幌、(2003 年 10 月)
- 68) 石川秀樹、いわゆる健康食品の臨床試験における有用性の検証. 第 54 回日本皮膚科学会中部支部学術大会シンポジウム、大阪、(2003 年 11 月)

H. 知的所有権の取得状況

(1) 特許取得

特許名称：モフェゾラックを有効成分とする血中脂質低下剤 (申請中)

特許名称：ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット

発明者：津田洋幸

(国立がんセンター研究所化学療法部)

朝元誠人

(国立がんセンター研究所化学療法部)

鳥山弘靖

(国立がんセンター研究所化学療法部)

落谷孝広

(国立がんセンター研究所がん転移研究室)

関谷剛男

(国立がんセンター研究所腫瘍遺伝子研究部)

取得日：平成 15 年 8 月 22 日

特許番号：第 3 4 6 3 0 6 1

特許名称：Transgenic rat with human normal type c-Ha-ras gene

発明者：津田洋幸

(国立がんセンター研究所化学療法部)

朝元誠人

(国立がんセンター研究所化学療法部)

鳥山弘靖

(国立がんセンター研究所化学療法部)

落谷孝広

(国立がんセンター研究所がん転移研究室)

関谷剛男

(国立がんセンター研究所腫瘍遺伝子研究部)

取得日：June 10, 2003 (米国)

特許番号：US6576811B1

カナダ・審査請求中

特許名称：軟骨魚類から単離されたプロテオグリカンおよびその製造方法 (出願中)

(2) 実用新案登録

なし

(3) その他
なし

大腸発がん抑制物質の検索と作用機序の解析

分担研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨 食品素材及び医薬品を対象としたがん予防剤、がん予防方法を開発し、臨床への応用を目指すことを目的として、本分担研究では、*Apc* 遺伝子欠損マウスにおける高脂血症改善薬、Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) リガンド投与による腸管ポリープ形成抑制効果について検討した。また同時に、PPAR γ リガンドの血清脂質への影響について検討した。その結果、2種類の *Apc* 遺伝子欠損マウスにおいて認められる経時的な血清脂質、特に血清中トリグリセリドの急激な上昇が、PPAR γ リガンド投与により改善するとともに腸ポリープ形成を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

がんは、1981 年以來、我が国において死亡原因の第 1 位を占め、今後もさらに増え続けるものと予測される。このようながんの増加を抑制することは極めて重要である。本分担研究においては食品素材及び医薬品を対象として新規がん予防剤を検索、開発する基礎研究を行い、臨床応用を目指す。最終的には、安全性が高く、且つ有効ながん予防方法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、高脂血症改善薬である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) リガンドによる腸管ポリープ形成抑制効果と血清脂質への影響について検討した。PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾン家族性大腸腺腫症のモデルである *APC*¹³⁰⁹ または *Min* マウスに投与し、腸の腺腫数及び大きさ、血清脂質量を測定し、PPAR γ リガンドの効果を検討した。

まず、雌 *APC*¹³⁰⁹ または雄 *Min* マウスを用いて血清中トリグリセリド (TG) 及び総コレステロール (TC) 量を 6 週齢から 15 週齢まで経時的に測定した。その結果を踏まえ、6 週齢雄性 *APC*¹³⁰⁹ マウスに PPAR γ アゴニストを 100 ppm, 200 ppm の濃度で 6 週間混餌投与した。また 6 週齢雄性 *Min* マウスに PPAR γ アゴニストを 100, 200, 400 及び 1600 ppm の濃度で 14 週間混餌投与し、各々のマウスにおける小腸及び大腸ポリープの発生状況と血清脂質量とを野生型マウスと比較検討した。更に野生型と両 *Apc* 遺伝子欠損マウスの肝臓における Lipoprotein lipase (LPL) の発現解析を RT-PCR 法で行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立がんセンターの実験動物取り扱い (倫理) 規定を遵守して行っている。

C. 研究結果

*APC*¹³⁰⁹ マウス 6 週齢では TG, TC レベルは野生型マウスのそれらと同等であったが、12 週齢では TG は 6 週齢の 10 倍、TC は 2 倍高値を示すことがわかった。野生型マウスでは TG 及び TC レベルの上昇は認められなかった。また、*Min* マウスにおいても同様に 8 週齢から 15 週齢までに TG の急激な上昇が認められ、高脂血症を呈することが明らかとなった。

