

がん化学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究に関する研究

分担研究者 田中 卓二 金沢医科大学

研究要旨 rasH2 マウスの口腔発がん感受性の検討を行った結果、rasH2 マウスは4-NQO誘発舌発がんに対して高感受性であり、同時に食道発がんに対しても感受性が高いことが判明した。さらに、その発がんへのEP1、EP2レセプターの関与が示唆された。スタチン製剤 pitavastatin の混餌投与により4-NQO誘発舌・食道発がんが抑制され、その抑制作用は舌において効果的であることが明らかとなった。

A. 研究目的

遺伝毒性発がん物質に対して感受性が高く、発がん試験に利用されている rasH2 マウスの4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)に対する発がん感受性についての検討を行い、口腔領域における短期マウス発がんモデルの確立を目的とした。別に statin 製剤の1つ pitavastatin (PVS)の発がんへの影響を観察し、PVSの新規がん化学予防剤としての可能性を検討した。

B. 研究方法

6週齢の Tg-rasH2 (22匹)、Non-Tg (Wt)マウス(24匹)に4-NQO (20 ppm)を2、4、6、8週間飲水投与し、実験開始後24週に舌を含む諸臓器の病理組織学的解析を行った。さらに、PGE2レセプターであるEP1、EP2、EP3、EP4の発現を免疫組織化学的に解析した。別に、6週齢の Tg-rasH2 (42匹)を用い、PVSのpost-initiation相混餌投与(1、5、10 ppmで15週間)による発がんへの影響を検討した(実験期間24週)。

(倫理面への配慮)動物実験は、金沢医科大学動物実験指針に従い、実験動物委員会の承認に基づき実施し、動物愛護を充分考慮した。

C. 研究結果

4-NQO投与により Tg-rasH2 マウスの舌、食道腫瘍が発生し、その発生頻度(発生個数)は、4-NQO 8週投与群で最も高く、舌腫瘍は100% (2.80±1.30)、食道腫瘍は60% (1.40±1.67)と高値を示した。Wtマウスの舌、食道に腫瘍性病変の発生はなかった。舌に発生した腫瘍の分布はほぼ舌の全域にわたっていた。EP1、EP2、EP3、

EP4の発現を免疫組織化学的に解析した結果、舌、食道における前がん性病変(異形成)、腫瘍(乳頭腫、扁平上皮がん)でEP1、EP2が高発現していた。さらに、PVSの混餌投与により、舌腫瘍の発生頻度が低下し、特に10 ppm PVS混餌投与では第1群に比べ、発生頻度(38% vs. 100%)、発生個数(0.75±1.04 vs. 2.20±1.23)とも有意(P<0.05)の抑制が認められた。食道腫瘍に対する抑制効果は舌腫瘍に対する効果に比べ弱い傾向であった。また、これら舌・食道腫瘍でのEP1、EP2の発現や増殖活性、PGE2量はPVSの混餌投与により低下していた。

D. 考察

rasH2 マウスは4-NQO誘発舌発がんに対して高感受性であり、同時に食道発がんに対しても感受性が高く、その発がんにはEP1、EP2レセプターが関与することが示唆された。さらに、スタチン製剤 pitavastatin の混餌投与により4-NQO誘発舌・食道発がんが抑制され、その抑制作用は舌において効果的であることが明らかとなった。

これまでの研究では、ヒトプロト型 c-Ha-ras を導入したラットに4-NQOを投与すると舌腫瘍が効率的に発生することやCOX-2阻害剤、PPARアゴニストなどの発がん阻止効果を報告したが、発生した舌腫瘍は舌根部にほぼ限局しており、食道腫瘍の発生はほとんど観察されなかった。本研究で観察された舌腫瘍は舌全域に分泌し、食道腫瘍も高率に発生していた。これらの結果から、rasH2 マウスは各種化合物の舌・食道発がんの修飾作用を検討するための短期前臨床試験モデル動物として活用できると考えられた。口腔・食道発がんは"field cancerization"概念が合致する組織の1つとして良く知られており、これらの領域に

おける発がんの高危険群や多重がんの発がん阻止を目的とした前臨床試験にも有用と考えられる。世界的な口腔がんの多発地域において、rasの変異が高率である地域と低率な地域が存在することから、今後、rasH2 マウスにおける高発がん感受性の機構解析を含めたさらなる検討が必要である。

HMG-CoA 還元酵素阻害薬のスタチン製剤は、血清脂質低下作用以外の作用、例えば発がん抑制作用も報告され、注目されている。今回使用した PVS は脂溶性スタチン製剤で、CYP に影響せず、副作用が乏しいとされている。これまで、PVS の炎症関連大腸発がん抑制効果を報告したが、本研究では PVS の PGE2 や EP1、EP2 への影響が示唆され、発がん抑制に繋がったと考えられる。今後、詳細な PVS の発がん抑制機構の解析とともに、高脂血症や肥満と舌・食道発がんの関連なども明らかにしておく必要がある。

E. 結論

rasH2 マウスは 4-NQO 誘発舌発がんに対して高感受性であり、同時に食道発がんに対しても感受性が高く、その発がんには EP1、EP2 レセプターが関与することが示唆された。さらに、スタチン製剤 pitavastatin の混餌投与により 4-NQO 誘発舌・食道発がんが抑制され、その抑制作用は舌において効果的であることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 50) Tanaka, T., Miyamoto, S., Yasui, Y. and Suzuki, R., Cancer chemoprevention in preclinical animal studies. In; Mohan, R.M. (Ed.), *Research Advances in Cancer 7*, pp. 17-47, Global Research Network, Kerala, India (2007).
- 51) Tanaka, T., Inflammation and cancer. In: Tanaka, T. (Ed.), *Cancer: Disease Progression and Chemoprevention*, Chapter 1. Disease Progression, pp. 27-44, Research Signpost, Kerala, India (2007).
- 52) Miyamoto, S., Yasui, Y., Murakami, A. and Tanaka, T., Molecular mechanism of colorectal carcinogenesis. In: Tanaka, T. (Ed.), *Cancer: Disease Progression and Chemoprevention*, Chapter 1. Disease Progression, pp. 45-56, Research Signpost, Kerala, India (2007).
- 53) Tanaka, T., Miyamoto, S., Yasui, Y., Kohno, H. and Sugie, S., Obesity: a risk for hepatocellular carcinoma. In: Tanaka, T. (Ed.), *Cancer: Disease Progression and Chemoprevention*, Chapter 1. Disease Progression, pp. 57-74, Research Signpost, Kerala, India (2007).
- 54) Farombi, E.O. and Tanaka, T., Cancer chemoprevention with Zingiberaceae and citrus-derived phytochemicals: Biochemical and molecular mechanisms. In: Tanaka, T. (Ed.), *Cancer: Disease Progression and Chemoprevention*, Chapter 2. Chemoprevention, pp. 167-184, Research Signpost, India (2007).
- 55) Hosokawa, M., Yasui, Y., Suzuki, R., Kohno, H., Tanaka, T. and Miyashita, K., Chemopreventive effects of conjugated linolenic acids on colon cancer. In: Tanaka, T. (Ed.), *Cancer: Disease Progression and Chemoprevention*, Chapter 2. Chemoprevention, pp. 239-254, Research Signpost, Kerala, India (2007).
- 56) Miyazawa, K., Miyamoto, S., Suzuki, R., Yasui, Y., Ikeda, R., Kohno, H., Yano, M., Tanaka, T., Hata, K. and Suzuki, K., Dietary beta-cryptoxanthin inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Oncol. Rep.*, 17: 297-304 (2007).
- 57) Makita, H., Mutoh, M., Maruyama, T., Yonemoto, K., Kobayashi, A., Fujitsuka, H., Toida, M., Shibata, T., Miyamoto, S., Yasui, Y., Suzuki, R., Wakabayashi, K. and Tanaka, T., A prostaglandin E₂ receptor subtype EP₁-selective antagonist, ONO-8711, suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 28: 677-684 (2007).
- 58) Tang, M., Ogawa, K., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Seeni, A., Suzuki, S., Takahashi, S., Tanaka, T., Ichikawa, K. and Shirai, T., Protective effects of citrus nobiletin and auraptene in transgenic rats developing adenocarcinoma of the prostate (TRAP) and human prostate carcinoma cells. *Cancer Sci.*, 98: 471-477 (2007).
- 59) Hayashi, K., Suzuki, R., Miyamoto, S., Yoshitani, S., Kohno, H., Sugie, S., Takashima, S. and Tanaka, T., Citrus auraptene suppresses azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-*db/db* mice. *Nutr. Cancer*, 58: 75-84 (2007).
- 60) Kohno, H., Suzuki, R., Yasui, Y., Miyamoto, S., Wakabayashi, K. and Tanaka, T., Ursodeoxycholic acid versus sulfasalazine in colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Clin. Cancer Res.*, 13: 2519-2525, 2007.
- 61) Kohno, H., Takahashi, M., Yasui, Y., Suzuki, R., Miyamoto, S., Kamanaka, Y., Naka, M., Maruyama, T., Wakabayashi, K. and Tanaka, T., A specific inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714 attenuates inflammation-related large bowel carcinogenesis in male *Apc^{Min}* mice. *Int. J. Cancer*, 121: 506-513 (2007).
- 62) Suzuki, R., Miyamoto, S., Yasui, Y., Sugie, S. and Tanaka, T., Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer*, 7: 84 (2007).
- 63) Kohno, H., Totsuka, Y., Yasui, Y., Suzuki, R., Sugie, S., Wakabayashi, K. and Tanaka, T.,

