

## はじめに

図 1, 2 に示すように、がんの死亡率は一定ではなく、時代とともに変化しています。日本でこれまで多かった胃がんや子宮頸がんは最近では減少し、以前には少なかった肺がんや大腸がんが増えてきています。このようにがんの部位別死亡率が変化しているのは、がんの発生に影響を及ぼす環境の変化によると考えられています。したがって、環境をがんが発生しにくい状況に変化させることにより、がんの発生をある程度予防することができることが期待できます。

ここでは、日本において急激に増加し、女性における部位別のがん死亡率が 2003 年に 1 位となった大腸がんを例にあげて、がん予防研究の最先端を紹介したいと思います。

発がんの予防法の開発には大きく分けて 2 つの研究方針があります。一つは食事や運動、喫煙、飲酒などの習慣を変える生活習慣変容であり、もう一つは化学物質を投与して発がんを予防するがんの化学予防です。おおむね一般集団や発がんの軽度高危険度群に対しては生活習慣変容を、発がんの超高危険度群に対しては化学予防による発がん予防を中心に研究されています。まず、最初に生活習慣変容のために行われている疫学研究を、次に化学予防法の研究を紹介します。

### 1 大腸がんの発生に影響を与える環境因子

日本における大腸がんは急激に増加しましたが、なぜでしょうか。この理由として「大腸がんが増加した理由は食事の西洋化である」という記載をよくみますが、本当でしょうか。

食事の西洋化とは、主に脂肪摂取量の増加と、食物繊維の摂取量の減少を指していることが多いです。確かに、最近の日本人の食事は、脂肪摂取量は 1960 年ころから急激に増加していますし、食物繊維の

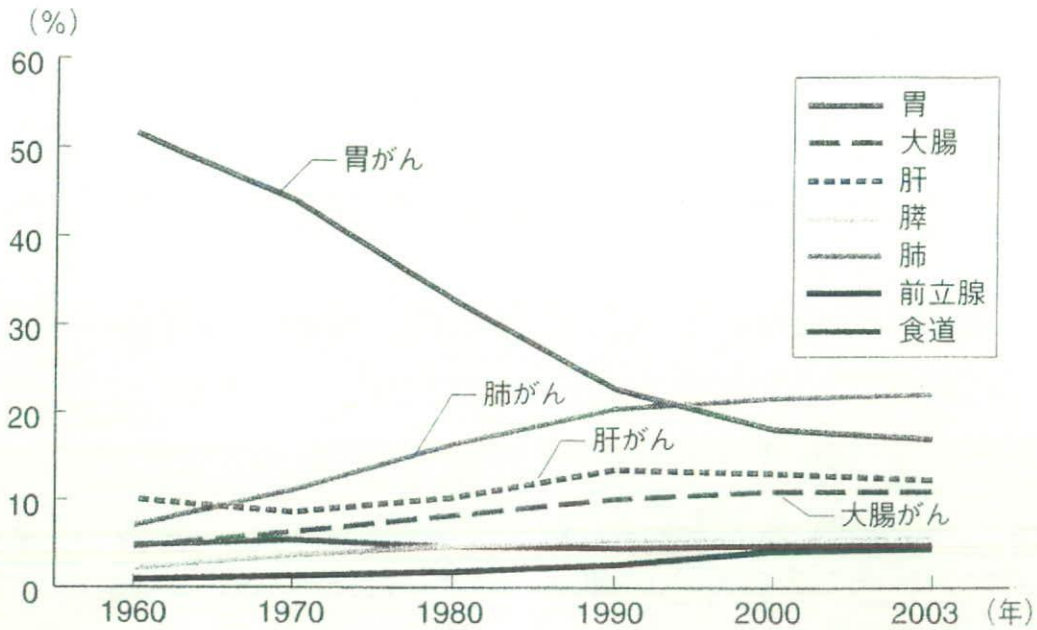


図1 部位別がん死亡率割合 (男性)