次に、6 週齢 *APC*¹³⁰⁹ マウスにピオグリタゾンを 100, 200 ppm の濃度で 6 週間混餌投与した。その結果、ピオグリタゾンの投与により TG, TC 量は用量依存的に低下し、TG は対照群の 50% まで低下した。腸ポリープ数は 100 ppm 及び 200 ppm の投与により非投与群の 67% にまで減少した。また、6 週齢雄 *Min* マウスにピオグリタゾンを 100-1600 ppm 投与すると、TG 量は用量依存的に野生型マウスのレベルにまで低下した。加えて、LDL 値の減少と HDL 値の上昇を認めた。腸ポリープ数はピオグリタゾンの投与により非投与群の 63% から 9% までに低下させた。また、肝臓の LPL の発現は *Apc* 遺伝子欠損マウスにおいて減少しており、ピオグリタゾンの投与により野生型マウスのレベルにまで回復した。以上のことより、ピオグリタゾンは *Apc* 遺伝子欠損マウスの高脂血症を改善するとともに腸ポリープ形成を抑制することが明らかとなった。

D. 考察

大腸発がんのリスクは高脂肪食の摂取により増加し、血清 TG 値または TC 値との間に相関性の認められることが疫学調査により示唆されて

いる。また、PPAR γ リガンドはインスリン抵抗性改善作用及び血清脂質低下作用を有するとともに、各種がん細胞の増殖を抑制し分化を誘導することが知られている。

我々は、2種類の *Apc* 遺伝子欠損マウスの血清脂質、特に血清中 TG が経時的に急激に上昇することを見出した。更に、PPAR γ リガンドは *Apc* 遺伝子欠損マウスの高脂血症を改善するとともに腸ポリープ形成を抑制することを見出した。肝臓における LPL の発現抑制が高脂血症の原因の1つであると考えられるが、PPAR γ が直接 LPL の発現調節に関わることを考えると PPAR γ リガンドによる__の誘導促進が TC や TG の低下に関わっていると考えられた。また、2種類の *Apc* 遺伝子欠損マウスにおけるポリープ生成や血清脂質値の違いが *Apc* 遺伝子上の変異部位による違いを表わしているのならば、*Apc* 遺伝子はポリープ生成のみならず、血清脂質代謝にも積極的に関与している可能性が考えられる。血清脂質とポリープ生成との相互関係を明らかにすることで、より詳細な大腸発がんの機序や大腸発がん予防方策が得られるものと考えられる。

E. 結論

Apc 遺伝子欠損マウスにおいて腸管ポリープ形成と並行して血清脂質が上昇することを初めて報告した。さらに、PPAR γ アゴニストがポリープ形成と血清脂質値の両方を抑制し、高脂血症改善薬を用いるがん予防方法が可能であると考えられた。

また、食の欧米化にともなって、大腸がん及び高脂血症患者が増加しており、従来報告されていた高脂血症と大腸発がんとの関連性について今後さらに詳細な機序の解明が必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究論文

1. 論文発表

- 1) Niho N, Takahashi M, Kitamura T, Shoji Y, Itoh M, Noda T, Sugimura T, Wakabayashi K. Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in *Apc*-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res.* 63: 6090-6095, 2003.
- 2) Niho N, Takahashi M, Shoji Y, Takeuchi Y, Matsubara S, Sugimura T, Wakabayashi K. Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a

PPAR γ ligand. *Cancer Sci.* 94: 960-964, 2003.

- 3) Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E₂ administration. *Carcinogenesis*, 24: 985-990, 2003.
- 4) Kitamura, T., Itoh, M., Noda, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., Ohuchida, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Combined effects of prostaglandin E receptor subtype EP₁ and subtype EP₄ antagonists on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice. *Cancer Sci.*, 94: 618-621 (2003).

2. 学会発表

- 1) 仁保直子、高橋真美、庄司 豊、杉村 隆、若林敬二、PPAR γ リガンドによる *Apc* 欠損マウスの腸ポリープ形成の抑制、第 10 回日本がん予防研究会、(2003 年 6 月)
- 2) 庄司 豊、渡部浩治、北村知宏、高橋真美、成宮周、杉村 隆、若林敬二、プロスタグランジン E2 受容体サブタイプ EP3 の AOM 誘発大腸発がんに及ぼす影響、第 10 回日本がん予防研究会、札幌、(2003 年 6 月)
- 3) 仁保直子、高橋真美、北村知宏、庄司 豊、野田哲生、杉村 隆、若林敬二、PPAR リガンドによる *Apc* 遺伝子欠損マウスの高脂血症改善および腸ポリープ形成抑制作用、第 62 回日本癌学会総会、(2003 年 9 月)
- 4) 庄司 豊、高橋真美、渡部浩治、北村知宏、成宮 周、杉村 隆、若林敬二、大腸発がんにおけるプロスタグランジン E2 受容体 EP4 の役割、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年 9 月)
- 5) 若林敬二、がん化学予防のための基礎研究、第 62 回日本癌学会、名古屋、(2003 年 9 月)

H. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

「モフェゾラックを有効性分とする血中脂質低下剤」申請中

2) 実用新案登録 なし

6) その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（がん予防健康科学総合）
分担研究報告書

ラクトフェリンの発がん抑制作用の検討と作用機序の解明

分担研究者 津田洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 マウス固形腫瘍の増殖や転移に対し、経口および腹腔内投与によって示されるウシラクトフェリン(LF)の強い抗腫瘍効果は、血管新生の阻害が一因であると考え、LFの血管新生阻害作用について検討した。方法は、1) 鶏卵漿尿膜 (CAM)法、2) マウスの dorsal air sac (DAS)法を用いた *in vivo* の測定系および3) 血管内皮細胞を用いた *in vitro* の測定系で行った。同時に4) LFによる血管新生関連サイトカインの産生も検討した。1) LFは鶏卵漿尿膜上の血管新生を濃度依存的に阻害した。この阻害は血管新生因子である bFGF を同時に添加することで減弱した。また、3)血管内皮細胞による *in vitro* の血管新生（管腔形成）を低濃度で抑制した。内皮細胞の増殖に関しては、LFは bFGF によって誘導された血管内皮細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、VEGF による誘導の増殖に対しても同様の効果があった。一方、血清による誘導増殖は抑制しなかった。また、bFGF による線維芽細胞や血清により誘導された腫瘍細胞の増殖に対しては影響しなかった。一方、2) 腫瘍細胞が誘発する *in vivo* の血管新生に対し LFは腹腔内あるいは経口投与によって比較的少量で阻害効果を示した。4) LFは経口投与により血管新生阻害サイトカインの一つである IL-18 の血中濃度を上昇させたが腹腔内投与では認められなかった。IL-18は小腸上皮細胞により産生することを以前報告した。また *in vitro* の系で、腹腔内マクロファージにより IL-18 の産生が濃度および時間依存的に増加した。以上より LFは血管内皮細胞の機能（増殖、管腔形成）を抑制すると共に小腸上皮細胞やマクロファージ等の細胞で IL-18 を産生し、腫瘍血管新生を阻害することが示唆された。これらより、LFが示す抗腫瘍作用は血管新生の阻害が関与していることが明らかになった。LFは、がん予防あるいはがん治療に、経口投与可能な物質となりうると考えられた。

A. 研究目的

LFは、ポストイニシエーションまたは同時投与で大腸、食道、舌などの発がんを抑制し、特にラットのアゾキシメタン誘発大腸腺癌巣および腫瘍発生を顕著に抑制した。さらに、高転移性の腫瘍細胞を皮下移植したマウスに、LFを腹腔内あるいは皮下、経口投与すると肺への転移を著しく阻止することを見出している。これらの作用は LF投与により腸管上皮細胞に IL-18 が誘導され、小腸粘膜固有層および白血球の T細胞や NK細胞数が著しく増加およびそれらによるがん細胞に対する殺細胞活性の増加が、局所の大腸および遠隔臓器での発がん抑制および転移抑制に重要な役割を担っている可能性が示された。さらに最近では、ラットの腸管で VEGF で誘導された血管新生を阻害することが報告され、血管新生が抗腫瘍効果に貢献している可能性が示唆されている。

本研究は、LFによる血管新生阻害作用を *in vivo*

および *in vitro* の測定系で検討し、併せて LFをマウスに投与した時の血清および thioglycollate medium で活性化したマクロファージを採取、LFを添加した時に産生する血管新生阻害に関与するサイトカインを検討した。

B. 研究方法

1) *In vivo* の血管新生阻害作用は鶏卵漿尿膜 (CAM)法および2) ICR マウス背部皮下(DAS)法を用いて検討した。DAS法には、0.45mm フィルターで覆った Millipore chamber を 3LL 細胞で満たし、背部皮下に移植した。3) *In vitro* の血管新生阻害作用は、マウスの血管内皮細胞 KOP2.16 を用いた増殖抑制作用、さらに bovine pulmonary arterial endothelial cells (BPAE)細胞による管腔形成に対する抑制作用で検討した。LF(純度 96%) は森永乳業株式会社から、bFGF と VEGF は Pepro Tech EC 社から購入した。