- Tumor-initiating potency of a novel heterocyclic amine, aminophenylnorharman in mouse colonic carcinogenesis model. *Int. J. Cancer*, 121: 1659-1664 (2007).
- 64) Takeda, K., Utsunomiya, H., Kakiuchi, S., Okuno, Y., Oda, K., Inada, K., Tsutsumi, Y., Tanaka, T. and Kakudo, K., Citrus auraptene reduces *Helicobacter pylori* colonization of glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *J. Oleo Sci.*, 56: 253-260 (2007).
- 65) Yasui, Y., Suzuki, R., Kohno, H., Miyamoto, S., Beppu, F., Hosokawa, M., Miyashita, K. and Tanaka, T., 9*trans*,11*trans* conjugated linoleic acid inhibits the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Nutr. Cancer*, 59: 82-91 (2007).
- 66) Yasui, Y., Suzuki, R., Miyamoto, S., Tsukamoto, T., Sugie, S., Kohno, H., and Tanaka, T., A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 121: 2331-2339 (2007).
- 67) Nakanishi, M., Tazawa, H., Tsuchiya, N., Sugimura, T., Tanaka, T. and Nakagama, H., Mouse strain differences in inflammatory responses of colonic mucosa induced by dextran sulfate sodium cause differential susceptibility to PhIP-induced large bowel carcinogenesis *Cancer Sci.*, 98: 1157-1163 (2007).
- 68) Ando, N., Shimizu, M., Okuno, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Tsurumi, H., Tanaka, T. and Moriwaki, H., Expression of retinoid X receptor alpha is decreased in 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Oncol. Rep.*, 18: 879-884 (2007).
- 69) Sakano, K., Takahashi, M., Mutoh, M., Niho, N., Komiya, M., Sato, H., Tanaka, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K., Enhanced thyroid carcinogenicity of N-nitrobis(2-oxo-propyl)amine in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a model of type 2 diabetes mellitus. *Carcinogenesis*, 28: 2193-2198 (2007).
- 70) Tanaka, T. and Sugie, S., Inhibition of colon carcinogenesis by dietary non-nutritive compounds. *J. Toxicol. Pathol.*, 20: 215-235 (2007).
- 71) Miyamoto, S., Suzuki, R., Yasui, Y., Kohno, H., Sugie, S., Murakami, A., Ohigashi, H. and Tanaka, T., Lack of Enhancing Effect of Lauric Acid on the Development of Aberrant Crypt Foci in Male ICR Mice Treated with Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate. *J. Toxicol. Pathol.*, 20: 93-100 (2007).
- 72) Miyamoto, S., Yasui, Y., Kim, M., Sugie, S., Murakami, A., Ishigamori-Suzuki, R. and Tanaka, T., et al., A novel rasH2 mouse carcinogenesis model that is highly susceptible to 4-NQO-induced tongue and esophageal carcinogenesis is useful for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*, 29: 418-426 (2008).
2. 学会発表
- 73) Yasui, Y., Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Niho, N., Takahashi, M., Wakabayashi, K. and Tanaka, T. Dextran sodium sulfate strongly promotes colon carcinogenesis in Apc^{Min/+} mice. The 2nd Biennial Scientific Meeting of International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (The 2nd InSiGHT). Yokohama (2007年3月)
- 74) 田中卓二、甲野裕之、杉江茂幸、：CB6F1-Tg-rasH2 マウスにおける 4-NQO 誘発舌発がん感受性。第 96 回日本病理学会、大阪 (2007年3月)。
- 75) 杉江茂幸、甲野裕之、田中卓二：rasH2 マウスにおける DEN と MeIQx の発がん性の検討。第 96 回日本病理学会、大阪 (2007年3月)
- 76) Yasui, Y., Suzuki, R., Kohno, H., Miyamoto, S. and Tanaka, T. A lipophilic statin, pitavastatin inhibits inflammation-associated mouse colon carcinogenesis. 98th Annual Meeting of AACR, Los Angeles (2007年4月)
- 77) Shimizu, M., Shirakami, Y., Sakai, H., Hata, K., Hirose, Y., Tanaka, T. and Moriwaki, H. EGCG suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. 98th Annual Meeting of AACR, Los Angeles (2007年4月)
- 78) Shirakami, Y., Shimizu, M., Tanaka, T. and Moriwaki, H. Chemopreventive effects of EGCG and Polyphenon Eon inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM and DSS. 98th Annual Meeting of AACR, Los Angeles (2007年4月)
- 79) Miyamoto, S., Hayashi, K., Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Takashima, S., Murakami, A., Ohigashi, H. and Tanaka, T. Citrus auraptene suppresses azoxymethane-induced colonic preneoplasia in *db/db* mice. 98th Annual Meeting of AACR, Los Angeles (2007年4月)
- 80) Kohno, H., Suzuki, R., Yasui, Y., Miyamoto, S. and Tanaka, T. Ursodeoxycholic acid inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice: A comparative study regarding the effect of sulphasalazine. 98th Annual Meeting of AACR, Los Angeles (2007年4月)
- 81) 安井由美子、鈴木里加子、甲野裕之、田中卓二、細川雅史、宮下和夫：9*t*,11*t*-CLA の AOM 誘発ラット大腸 aberrant crypt foci に及ぼす効果。がん予防大会 in TOKYO 2007 (第 14 回日本がん予防学会、第 8 回日本がん分子疫学研究会、第 30 回がん疫学研究会)、東京 (2007年7月)
- 82) 甲野裕之、高橋真美、安井由美子、鈴木里加