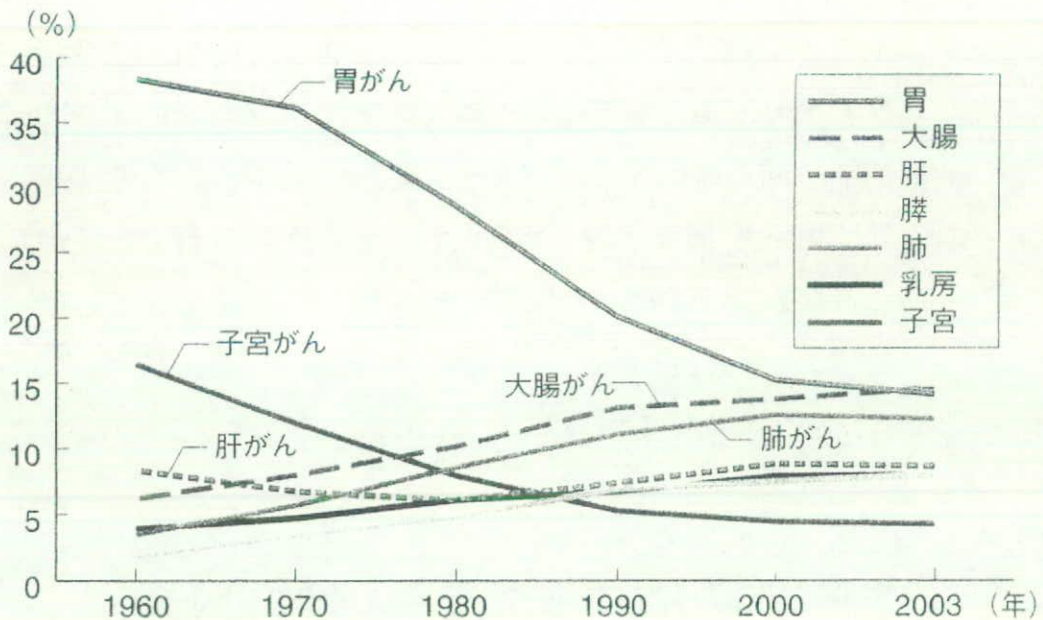


図2 部位別がん死亡率割合 (女性)

摂取量は徐々に減少しています。

大腸がんの発生に影響する環境因子を表1に記しました。これは、世界がん研究基金とアメリカがん研究財団のサポートを受けて、主に欧米の疫学研究者が集まり、これまでに発表されたがんと環境につ



表1 大腸がんの発生に影響する環境因子

促進因子		抑制因子	
ほぼ確実	アルコール, 赤身肉	確定的	野菜, 運動
可能性あり	卵, 脂肪, 肥満, 喫煙	可能性あり	食物繊維, カロテノイド

(World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A global perspective, Washington; 1997<sup>1)</sup>)

表2 知見のレベル

レベル1	無作為化割付臨床試験から得られた知見
レベル2	非無作為化割付臨床試験から得られた知見
レベル3	コホート研究で得られた知見 症例対照研究で得られた知見
レベル4	経時的変化の観察で得られた知見
レベル5	国際相関研究や移民研究で得られた知見
レベル6	臨床経験に基づく権威の意見 専門家委員会の答申

(アメリカがんセンター (NCI) 報告書より抜粋)

いての膨大な論文の結果を系統的に整理して、まとめた報告書<sup>1)</sup>からの抜粋です。この報告書では、大腸がんの発生に影響する環境要因として確定的なのは、野菜を食べる、運動をすることは大腸がんの発生を抑制することであり、ほぼ確実なのはアルコールを飲む、赤身肉(豚肉・牛肉など)を食べると発生を促進することであり、卵や脂肪、肥満、喫煙、食物繊維、カロテノイドなどは、可能性ありのグループにとどまっています。このように、食事の西洋化に関する脂肪や食物繊維は大腸がんの発生に影響をするかどうか「確定的」ではないのです。

ここで「確定的」「ほぼ確実」「可能性あり」などに分けているのはどのような根拠からでしょうか。最終的には、多数の研究者が集まり、どこに該当するかについて議論して決めています。それを決める際に重要な情報が「知見のレベル」(表2)です。これは、アメリカがんセンターが提唱している知見のレベルをきわめてシンプルにしたもの

です。この定義では、知見のレベルはレベル1からレベル6まであり、レベル1に近づくほど、より知見が確かになってきます。この知見のレベルについて、食物繊維を例にあげて、説明をします。

## 2 食物繊維による大腸がん予防の知見

### a レベル6

レベル6は「臨床経験に基づく権威の意見、専門家委員会の答申」です。食物繊維と大腸がんの関係については、1971年にイギリスの外科医であるバーキット (Burkitt) がアフリカの人々に大腸疾患が少ないのは多くの食物繊維を摂取しているから、と考えたのが最初とされています。