4) 血清中のサイトカイン濃度は、LF をマウスに経口または腹腔内投与し、血液を採取血清分離後、IL-18 測定用 ELISA で定量した。マクロファージによるサイトカインの誘導は、マウス腹腔内に滲出した細胞に LF を処理後、細胞内と培養液中に誘導されたサイトカインを ELISA で測定した。マクロファージによるサイトカインの誘導は、滅菌 thioglycollate medium 溶液 (3g/100 ml) を 3ml マウス腹腔内投与後、腹腔内に滲出した細胞を用いた。ディッシュで 2 時間培養した後の接着細胞に LF を処理、細胞内と培養液中に誘導されたサイトカインを ELISA で測定した。

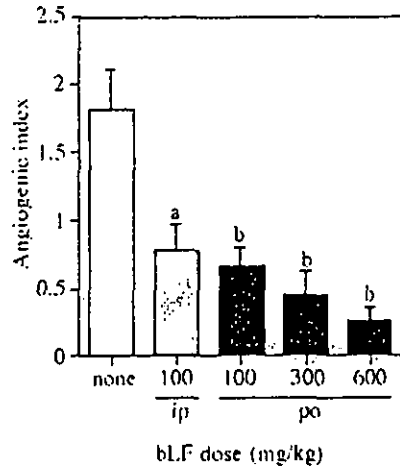


図2 マウスを用いたDAS法によるLFの血管新生阻害

C. 結果

1) CAM 法を用いた LF の血管新生阻害作用

図 1 に示すように、胎生 6 日齢の CAM における血管形成は、LF 投与により、無処置群と比べ、著しく阻害された。その阻害効果は用量依存的であり、ED₅₀ は 10 μg/CAM であった(図 1)。

3-1) LF による In vitro 血管新生阻害作用

bFGF 処理 BPAE 細胞をマトリゲル上に置くと、管腔形成を始める。10⁻⁷ M 以上の濃度の LF により管腔形成は著しく阻害された(図 3)。

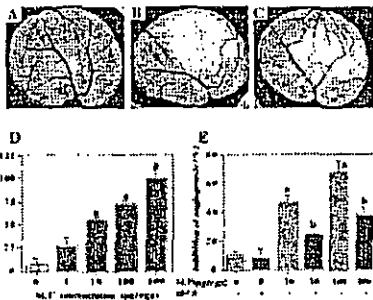


図1 CAM法によるLFの血管新生阻害

A: Control (Saline), B: bLF 100mg/CAM, C: bLF 100μg/CAM + bFGF 100ng/CAM
D: bLF濃度と血管新生阻害, E: bLFによる血管新生阻害に対するbFGFの影響

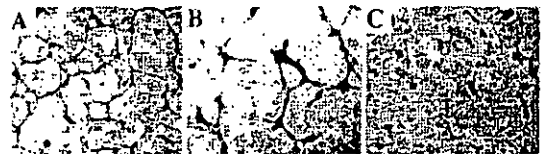


図3 LFによるBPAE細胞の管腔形成の阻害作用

3-2) 内皮細胞の増殖に対する LF の影響

bFGF 20 ng/ml で KOP.216 細胞を刺激すると、細胞は増殖を始める。この増殖は LF の添加により濃度依存的に阻害された(図 4A)。さらに、VEGF 20 ng/ml でも同様な結果が得られた(図 4B)。マウス繊維芽細胞 A31 およびルイス肺癌細胞では、同様な操作でも、抑制効果は得られなかった(図 4C&D)。

2) DAS 法による LF の血管新生阻害作用

3LL を用いた DAS 法で、LF 100 mg/kg の腹腔内投与により、さらに 100-600 mg/kg の経口投与により著しい血管新生阻害が得られた。特に経口投与による強い阻害効果が確認できた(図 2)。

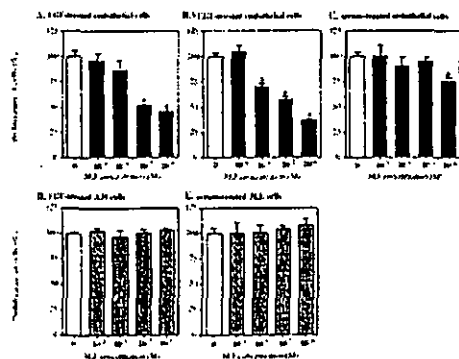


図4 マウス血管内皮細胞KOP2.16(A,B,C)、線維芽細胞A31(D)、およびルイス肺がん(E)の細胞増殖に対するLFの影響