- 子、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二：AOM/DSS誘発マウス大腸発がんに対する iNOS 阻害剤 ONO-1714 による修飾効果。がん予防大会 in TOKYO 2007 (第 14 回日本がん予防学会、第 8 回日本がん分子疫学研究会、第 30 回がん疫学研究会)、東京(2007 年 7 月)
- 83) 唐 明希、小川久美子、朝元誠人、白井智之、田中卓二：Nobiletin による PhIP 誘発ラット前立腺および大腸発がんに対する抑制効果。がん予防大会 in TOKYO 2007 (第 14 回日本がん予防学会、第 8 回日本がん分子疫学研究会、第 30 回がん疫学研究会)、東京(2007 年 7 月)
- 84) 杉江茂幸、甲野裕之、安井由美子、宮本真吾、田中卓二：BBN 誘発マウス膀胱発がんにおける β -cryptoxanthin の抑制効果。がん予防大会 in TOKYO 2007 (第 14 回日本がん予防学会、第 8 回日本がん分子疫学研究会、第 30 回がん疫学研究会)、東京(2007 年 7 月)
- 85) 立松憲次郎、森 幸雄、杉江茂幸、田中卓二、森 秀樹：クルクミンによる環境発がん物質の代謝活性化に対する臓器特異的修飾効果。がん予防大会 in TOKYO 2007 (第 14 回日本がん予防学会、第 8 回日本がん分子疫学研究会、第 30 回がん疫学研究会)、東京(2007 年 7 月)
- 86) 宮本真吾、村上 明、大東 肇、安井由美子、田中卓二：マウス大腸化学発がんモデルにおけるレプチンの役割。がん予防大会 in TOKYO 2007 (第 14 回日本がん予防学会、第 8 回日本がん分子疫学研究会、第 30 回がん疫学研究会)、東京(2007 年 7 月)
- 87) Miyamoto, S., Yasui, Y., Murakami, A., Ohigashi, H. and Tanaka, T. Leptin is involved in the colon carcinogenesis in mice. 66th Annual Meeting of the JCA, Yokohama (2007 年 10 月)
- 88) Kohno, H., Takahashi, M., Yasui, Y., Suzuki, R., Yamaguchi, K., Wakabayashi, K. and Tanaka, T. A specific iNOS inhibitor, ONO-1714 attenuates inflammation-related large bowel carcinogenesis in *Apc^{Mim+}* mice. 66th Annual Meeting of the JCA, Yokohama (2007 年 10 月)
- 89) Shimizu, M., Shirakami, Y., Sakai, H., Tatebe, H., Hata, K., Hirose, Y., Tanaka, T. and Moriwaki, M. EGCG suppresses azoxymethane (AOM)-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/Ks-db/db (*db/db*) mice. 66th Annual Meeting of the JCA, Yokohama (2007 年 10 月)
- 90) Tang, M., Ogawa, K., Asamoto, M., Naiki-Ito, A., Futakuchi, M., Takahashi, S., Tanaka, T. and Shirai, T. Effects of citrus nobiletin on PhIP-induced prostate and colon carcinogenesis in F344 rats. 66th Annual Meeting of the JCA, Yokohama (2007 年 10 月)
- 91) Sugie, S., Miyamoto, S., Yasui, Y., Kohno, H., Suzuki, R., Nakagama, H. and Tanaka, T. Modifying effects of NNK on AOM/DSS colon carcinogenesis model in A/J mice. 66th Annual Meeting of the JCA, Yokohama (2007 年 10 月)
- 92) Tanaka, T., Suzuki, R., Miyamoto, S., Yasui, Y., Kohno, H. and Sugie, S. Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. 66th Annual Meeting of the JCA, Yokohama (2007 年 10 月)
- 93) Yasui, Y., Suzuki, R., Kohno, H., Hosokawa, M., Miyashita, K. and Tanaka, T. Dietary feeding with 9t,11t,13c-CLN and 9t,11t-CLA inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci in male F344 rats. 66th Annual Meeting of the JCA, Yokohama (2007 年 10 月)
- 94) Shirakami, Y., Shimizu, M., Tanaka, T. and Moriwaki, H. Chemopreventive effects of green tea catechin on inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM and DSS. 66th Annual Meeting of the JCA, Yokohama (2007 年 10 月)
- 95) Tanaka, T. Citrus compounds inhibit inflammation- and obesity-related carcinogenesis in mice. Cancer Chemoprevention Symposium, 12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine, Crete (2007 年 10 月)
- 96) Ikeda, M., Masumura, K., Matsui, K., Kohno, H., Sakuma, K., Tanaka, T., Kamataki, T. and Nohmi, T. Chemopreventive effects of nobiletin, a citrus constituent, against the genotoxicity of NNK, a tobacco-specific nitrosamine, in the lung of gpt delta transgenic mice. 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007): Symposium V-Modulation of Genotoxicity and Carcinogenicity (I), Jeju Island (2007 年 12 月)
- 97) Yasui, Y., Kim, M., Miyamoto, S., Ishigamori-Suzuki, R., Sugie, S. and Tanaka, T. The inhibitory effect of pitavastatin on colitis-related colon carcinogenesis in mice. 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007), Jeju Island (2007 年 12 月)
- 98) Mihye, K., Yasui, Y., Miyamoto, S., Sugie, S., Murakami, A., Ishigamori-Suzuki, R. and Tanaka, T. Dietary pitavastatin inhibits 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis in the upper-digestive organs of *rasH2* mice. 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007), Jeju Island (2007 年 12 月)
- 99) Tanaka, T., Yasui, Y., Kim, M., Miyamoto, S., Epifano, F., Curini, M., Genovese, S. and Ishigamori-Suzuki, R. A novel prodrug of ferulic acid suppresses AOM/DSS-induced mouse colon carcinogenesis. 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007), Jeju Island (2007 年 12 月)
- 100) Tanaka, T. Preclinical chemoprevention study on inflammation- and obesity-related colon

carcinogenesis. 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007): Symposium VIII-Biomarkers in Anticarcinogenesis and Antimutagenesis Research, Jeju Island (2007年12月)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

アンギオテンシン受容体ブロッカーによるラット前立腺発がん抑制作用に関する研究

分担研究者 高橋 智 名古屋市立大学大学院医学研究科共同研究教育センター 准教授

研究要旨 アンギオテンシン受容体ブロッカーの1つであるテルミサルタンの前立腺発がんに対する化学予防効果を前立腺発がんモデル動物である Transgenic Rat for Adenocarcinoma of Prostate (TRAP)を用いて検討した。3週齢の TRAP ラットにテルミサルタン (2, 10 mg/kg/day) を12週間飲料水投与した後、全動物を屠殺剖検した。前立腺癌の発生頻度は側葉では高濃度投与群で有意な抑制を認めた。腹葉では群間で差はみられなかったが、前癌病変から腺癌への進展過程を抑制することが明らかとなった。以上の結果からテルミサルタンは前立腺癌に対する化学予防剤として有望であることが明らかとなった。

A. 研究目的

高血圧症を合併した前立腺再燃癌患者にアンギオテンシン受容体ブロッカー (ARB) を降圧剤として投与したところ血中 PSA は低下し、骨転移巣も軽減して骨痛が改善したという報告が臨床的になされている。また ARB、アンギオテンシン変換酵素阻害剤などのレニン・アンギオテンシン経路に対する薬剤がヒト前立腺癌細胞株の増殖を抑制することが *in vitro* で明らかにされている。しかし実験動物モデルを用いた *in vivo* での研究はなされていないため、我々は当教室で作出した前立腺発がんモデル動物である Transgenic Rat with Adenocarcinoma of Prostate (TRAP)モデルを用いた検討を行ない、テルミサルタンが TRAP における前立腺癌の発生・増殖に対する影響を検討した。

B. 研究方法

離乳直後の3週齢 TRAP 雄ラット36匹を3群に分け、2,3群にはテルミサルタン (2, 10 mg/kg/day) を飲料水投与し、1群はテルミサル

タンを投与しない対照群とした。実験期間12週間で全動物を屠殺剖検し、前立腺を中心に病理組織学的検索を行った。飼育期間中、体重測定および被検物質の摂取量測定を週1回、血圧測定を第4,7,11週に実施した。病理組織学的検索として、H&E染色による腫瘍発生頻度および前癌病変・腺癌の占有率を解析した。テルミサルタンによる細胞増殖抑制効果の機序を解明する目的で、組織標本を用いた Ki-67 labeling index、apoptotic index を計測したほか、腹葉前立腺組織を用いてアポトーシス関連因子および細胞増殖関連因子についてウェスタン解析を行った。また被検物質による性ホルモンに対する影響を確認するため、血清中テストステロンおよびエストラジオール(E2)濃度を測定した。さらに1,3群の腹葉前立腺から Total RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については名古屋市立大学動物実験委員会の許可を得、動物実験指針を遵守して行

い、動物愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

テルミサルタン投与群では体重増加抑制がみられ、高濃度群では有意な抑制が観察された。肝、腎および腹葉前立腺の絶対重量、血清中のテストステロン、エストラジオール値は各群間で差はみられなかった。血中コレステロールは投与群で減少傾向はあるものの有意な差はなかったが、中性脂肪は有意に減少していた。血圧はテルミサルタン投与群で投与量に依存した有意な低下がみられた。前立腺癌は腹葉および側葉に認められ、その発生頻度は腹葉では群間で有意差はみられなかったが、側葉では高濃度テルミサルタン投与群で有意な低下が観察された。腹葉前立腺内の各腺房を Low grade PIN、High grade PIN および腺癌に分類し、それぞれの病変の占有率を定量化した結果、テルミサルタン投与群では腺癌、High grade PIN が減少する一方、Low grade PIN が増加し、前立腺病変のプロGRESSIONに対して抑制効果を示していることが明らかとなった。腹葉における Ki-67 labeling index は群間で差はみられなかったのに対し、apoptotic index はテルミサルタン投与群で濃度に依存して有意な増加が観察された。腹葉前立腺組織を用いてウエスタン解析した結果、活性化カスパーゼ3および7の発現増加、リン酸化 Erk1/2、リン酸化 p38 MAPK の低発現がテルミサルタン投与群で観察された。EGFR リン酸化に対する影響は明らかではなかった。また血管新生に対する影響を検討した結果、腹葉前立腺における血管の数、腔の大きさは群間で有意差はなく、VEGF タンパク発現も明らかな差は観察されなかった。マイクロアレイ解析では ER beta がテルミサルタン投与群で発現上昇を示した遺伝子の一つとして検出されたが、ウエスタン解析では逆に対照群に比較して投与群で発現の低下が観察された。