バーキットはとても高名な研究者であり、このことに気がついたことはとてもすばらしいことではありますが、思いついただけでは食物繊維と大腸がんの関係を確定的ということはできません。

### b レベル5、レベル4 (記述疫学研究)

レベル5は「国際相関研究や移民研究で得られた知見」です。食物繊維の摂取量の多いアフリカの人たちに比べて、摂取量の少ない欧米の人たちでは大腸がんが多いことは多くの研究で報告されています。しかし、地域や国が異なれば、食物繊維だけでなく、脂肪やその他いろいろな食品成分の摂取量も異なり、さらには運動量や喫煙量、飲酒量も異なります。人種も異なってきます。これらの情報だけでは、可能性はあってもとても確実ということは困難です。

日本人の移民研究などによると、ハワイやブラジルなど食物繊維の摂取量の少ない地域に移民した人たちは大腸がんの罹患率が高くなることが報告されています。また、日本では、食物繊維の摂取量の減少とともに大腸がんは増加しています (レベル4)。これらも国際相関研究と同じく、可能性は指摘できますが、これだけでは確実とはいえ



ません。

このような国際相関研究や移民研究、経時的変化の研究などは「記述疫学研究」と呼ばれています。記述疫学とは、データを網羅的に集めて、そのデータを見て、いろいろな知見を見いだす研究方法であり、鋭い考察力が要求される研究方法です。

### c レベル3 (分析疫学研究)

レベル3は「コホート研究」や「症例対照研究」で得られた知見です。これらの研究は、「分析疫学研究」と呼ばれています。分析疫学は、仮説を証明するために系統的にデータを集める研究であり、それから得られた知見のレベルは比較的高いものです。

#### ■ 症例対照研究

症例対照研究では、大腸がん罹患した患者とそれに対応する健全な対照者をいろいろな方法で抽出し、その人たちの過去の食物繊維の摂取量を聞き取り調査して大腸がん患者と対照者を比較します。このような研究は比較的容易に行えるので、世界中で多くの研究が行われました。症例数が多く、きっちりとした手法で行われた世界13か所の症例対照研究の成績を集計したところ、食物繊維を多く摂取している人に大腸がんが少ないとする報告が多いことがわかりました。しかし、この症例対照研究は、対照者を適切に抽出することが難しいこと、思い出し調査では過去の食事を正確に知ることは困難なことなどから、得られた成績の信頼性はそれほど高くありません。

それに対して、次に紹介するコホート研究は、より信頼性の高い知見を得ることのできる研究です。

#### ■ コホート研究

コホート研究は、数万人の病気になっていない集団に対して食事調査を行い、その後、数十年間追跡して大腸がんの発生を把握して、大腸がんが発生した者と発生しなかった者の、過去の食事調査での食物繊維の摂取量を比較する方法です。この方法では信頼性の高い

知見を得ることができますが、多数の人たちの食事調査やその後の追跡調査に膨大な費用がかかり、また、結果が出るのに長期間が必要なため、なかなか実施することは困難です。しかし、コホート研究は重要な研究なので、各国の国家予算を用いるなどにより、いくつかの研究が実施されています。コホート研究は早い時期からアメリカで行われ、その報告がいくつかありましたが、最近では、日本でも厚生労働省や文部科学省が主体となって実施したコホート研究の結果が報告されるようになってきました。

### ■ 研究例

- 1999年、34歳から59歳のアメリカの看護師88,757人に対して半定量食事頻度調査票による食事調査（パンや牛乳などいろいろな食材について、1週間に食べた頻度と量をアンケートする調査）を行った後、16年間、追跡した研究が報告されました。追跡期間中に787人が大腸がん、1,012人が大腸腺腫と診断されましたが、最初の食事調査で把握した食物繊維の摂取量と大腸がん、大腸腺腫の発生に明らかな関係はみられませんでした。
- さらに、この集団と47,325人の男性医療専門家を対象に、特に野菜や果物に注目して解析した報告や、カナダの女性45,491人を追跡した研究でも、野菜や果物を多く摂取している人でも大腸がんの発生が減少することは証明できませんでした。これらのコホート研究の報告から、食物繊維が大腸がんを予防することはできないと考える研究者が増えてきました。
- しかし、2003年に別の大規模なコホート研究により食物繊維が大腸がんを予防することを見いだした結果が報告され、再び混乱が始まりました。この研究は、ヨーロッパ8か国による519,978人を最長10年間追跡するきわめて大規模なコホート研究です。この研究では、食物繊維摂取量別に5群に分け、最も摂取量の少ない群に比して最も多い群では大腸がんの発生は相対危険度0.75と有意に減少していました。