D. 考察

テルミサルタンはアンギオテンシン受容体に対する阻害活性を有するほか PPAR γ に対してアゴニスト作用を持つことも知られており、今回の実験で中性脂肪値が低下しているのはこの作用によるものである。従ってテルミサルタン投与群でみられた体重減少は PPAR γ アゴニスト作用によるものであり毒性変化ではないものと思われる。現在までに明らかにされている ARB のヒト前立腺癌細胞増殖抑制作用メカニズムとしてアンギオテンシン受容体を阻害することにより β -arrestin, Protein kinase C, EGFR 機能を抑制することで MAPK 活性化を抑え、細胞増殖を抑制することが知られている。今回の TRAP ラットでの検討では MAPK シグナル伝達経路を抑制することによるカスパーゼ3,7 活性化を介したアポトーシスの亢進が考えられ、in vivo においても in vitro での報告と合致するデータであった。最近になって ER beta が AR と協調してアンドロゲン応答遺伝子の転写活性を亢進することが報告されており、今回みられた ER beta の発現低下は前立腺癌の抑制に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

アンギオテンシン受容体ブロッカーの1つであるテルミサルタンの TRAP ラット前立腺癌に対する影響を検討した結果、側葉では前立腺癌発生頻度が抑制され、腹葉では前癌病変から腺癌への進展を抑制されることが明らかとなった。その発がん抑制の主たる作用機序はアポトーシスの亢進によるものであると考えられ、このアポトーシスの惹起は MAPK シグナル伝達経路を抑制することによるカスパーゼ3,7 活性化を介したものと推察された。また ER beta の発現低下も前立腺癌の抑制に深く関与している可能性が示唆された。今回使用したテルミサルタンの投与量は臨床的に使用されている2, 10倍量に相当するにもかかわらず明らかな毒性変化を認めなかったことから、

テルミサルタンはヒト前立腺癌に対する化学
予防剤として極めて有望であると思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tang, M-X., Ogawa, K., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Seeni, A., Suzuki, S., Takahashi, S., Tanaka, T., Ichikawa, K. and Shirai, T. Protective effects of citrus nobiletin and auraptene in transgenic rats developing adenocarcinoma of the prostate (TRAP) and human prostate carcinoma cells. *Cancer Sci.*, 98:471-477, 2007.

Cho, Y-M., Takahashi, S., Asamoto, M., Suzuki, S., Tang, M., and Shirai, T. Suppressive effects of antiandrogens, finasteride and flutamide on development of prostatic lesions in a transgenic rat model. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 10:378-383, 2007.

Uemura, H., Ishiguro, H., Ishiguro, Y., Hoshino, K., Takahashi, S., and Shirai, T. Angiotensin II induces oxidative stress in prostate cancer. *Mol. Cancer Res.*, 6:250-258, 2008.

Seeni, A., Takahashi, S., Takeshita, K., Tang, M., Sato, S., and Shirai, T.: Suppression of prostate cancer growth by resveratrol in the Transgenic Rat for Adenocarcinoma of Prostate (TRAP) model. *Asian Pac J. Cancer Prev.*, (in press).

Yamashita, S., Takahashi, S., McDonell, N., Watanabe, N., Niwa, T., Hosoya, K., Tsujino, Y., Shirai, T., and Ushijima, T.: Silencing of Tgfbr2 in rat prostate cancers due to dense methylation of its promoter CpG island. *Cancer Res.*, (in press).

2. 学会発表

高橋智、シーニアズマン、小川久美子、白井智之、上村博司、窪田吉信、アンギオテンシン受容体ブロッカーによるラット前立腺発がんに対する抑制、がん予防大会 in TOKYO2007 (第14回日本がん予防学会)、東京(2007年7月)。

高橋智、シーニアズマン、石黒斉、上村博司、窪田吉信、唐明希、白井智之、Suppression of prostate carcinogenesis by AT1 blocker in transgenic rat for adenocarcinoma of prostate (TRAP) model. 第66回日本癌学会学術総会、横浜(2007年10月)。

唐明希、小川久美子、朝元誠人、内木綾、二口充、高橋智、田中卓二、白井智之、NobiletinによるPhIP誘発F344ラット前立腺および大腸発がんに対する影響、第66回日本癌学会学術総会、横浜(2007年10月)。

山下聡、高橋智、辻野好美、渡邊直子、丹羽透、細谷浩介、白井智之、杉村隆、牛島特和、Tgfbr2のラット前立腺癌におけるメチル化サイレンシングおよびヒト前立腺癌における発現低下、第66回日本癌学会学術総会、横浜(2007年10月)。

唐明希、朝元誠人、小川久美子、内木綾、二口充、高橋智、白井智之、Bowman-Birk inhibitor (BBI)による前立腺癌の抑制効果、第24回日本毒性病理学会、名古屋(2008年2月)。

Azman Seeni、高橋智、唐明希、佐藤慎哉、白井智之、アンギオテンシン受容体ブロッカーによるラット前立腺発がんに対する影響、第24回日本毒性病理学会、名古屋(2008年2月)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

胃発がん抑制物質の検索

分担研究者 塚本徹哉 愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部長

研究要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*)感染は、慢性胃炎、腸上皮化生、胃がんあるいは胃 MALT リンパ腫発生に大きく関わっている。スナネズミを用いた研究においても、*H. pylori* の除菌は、胃炎や胃がんの抑制に非常に効果的であるが、除菌には、経済的問題、耐性菌発生の危険、副作用の発生等、課題が多いのも事実であり、他の安全かつ安価な方法で炎症を抑制し、胃がんを予防する代替法の開発は急務である。本研究においては、高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤 pitavastatin による抗炎症作用及び腫瘍発生抑制効果を検討した。5 週齢スナネズミに *H. pylori* を感染させ、2 週後より N-methyl-N-nitrosourea を投与し、8 週後から 10、3、1 ppm pitavastatin を混餌投与し、52 週で屠殺した。その結果、期待に反して、*H. pylori* 感染スナネズミでは、statin 投与により、血清総コレステロールやトリグリセリド値の上昇が認められた。組織学的に炎症所見の軽快は見られず、逆に胃粘膜の IL-1 β 、TNF- α の mRNA 転写量の増加が見られた。胃がん発生率には、統計学的に有意な変化は観察されなかった。疫学的にも、statin ががんの予防に効果があるという報告やないとする報告があり、今後更なる検討が必要である。

A. 研究目的

Helicobacter pylori (*H. pylori*)感染は、慢性胃炎、腸上皮化生、胃がん、あるいは胃 MALT リンパ腫の発生に大きく関わっていることが明らかにされてきた。1994年には、World Health Organization (WHO) / International Agency for Research on Cancer (IARC)によって、動物モデルによる確認が必要としながらも、*H. pylori*は胃がんの“definite carcinogen”と報告され注目された。その後、2000年には、*H. pylori*除菌療法が保険適応となり、治療に大きく貢献したが、近年では、抗生物質耐性の出現や副作用等が臨床上大きな問題となっており、胃発がんを予防し得る安価かつ安全な食品あるいは化学物質の開発が急務である。また、萎縮の進行例ほど発がんのリスクが高く、その対応も重要である。近交系スナネズミ(Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*)に *H. pylori*が安定して感染することが見出されて以来、*H. pylori*感染による炎症と腺胃発がん率が強く相関することを見いだしてきた。近年、メタボリックシンドロームと発がんへの関与について多くの研究が報告されている。

本研究においては、N-methyl-N-nitrosourea (MNU)誘発*H. pylori*感染スナネズミ腺胃発がん系を用いて、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害剤である脂溶性 statin 系薬剤 pitavastatin [(+) -monocalcium bis (3,5,6) -7[-2-cyclopropyl-4(-4-fluorophenyl) -3-quinolyl] -3,5-dihydroxy-6-heptenoate]の抗炎症作用及び胃発がん抑制作用を検討し、胃がんの化学予防に資することを目的とする。

B. 研究方法

5 週齢♂スナネズミ (Seac Yoshitomi) 175 匹を 6 群に分け、F、G、H、I 群に *H. pylori* (ATCC43504 株) 約 1×10^8 cfu を強制胃内投与し、2 週後から 10 ppm MNU を 20 週間飲水投与した。J、K 群には broth のみ投与した。第 8 週より、10 (F、J 群)、3 (G 群)、1 (H 群) ppm の pitavastatin (興和) を混餌投与、K 群は基礎食 (CE-2、クレア) のみ投与し対照群とした。実験 52 週で屠殺し、腺胃における炎症細胞浸潤の程度の検討、発がん率、血清総コレステロール (T-chol) 及びトリグリセ

リド (TG) 値の検討を行った。また、胃粘膜における cyclooxygenase-2 (Cox-2)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、interleukin 1-beta (IL1- β) の mRNA の発現量を定量的に検討した。

(倫理面への配慮)

動物は必要最小限の頭数を用いるよう十分な準備を行ったうえで開始した。実験は、愛知県がんセンター動物実験施設の実験動物取り扱い規定を遵守し、遂行した。

C. 研究結果

- 1) 胃がん発生率：各群の胃がん発生率は、コントロール群 (I 群) が 41.5% (17/41)、10、3、1 ppm pitavastatin 投与群 (それぞれ F、G、H 群) が、45.0% (18/40) [I 群にとの比較：P=0.82]、56.4% (22/39) [P=0.26]、50.0% (20/40) [P=0.51] と統計学的に有意な変化は見られなかった。MNU 非投与の J、K 群には腫瘍の発生は見られなかった。
- 2) 組織学的炎症所見：組織学的に、好中球、単核球、過形成、腸上皮化生、粘膜過形成及び異所性増殖性腺管の増生の所見を幽門部、胃体部に分けて、スコア 0~3 にスコアリングした。幽門部の好中球浸潤の程度は、F、G、H、I 群それぞれ、 2.0 ± 0.7 、 2.1 ± 0.6 、 2.0 ± 0.7 、 1.8 ± 0.6 、単核球浸潤の程度は、それぞれ、 2.8 ± 0.4 、 2.7 ± 0.4 、 2.7 ± 0.4 、 2.6 ± 0.5 と有意な差は見られなかった。腸上皮化生は、I 群の 1.0 ± 0.7 に対して、F、G、H 群では、 1.2 ± 0.8 、 1.3 ± 0.8 、 1.3 ± 0.9 であり、粘膜過形成の程度は、それぞれの群で、 2.3 ± 0.7 、 2.3 ± 0.7 、 2.3 ± 0.6 、 2.1 ± 0.7 と著変なかった。胃底腺領域に関しても各群で有意な変化は観察されなかった。
- 3) 胃粘膜における炎症性サイトカインの発現変化：幽門腺における IL-1 β 、Cox-2、iNOS、TNF- α の mRNA の発現量を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、IL-1 β では、I 群を 1 とした時 (平均 \pm SE: 1.00 ± 0.14)、F、G、H 群で、それぞれ、 2.65 ± 0.62 (I 群との比較：P<0.05)、 2.44 ± 0.37 (P<0.01)、 2.71 ± 0.54 (P<0.01) 倍と有意な上昇が見られた。Cox-2 では、I 群を 1 とした時 (平均 \pm SE: 1.00 ± 0.13)、F、G、H 群それぞれ、 0.49 ± 0.10 、 1.44 ± 0.23 、 1.51 ± 0.55 倍と有意な差は認められなかった。iNOS は、I 群を 1 とした時 (平均 \pm SE:

1.00 ± 0.30)、F、G、H 群それぞれ、 1.98 ± 0.68 、 1.82 ± 0.41 、 1.83 ± 0.36 倍と上昇傾向にあったが統計学的に有意ではなかった。TNF- α は、I 群を 1 とした時 (1.00 ± 0.17)、それぞれ、 2.09 ± 0.39 (P<0.01)、 1.69 ± 0.21 (P<0.05)、 1.87 ± 0.25 (P<0.01) 倍と有意な上昇が見られた。

- 4) 血清脂質の変化：未処置群 (K 群) の血清 T-chol 117.2 ± 8.0 mg/dl (平均 \pm SE) に対して、J 群では 136.2 ± 14.5 と著変なかったが、H. pylori 感染群 (I 群) で 143.8 ± 6.4 と上昇し、更に statin 投与によって (F、G、H 群)、 190.8 ± 6.0 (I 群との比較：P<0.01)、 173.5 ± 6.3 (P<0.05)、 172.6 ± 8.5 (P<0.05) と有意に上昇した。TG も H. pylori 感染によって、 274.6 ± 108.4 mg/dl (K 群) から 846.8 ± 86.7 (I 群) への有意 (P<0.05) に上昇した。更に statin 投与によって (F、G、H 群)、 1615.2 ± 126.8 (I 群との比較：P<0.01)、 1312.0 ± 109.0 (P<0.05)、 1135.3 ± 119.4 へと上昇した。

D. 考察

HMG-CoA 還元酵素阻害剤 Statin は、T-chol 特に LDL-chol の低下、更には TG の低下作用により、脂質代謝を改善する薬剤である。Pravastatin、Rosuvastatin のような水溶性のものと Simvastatin、Fluvastatin、Atorvastatin、Pitavastatin のような脂溶性のものが開発されている。前者は肝選択性が強く、後者は多臓器に分布しやすいという特徴がある。ヒトでは、Simvastatin、Fluvastatin、Atorvastatin、Rosuvastatin は、cytochrome P450 (CYP) により代謝を受けるが、Pravastatin、Pitavastatin は CYP による代謝を受けないことが知られている。スナネズミでは、ヒトや他の齧歯類であるマウスやラットとも代謝が異なる事が経験的に知られているため、代謝を受けず、多臓器に分布しやすい pitavastatin を選択した。これは、半減期も比較的長く、作用も強いという利点がある。スナネズミに pitavastatin を投与した結果、長期的には T-chol や TG 値の抑制効果は弱く、H. pylori 感染でかえってこれらの上昇がみられるというパラドキシカルな結果が得られた。スナネズミは、元来、高脂血症であるため、この現象がスナネズミに特異的なものか、他の齧歯類にも共通の事象か、現在、マウス (C57BL/6J) を用いて検討中である。

H. pylori 感染スナネズミの胃粘膜の炎症所見を見ると、植物性リグナンや菜種油中の抗酸化物質である canolol を用いた胃がんの予防の検討を行った時は、組織学的な炎症所見や腸上皮化生の抑制、更には胃がんの予防が認められ、同時にこれらのサイトカインの低下が確認された。今回、pitavastatin 投与によって組織学的には大きな変化は見られず、炎症性サイトカインのうち、IL-1 β 、TNF- α mRNA の発現が有意に上昇していた。胃発がん率を見ると、統計学的に有意な変化はなく、胃がんの予防効果は得られなかった。

Statin のがん細胞に対する作用として、in vitro では、培養細胞の細胞周期の制御や増殖抑制の作用が報告されている。実験動物を用いた in vivo のモデルにおいても、舌がんや大腸がんの抑制に効果があることが報告されている。しかし、疫学的には、効果があるという報告やないという報告があり、一定の見解は得られておらず、今後、更なる検討が必要であると考えられる。

E. 結論

H. pylori 感染は、慢性胃炎、腸上皮化生、あるいは胃がん等の胃病変に大きく関わっており、スナネズミを用いた研究においても、H. pylori 感染とそれに伴う炎症は腺胃発がんのプロモーターであることが明らかとなっている。実験的にも H. pylori の除菌は、胃炎や胃がんの抑制に非常に効果的である。また、除菌を行わなくても、炎症を抑制する事で、胃がんの予防になる事も証明されている。H. pylori 感染者全てが胃がんを発生する訳ではなく、またその除菌には、経済的問題、耐性菌発生の危険、副作用の発生等、課題が多いのも事実である。近年、メタボリックシンドロームの概念の浸透と共に、脂質代謝が注目されており、がんの予防につながる報告もあるが、スナネズミモデルを使った本研究においては、胃がんの予防には至らなかった。

しかしながら、胃の組織学的な炎症所見、炎症性サイトカインの値と胃発がん率がほぼ相関することが示された事から、今後、抗炎症作用を指標に胃がん抑制物質の探索を目指したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Cao, X., Tsukamoto, T., Nozaki, K., Tanaka,

H., Cao, L., Toyoda, T., Takasu, S., Ban, H., Kumagai, T., and Tatematsu, M. Severity of gastritis determines glandular stomach carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci.*, 98: 478-483 (2007)