- 最近、厚生労働省研究班のコホート研究（JPHC 研究）において、食物繊維と大腸がん罹患について報告されました。この報告では食物繊維の摂取量と大腸がんリスクに関連は認めませんでした。女性においてきわめて食物繊維の摂取量の少ない群でのみ大腸がんのリスクが上昇する傾向が認められました。このことより、食物繊維の摂取量がきわめて少ない場合のみ大腸がんは増加し、通常の食事をしている集団では、さらに多くの食物繊維を摂取しても大腸がんは予防できない可能性が考えられました。
- 2007年に文部科学省研究班のコホート研究（JACC 研究）において、食物繊維と大腸がんについての結果が報告されました。この報告では食物繊維を多く摂取するほど結腸がんの罹患が減少する傾向を示しました。

このように、日本で行われた大規模なコホート研究でも結果が一致せず、大腸がんと食物繊維の関係についてはいまだ混乱している状況です。

#### d レベル1 (介入疫学研究)

##### ■ 無作為化割付臨床試験

レベル1は「無作為化割付臨床試験」で得られた知見です。これらの研究は、「介入疫学研究」と呼ばれています。介入疫学は、仮説を証明するためにヒト集団に対して食物繊維の投与などの介入を行う群と行わない群を設定して、その介入効果をみる研究であり、それから得られた知見のレベルはきわめて高いです。

食物繊維が大腸がんを予防するかどうかを明らかにする最も確実な方法は、ヒト集団を無作為に2群に分けて、1つの群に食物繊維を投与し、もう1つの群に食物繊維を投与せず、大腸がんの発生の差を確認することです。しかし、大腸がんの発生頻度は低いため、多数の人を長期間介入しなくてはなりません。また、発がんするまで食物繊維を長期間投与し続けることは倫理的にも問題があり、このよう

な研究は行われませんでした。しかし、大腸がんには、前がん病変である腺腫があり、その発生を指標にするのであれば、比較的少人数、短期間で試験が実施できるため、腺腫の発生の有無を指標とした臨床試験がいくつか実施されています。

大腸に大腸腫瘍（腺腫や早期がん）をもつ人は、それをもたない人よりも大腸がんの発生率が高いことがわかっています。そこで、大腸がんの予防試験では、大腸がんの高危険度群である大腸腫瘍を以前に保有して、それらをすべて摘除した人が対象となりました。食物繊維を多く摂取させる方法には、食事指導により食事内容を変更させる方法と、サプリメント（食物繊維を高濃度に含んだビスケット）により食物繊維を投与する方法が用いられました。

#### ■ 今までに行われた大規模試験

食物繊維の大腸がん予防の効果を評価するために行われた大規模な無作為化割付臨床試験は6つ報告されています（表3）。

- マッケオン-イッセン（McKeown-Eyssen）らの研究はカナダで行われた研究で、対象者は165人です。参加者を、1日50g以下またはエネルギー比率20%以下の低脂肪食および1日50g以上の高食物繊維食の食事指導を行うグループと、通常の西洋食を摂取させるグループの2群に分けました。平均2年間の間隔で大腸内視鏡検査を行い、新たな大腸腺腫の発生を調べましたが、2群間に差はみられませんでした。
- マクレナン（MacLennan）らの研究はオーストラリアで行われた研究で、対象者は390人です。参加者を、小麦ふすま25g投与の有無、βカロテン20mg投与の有無、脂肪摂取量を総エネルギーの25%にする指導の有無により8群に分けました。2年目と4年目に大腸内視鏡検査を行い、新たな大腸腺腫の発生を調べました。主エンドポイントである腺腫の発生の有無に差はなく、低脂肪食で小麦ふすまを投与したグループでのみ1cm以上の腺腫の発生が、わずかではありますが有意に減少しました。