(2) Takenaka, Y., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Ogasawara, N., Hirano, N., Otsuka, T., Ban, H., Nakamura, T., Yamamura, Y., Kaminishi, M., and Tatematsu, M. Gastric and intestinal phenotypic correlation between exocrine and endocrine components in human stomach tumors. *Histol. Histopathol.*, 22: 273-284 (2007)

(3) Toyoda, T., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Nishibe, S., Deyama, T., Takenaka, Y., Hirano, N., Tanaka, H., Takasu, S., Ban, H., Kumagai, T., Inada, K., Utsunomiya, H., and Tatematsu, M. Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid, a plant lignan, on Helicobacter pylori-associated gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Cancer Sci.*, 98: 1689-1695 (2007)

(4) Cao, X., Tsukamoto, T., Seki, T., Tanaka, H., Morimura, S., Cao, L., Mizoshita, T., Ban, H., Toyoda, T., Maeda, H., and Tatematsu, M. 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *Int. J. Cancer*, 122: 1445-1454 (2008)

(5) Toyoda, T., Tsukamoto, T., Hirano, N., Mizoshita, T., Kato, S., Takasu, S., Ban, H., and Tatematsu, M. Synergistic upregulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric mucosa of Mongolian gerbils by a high-salt diet and Helicobacter pylori infection. *Histol. Histopathol.*, 23: 593-599 (2008)

2. 学会発表

(1) 塚本徹哉、豊田武士、溝下 勤、高須伸二、立松正衛、西部三省、植物由来リグナン類による Helicobacter pylori 感染スナネズミの胃がん予防効果、第 14 回日本がん予防学会総会 (がん予防大会 in Tokyo 2007)、東京、(2007 年 7 月)

(2) 豊田武士、塚本徹哉、平野直樹、高須伸二、立松正衛、NF- κ B 阻害剤 (caffeic acid phenethyl ester ; CAPE) の H. pylori 感染ス

ナネズミ胃炎に対する抗炎症効果、第14
回日本がん予防学会総会（がん予防大会 in
Tokyo 2007）、東京、（2007年7月）

FI. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

がん化学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究に関する研究
分担研究者 今岡達彦 放射線医学総合研究所研究員

研究要旨

ラット乳がん実験モデルを用いて、個体の肥満状態と腫瘍におけるレニン・アンジオテンシン系の遺伝子発現が関連することが示され、この系を抑制する化学予防法の有効性が示唆された。

A. 研究目的

肥満モデルと発癌モデルを複合した動物実験系を用いて、肥満が乳癌のリスク因子となる原因としてアディポサイトカインの発がん促進作用が関わるかどうかを調べ、化学予防の標的としての可能性を検討する。

B. 研究方法

過去に行ったラット放射線発がん実験における乳がんの遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。高発現の見られた候補遺伝子について、定量的RT-PCR法により肥満との関連を検討した。
(倫理面への配慮)放射線医学総合研究所動物実験委員会承認の下、諸規定を遵守しつつ実施した。

C. 研究結果

1A型アンジオテンシン受容体などレニン・アンジオテンシン系の一部の遺伝子が肥満個体の乳がんにおいて高発現を示した。また予防実験の準備として、肥満モデルと組み合わせたラット乳腺発がん実験を開始した。

D. 考察

アンジオテンシンは昇圧系のホルモンとして知られるが、内臓脂肪で産生されるアディポサイトカインでもあり、メタボリック症候群の高血圧症の一因とも考えられている。ヒト乳がんにおいても同受容体の発現が知られている。今回の結果は、肥満個体における乳がん発症をアンジオテンシン受容体拮抗薬によって予防できる可能性を示唆している。

E. 結論

肥満と発がんを複合したラット実験モデルにおいて、脂肪組織に由来するアンジオテンシンの作用を抑制する予防法が有効である可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Imaoka T et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69(1):194-203, 2007
- Shimada Y et al. *Gene Environ* 29(2):29-37, 2007
- 今岡他, 乳癌基礎研究 16:5-10, 2007
- 西村他, 乳癌基礎研究 16:11-15, 2007
- 波多野他, 乳癌基礎研究 16:17-21, 2007

2. 学会発表

- Imaoka T et al. 13th Int Congr Radiat Res, 2007.7
- 今岡他, 第17回乳癌基礎研究会, 2007.7
- 今岡他, 第22回発癌病理研究会, 2007.8
- 今岡他, 日本放射線影響学会第50回大会, 2007.11
- 甘崎他, 日本放射線影響学会第50回大会, 2007.11
- 波多野他, 日本放射線影響学会第50回大会, 2007.11
- 飯塚他, 第145回日本獣医学会, 2008.3
- Nishimura M et al. 13th Int Congr Radiat Res, 2007.7
- Kakinuma S et al. 13th Int Congr Radiat Res, 2007.7
- Amasaki Y et al. 13th Int Congr Radiat Res, 2007.7
- Shimada Y et al. 13th Int Congr Radiat Res, 2007.7
- Tomita T et al. 1st Asian Conf Environ Mut/36th Ann Meet Jpn Environ Mut Soc, 2007.11

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

脂肪細胞とアディポカイン

分担研究者 窪田 直人 東京大学

研究要旨 抗糖尿病作用・抗腫瘍作用が報告されているアディポネクチンの中枢における役割について検討を行った結果、アディポネクチン受容体 AdipoR1/AdipoR2 はいずれも視床下部弓状核に発現しており、また髄液中にはアディポネクチンが存在し、末梢循環から髄液中に移行することが確認された。アディポネクチンは AdipoR1 を介して視床下部弓状核の AMPK を活性化し、再摂食後の食欲を増加させ、個体のエネルギー消費を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

アディポネクチン(Ad)は骨格筋や肝臓の AMPK を活性化し、インスリン抵抗性改善作用を有することが報告されている。しかしその中枢作用については、末梢に投与した Ad は中枢に移行し、個体の酸素消費量を増加させ体重減少を引き起こすという報告がある一方、脳の血管内皮細胞には Ad 受容体は存在するものの、Ad は髄液中には存在しないという報告もあり、Ad の中枢作用は十分には解明されていない。そこで我々は Ad の中枢における生理的役割に注目し研究を行った。

B. 研究方法

マウスは C57Bl/6 マウスおよび我々が以前に樹立した Ad 欠損マウスを使用した。視床下部における Ad 受容体(AdipoR1/AdipoR2)の発現は Taqman にて、AMPK 活性についてはそのリン酸化の程度で評価した。また髄液中の Ad の濃度については ELISA 法にて、またそのフォームは Western にて検討した。

(倫理面への配慮) 動物実験は、東京大学動物実験委員会ならびに東京大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て実施し、動物愛護を十分に考慮した。

C. 研究結果

AdipoR1/AdipoR2 はいずれも視床下部弓状核にその発現が認められ、免疫組織学的検討により AdipoR1 とレプチン受容体は視床下部弓状核において colocalize していること明らかとなった。また C57Bl/6 マウスの髄液中には血清中の約 1/4000 の濃度で Ad が存在し、Ad 欠損マウスに対し外来性に Ad を静注する

と Ad が末梢循環から髄液中に移行することが確認された。興味深いことに、髄液中の Ad は、血清中とは異なり 12 量体以上の多量体は存在せず、6 量体と 3 量体のみであった。また血中や髄液中の Ad 濃度や視床下部 AdipoR1 の発現はいずれも絶食時に高く、摂食後に有意に低下していた。

そこで Ad の摂食やエネルギー調節における役割について検討したところ、Ad は AdipoR1 を介して視床下部弓状核の AMPK を活性化し、再摂食後の食欲を増加させ、個体のエネルギー消費を抑制することが明らかとなった。さらに Ad 欠損マウスでは、絶食時の視床下部弓状核の AMPK 活性が野生型マウスに比較して低く、高脂肪食下において摂食量の低下と酸素消費量の増加が認められた。以上のことから、Ad は末梢より髄液中に移行するが、血清中とは異なる多量体構造をとって存在すること、また血中、髄液中の Ad 濃度や視床下部 AdipoR1 の発現は絶食時に高く、Ad は、視床下部弓状核の AMPK 活性化を介して食欲を増加させ、エネルギー消費を低下させることが明らかとなった。

D. 考察

今回の研究より、Ad の生理的な役割が明らかになった。すなわち、Ad はレプチンと協調して摂食を調節していることが明らかとなった。絶食時、血清中のレプチンレベルは低下し、逆に血清中・髄液中の Ad レベル、視床下部における AdipoR1 受容体の発現は上昇し、AMPK の活性化を介して食欲を増加させる。一方摂食後は、血清中・髄液中の Ad レベル、視床下部における AdipoR1 受容体の発現は低下し、血清中のレプチンレベルが増加して

AMPK 活性抑制を介して食欲を低下させる。このようにレプチンと Ad は協働して摂食調節に寄与していることが初めて明らかとなった。またこうした短期のエネルギー調節だけでなく、アディポカインであるレプチンや Ad は長期的なエネルギー調節、すなわち体脂肪量の調節にも重要な役割を果たしていると考えられる。すなわち脂肪量が低下するとレプチンは低下し Ad は増加し、エネルギー代謝を抑制し脂肪蓄積を増加するように働く。一方脂肪量が増加すると今度は逆にレプチンが増加し Ad が低下し、エネルギー代謝が亢進して脂肪蓄積が過度に起こらないように働く。このようにレプチンと Ad は短期的なあるいは長期的なエネルギー調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

ところがこうした脂肪量調節が破綻し、肥満の状態になってしまった状態を考えると、血清中では先に述べたように特に高分子量型 Ad が低下する。そのため、骨格筋や肝臓において脂肪酸酸化が減少し、脂肪蓄積が増加、インスリン抵抗性をさらに増悪させる原因となる。一方、中枢では肥満になっても 6 量体あるいは 3 量体 Ad は比較的保たれるため、食欲抑制やエネルギー代謝亢進が起こらず、肥満になる前の状態が維持されてしまう。こうした末梢組織と中枢における作用が相まってさらに肥満やインスリン抵抗、メタボリックシンドロームの増悪をきたしている可能性が示唆される。

最後に Ad の進化における役割について考察してみると、進化において最も大切なことはいかに飢餓状態を生き残るかにあったと考えられる。Ad は飢餓の状態ではその分泌が増加し、6 量体と 3 量体は中枢に作用して食欲を増加させエネルギー代謝を低下させ、脂肪を少しでも蓄積するように作用する。一方多量体 Ad は、やはり飢餓のときに脂肪組織から分泌される脂肪酸を肝臓や骨格筋で燃焼し、生存に必要なエネルギーを獲得していたと考えられる。このことはまた末梢組織における糖利用を減少させ、脳への糖の供給を増加させる作用もあったと考えられる。このように Ad は飢餓の時代、エネルギーあるいは糖を儉約する儉約遺伝子として作用し生存に必須であったと考えられる。このことがレプチン受容体とは異なり、Ad 受容体ホモログが下等生物（酵母）から高等生物（ヒト）まで種を超えて保存されている理由かもしれない。

E. 結論

アディポネクチンは AdipoR1 を介して視床下部弓状核の AMPK を活性化し、再摂食後の食欲を増加させ、個体のエネルギー消費を抑制することが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ebinuma H, Miida T, Yamauchi T, Hada Y, Hara K, Kubota N, Kadowaki T. Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* 53: 1541-1544, 2007.
- 2) Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. *Cell Metab.* 6: 55-68, 2007.
- 3) Kume S, Uzu T, Araki S, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Handeda M, Kashiwagi A, Koya D. Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 2715-2723, 2007.
- 4) Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett.* 582(1):74-80, 2008.

2. 学会発表

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2007 年 5 月 仙台)

・岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 仁尾 泰徳, 羽田 裕亮, 窪田 直人, 植木 浩二郎, 戸辺 一之, 門脇 孝
過食や高脂肪食による耐糖能障害を補充によって改善させるアディポネクチン様作用を有する分子の探索

・羽田 裕亮, 山内 敏正, 仁尾 泰徳, 河本 幸子, 窪田 直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝「脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスにおけるアディポネクチン及びアディポネクチン受容体補充によるインスリン抵抗性改善作用」

・岩部 美紀, 山内 敏正, 岩部 真人, 小林 加奈子, 仁尾 泰徳, 栗澤 元晴, 窪田 直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝「過食・高脂肪食などによる耐糖能障害を改善しうるアディポネクチン受容体 AdipoR のアゴニストの野菜・

果物などからの探索・解析

・山口 麻美子, 山内 敏正, 仁尾 泰徳, 小林 加奈子, 戸辺 一之, 窪田 直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝「過食や高脂肪食によるメタボリックシンドロームに対するアンジオテンシン受容体拮抗薬カンデサルタンの効果」

・高沢克子, 窪田直人, 寺内康夫, 門脇孝「脂肪組織特異的恒常活性型 PPAR γ 2 過剰発現マウスの解析」

・窪田直人, 窪田哲也, 小園秀樹, 伊藤晋介, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康夫, 戸辺一之, 門脇孝「アディポネクチンの中核における役割の検討」

・大石由美子, 真鍋一郎, 戸辺一之, 窪田直人, 門脇孝, 永井良三「転写因子 KLF5 は代謝ストレス応答を制御する」

・山内敏正, 仁尾泰徳, 岩部真人, 岩部美紀, 河本幸子, 羽田裕亮, 山口麻美子, 粟澤元晴, 高本偉碩, 窪田直人, 植木浩二郎, 門脇孝「アディポネクチン受容体の生理的・病態生理的意義の解明」

・粟澤元晴, 植木浩二郎, 金子和真, 窪田直人, 山内敏正, 門脇孝「アディポネクチンによるインスリン感受性亢進のメカニズムの解明」

・中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 大山純加, 島崎裕子, 永木淳一, 門脇孝, 寺内康夫「高脂肪食負荷グルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおけるグルコキナーゼ活性化薬の効果」

・峯山智佳, 高本偉碩, 窪田直人, 橋本信嗣, 宮崎純一, 門脇孝「IRS-2 flox/flox 膵 β 細胞株の樹立」

・高本偉碩, 寺内康夫, 窪田直人, 鈴木亮, 橋本信嗣, 窪田哲也, 峯山智佳, 伊藤晋介, 中村昭伸, 山内敏正, 植木浩二郎, 戸辺一之, 門脇孝「高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性に対する膵 β 細胞過形成の分子メカニズムの解明」

・橋本信嗣, 岡本昌之, 窪田直人, 今泉美佳, 江藤一弘, 菅野隆浩, 高本偉碩, 山内敏正, 植木浩二郎, 泉井亮, 寺内康夫, 野田光彦, 永松信哉, 門脇孝「アディポネクチンはインスリン分泌を促進する」

・金子和真, 植木浩二郎, 橋本信嗣, 粟沢元晴,

窪田直人, 戸辺一之, 門脇孝「膵 β 細胞における Class IA PI3 キナーゼの役割」

・伊藤晋介, 窪田直人, 窪田哲也, 小園秀樹, 高本偉碩, 峯山智佳, 橋本信嗣, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康夫, 戸辺一之, 門脇孝「肝臓特異的 IRS-2 欠損マウスはインスリン抵抗性、耐糖能異常を呈する」

・窪田哲也, 窪田直人, 小園秀樹, 伊藤晋介, 高本偉碩, 峯山智佳, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康夫, 戸辺一之, 門脇孝「血管内皮細胞におけるインスリン受容体基質(IRS)-2 の役割の解明」

・山内敏正, 窪田直人, 原一雄, 植木浩二郎, 戸辺一之, 門脇孝「脂肪細胞とアディポサイトカイン アディポネクチン・アディポネクチン受容体の生理的・病態生理的意義」

第 50 回日本腎臓学会 (2007 年 5 月 浜松)

・吉岡恭子, 脇野修, 林晃一, 立松覚, 本間康一郎, 長谷川一宏, 菅野直希, 原義和, 窪田直人, 門脇孝, 猿田享男, 伊藤裕「虚血再灌流腎症における PPAR γ の forkhead transcription factor を介する作用」

日本内分泌学会(2007 年 6 月 東京)

・青木一孝, 窪田哲也, 岩崎知之, 森秀一, 窪田直人, 高本偉碩, 徳山薫平, 寺内康夫「PI3 キナーゼ p85 α 欠損マウスにおける肝臓でのインスリン作用と糖代謝の検討」

・中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 門脇孝, 寺内康夫「グルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおける高脂肪食負荷と妊娠に対する膵 β 細胞量調節機構の差異」

第 44 回日本臨床分子医学会学術総会 (2007 年 7 月 和歌山)

・窪田哲也, 窪田直人, 熊谷洋紀, 小園秀樹, 伊藤晋介, 植木浩二郎, 門脇孝「血管内皮細胞におけるインスリン受容体基質 2 の役割の解明」

・中村昭伸, 高本偉碩, 窪田直人, 大山純加, 島崎裕子, 永木淳一, 門脇孝, 寺内康夫「グルコキナーゼ活性化薬の膵 β 細胞量に及ぼす影響」

・山内敏正, 原一雄, 窪田直人, 植木浩二郎, 戸辺一之, 門脇孝「メタボリックシンドローム アディポネクチン/AdipoR の病態生理的意義」

・戸辺一之, 窪田直人, 門脇孝「中枢による摂食及び代謝調節の分子機構 中枢におけるインスリン・アディポネクチンシグナルの役割」

日本抗加齢医学会7回総会(2007年7月 京都)

・脇野修, 吉岡恭子, 長谷川一宏, 立松覚, 原義和, 窪田直人, 林晃一, 伊藤裕「虚血再還流腎症におけるPPAR γ の Forkhead transcription factor を介する作用」

第12回アディポサイエンス研究会 (2007年8月 大阪)

・岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 仁尾 泰徳, 羽田 裕亮, 窪田直人, 植木 浩二郎, 戸辺 一之, 門脇 孝「The physiological mechanisms on adiponectin-signaling pathways in the skeletal muscle using AdipoR-knockout mice」

・岩部 美紀, 山内 敏正, 岩部 真人, 仁尾 泰徳, 羽田 裕亮, 窪田直人, 植木 浩二郎, 戸辺 一之, 門脇 孝「Searches for molecules that could compensate for adiponectin deficiency -Clq/TNF α related protein family and osmotin family-」

・窪田直人, 窪田哲也, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康夫, 箕越靖彦, 門脇孝「アディポネクチンの中枢における役割の検討」

第28回日本肥満学会 (2007年10月 東京)

・岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 仁尾 泰徳, 羽田 裕亮, 山口 麻美子, 廣瀬 理沙, 粟澤 元晴, 高本 偉碩, 窪田直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝「AdipoR 欠損マウスを用いたアディポネクチン経路の骨格筋における生理的意義の解明」

・岩部 美紀, 山内 敏正, 岩部 真人, 仁尾 泰徳, 羽田 裕亮, 窪田直人, 植木 浩二郎, 戸辺 一之, 門脇 孝「過食や高脂肪食による耐糖能障害を補充により改善するアディポネクチン様作用を有する分子の探索」

・小林 加奈子, 山内 敏正, 河本 幸子, 窪田直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝「SPPARM 活性を有する ARB のメタボリックシンドロームモデルマウスに対する作用」

・山口 麻美子, 山内 敏正, 仁尾 泰徳, 窪

田直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝「ARB はアディポネクチン及び AdipoR を増やし, 抗メタボリックシンドローム作用を発揮する」

・廣瀬 理沙, 山内 敏正, 岩部 美紀, 岩部 真人, 小林 加奈子, 仁尾 泰徳, 窪田直人, 植木 浩二郎, 門脇 孝「過食・高脂肪食などによる耐糖能障害を改善しうるアディポネクチン受容体アゴニストの探索・解析」

・窪田直人, 窪田哲也, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康夫, 箕越靖彦, 門脇孝「アディポネクチンの中枢における役割の検討」

第22回日本糖尿病・肥満動物学会 (2008年2月 東京)

・窪田直人, 窪田哲也, 伊藤晋介, 高本偉碩, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康夫, 戸辺一之, 門脇孝:「肝臓特異的 Irs2 欠損マウスはインスリン抵抗性, 耐糖能異常を呈する」

・窪田直人, 窪田哲也, 山内敏正, 植木浩二郎, 寺内康夫, 箕越靖彦, 門脇孝:「アディポネクチンの中枢における役割の検討」

・窪田哲也, 窪田直人, 熊谷洋紀, 小園秀樹, 高橋雄大, 伊藤晋介, 植木浩二郎, 門脇孝:「血管内皮細胞におけるインスリン受容体基質(IRS)2の役割の解明—血管内皮細胞特異的 IRS2 欠損マウスを用いて—」

67th American Diabetes Association

(Chicago, USA / June, 2007)

・ Endothelial-cell Specific IRS-2 Deficient Mice Showed Endothelial Dysfunction And Muscle Insulin Resistance. TETSUYA KUBOTA, NAOTO KUBOTA, HIDEKI KOZONO, SHINSUKE ITOH, MASAO MOROI, KAORU SUGI, TOSHIMASA YAMAUCHI, KOHJIRO UEKI, YASUO TERAUCHI, KAZUYUKI TOBE, TAKASHI KADOWAKI

・ Adiponectin Stimulates AMP-activated protein kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. NAOTO KUBOTA, WATARU YANO, TETSUYA KUBOTA, KOHJIRO UEKI, TOSHIMASA YAMAUCHI, YASUO TERAUCHI, OSAMU EZAKI, KAZUYUKI TOBE, YASUHIKO MINOKOSHI, TAKASHI KADOWAKI

・ Impact of Small Molecule Glucokinase Activator on Glucose Metabolism in Response to

High-Fat-Diet in Mice with β -Cell Specific Haploinsufficiency of Glucokinase Gene. AKINOBU NAKAMURA, ISEKI TAKAMOTO, NAOTO KUBOTA, SUMIKA OHYAMA, HIROKO SHIMAZAKI, JUNICHI EIKI, TAKASHI KADOWAKI, YASUO TERAUCHI

14th Japan - Korea Symposium on Diabetes Mellitus

(Kyoto, Japan / October, 2007)

・ GLUCOKINASE AND IRS-2 ARE REQUIRED FOR COMPENSATORY BETA CELL HYPERPLASIA IN RESPONSE TO HIGH-FAT DIET-INDUCED INSULIN RESISTANCE. Iseki Takamoto, Yasuo Terauchi, Naoto Kubota, Kazuyuki Tobe, Takashi Kadowaki.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

厚生労働科学研究補助金(第3次がん総合戦略研究事業)
分担研究報告

がん科学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究に関する研究

分担研究者 河田 純男 山形大学副学長

研究要旨

大腸腺腫および早期癌において、健常者と比較して、血中アディポネクチン値および血中 HDL コレステロール値が有意に低く、かつインスリン抵抗性が強く、中性脂肪値が有意に高いことが明らかになった。このことから、メタボリックシンドロームが大腸腺腫および早期癌の発症リスクになることが示唆された。

A. 研究目的

本研究は大腸癌発症におけるメタボリックシンドロームの影響を明らかにすることを目的として、臨床症例の検討を行う。

B. 研究方法

大腸腺腫 64例、早期癌 39例を対象とし、血中アディポネクチン値、HDL コレステロール値、中性脂肪値およびインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR、遊離脂肪酸、高感度 CRP、IGF-1、IGFBP-3、PAI-1、レプチン、レジスチン、TNF- α などを測定した。なお、対照として健常者 27例と比較した。

C. 研究結果

大腸腺腫および早期癌において、健常者と比較して、血中アディポネクチン値および血中 HDL コレステロール値が有意に低く、かつインスリン抵抗性が強く、中性脂肪値が有意に高いことが明らかになった。一方、肥満指数 BMI は大腸腫瘍患者と健常者の間に有意差は認めなかった。このことから、メタボリックシンドロームが大腸腺腫および早期癌の発症リスクになることが示唆された。

D. 考察

大腸腺腫、早期大腸癌においてインスリン抵抗性が強く、メタボリックシンドロームのリスク要因を伴うことが示唆された。従来から、インスリン抵抗性があると、IGFBP が低下

し、freeIGF-1 分画が増加することが知られている。この free IGF-1 分画の増加は大腸発癌につながると考えられている。

また、アディポネクチンは脂肪細胞特異的に分泌されるホルモンであるが、インスリン抵抗性作用を有している。また、抗炎症作用を持つことが

知られており、アディポネクチンが低下すると、糖尿病や動脈硬化の発症につながると考えられている。一方、このホルモンの低下が大腸発癌にどのようにかわるのか、いまだに明らかではないが、乳癌、子宮内膜癌など生活習慣とかわりの深い癌において低アディポネクチンは発癌のリスクになると示唆されている。

E. 結論

大腸腺腫および早期大腸癌の発症にインスリン抵抗性、低アディポネクチン値、低 HDL コレステロール値および高中性脂肪がリスク要因になることが明らかとなった。しかし、BMI はリスク要因にならないことが示された。本研究から内蔵脂肪蓄積を基盤とするメタボリックシンドロームは大腸腫瘍発症に影響を与えることが結論づけられた。

G. 研究発表

論文発表