表3 大腸がん予防に食物繊維を用いた介入試験

報告者	人数	介入期間 (内視鏡時期)	介入方法	エンド ポイント	結果
McKeown- Eyssen GE	165	2年 (2年)	I群: 食事指導 (高食物 繊維, 脂肪制限20 %) II群: 通常西洋食	腺腫の発生 便中胆汁酸	差なし
MacLennan R	390	4年 (2年・4年)	脂肪エネルギー比25%, 小麦ふすま25g/日, $\beta$ カロテン20mg/日の3因 子の有無による8群	腺腫の発生	低脂肪, 高食 物繊維食にて 1cm以上の腺 腫の発生が減 少
Schatzkin A	1,905	4年 (1年・4年)	I群: 脂肪エネルギー比 20%+食物繊維・ 野菜摂取指導 II群: 通常の食事	腺腫の発生	差なし
Alberts DS	1,303	3年 (1年・3年)	I群: 小麦ふすま13.5g/ 日 II群: 小麦ふすま2g/日	腺腫の発生	高食物繊維食 にて3個以上 の腺腫の発生 が増加
Bonithon- Kopp C	552	3年 (3年)	I群: カルシウム2g/日 II群: サイリウム3.5g/日 III群: プラセボ	腺腫の発生	サイリウムに て腺腫の発生 が増加 (オッ ズ比1.67)
Ishikawa H	380	4年 (2年・4年)	I群: 食事指導+小麦ふ すま7.5g/日 II群: 食事指導+乳酸菌 製剤3g/日 III群: 食事指導+小麦ふ すま+乳酸菌製剤 IV群: 食事指導のみ	腺腫の発生	高食物繊維食 にて大きな腺 腫の発生が増 加. 乳酸菌投 与にて異型度 の高い腺腫の 発生が抑制

- ・シャツキン (Schatzkin) らの研究はアメリカで行われた研究で、対象者は1,905人です。参加者を、脂肪の減少 (全摂取カロリーの20%)、高食物繊維 (1,000 kcalあたり18g)、果物と野菜の摂取 (1,000 kcalあたり3.5杯) の食事をするように強力に指導する介入グループと、健康的な食事に関する標準的な小冊子を与えた対照グループの2群に分けました。1年目と4年目に大腸内視鏡検査を

行いましたが、両群間で新たな腺腫の発生の割合に差は認められませんでした。

- アルバート (Alberts) らの研究もアメリカで行われた研究で、対象者は 1,303 人です。参加者を、1 日 13.5 g の小麦ふすまを含むシリアルを投与するグループと、1 日 2 g の小麦ふすまを含むシリアルを投与するグループの 2 群に分けました。1 年目と 3 年目に大腸内視鏡検査を行い、新たな腺腫の発生を調べました。主エンドポイントである腺腫の発生の有無に差はありませんでしたが、3 個以上腺腫を発生した者は高食物繊維投与群で有意に多くなりました。
- ボニソン-コップ (Bonithon-Kopp) らの研究はヨーロッパで行われた研究で、対象者は 552 人です。参加者を、1 日 2 g のカルシウムを投与するグループと、1 日 3.5 g のサイリウムを投与するグループと、それらのプラセボ (食物繊維のっていない食品) のみを投与するグループの 3 群に分けました。サイリウムとは、食物繊維の 1 つである天然植物ガムを多く含み保水性が高い植物です。3 年目に大腸内視鏡検査を行い、新たな腺腫の発生を調べました。プラセボ群に比べ、カルシウム投与群では有意ではないものの腺腫の発生は減少しました (オッズ比 0.66) が、サイリウム投与群では逆に腺腫の発生が有意に増加しました (オッズ比 1.67)。
- 筆者らも日本で同様の研究を行いました<sup>2)</sup>。対象者は 380 人です。参加者全員に総摂取エネルギーに対して脂肪由来のエネルギーが 18 % から 22 % になることを主目的とした食事指導を行いました。そして、1 日 7.5 g の小麦ふすまを投与する群、1 日 3 g の乳酸菌製剤を投与する群、小麦ふすまと乳酸菌製剤の両方を投与する群、食事指導のみの群の 4 群に分けて、4 年間の介入を行いました。4 年目の大腸内視鏡検査では、小麦ふすまを摂取している人は、摂取していない人に比して、3 mm 以上や 10 mm 以上の大きな腺腫の発生が有意に増えました。乳酸菌製剤を摂取している人は、摂取していない人に比して、中等度異型以上の腺腫の発生が有意に



抑制されました。

このように欧米諸国や日本で行われた無作為化割付臨床試験の成績からは、食物繊維が大腸腺腫を予防するどころか、逆に発生を促進している可能性が強く示されました。これらの臨床試験では、大腸がんの発生ではなく前がん病変の大腸腺腫の発生の有無を指標としていること、試験期間が数年程度と短いこと、投与した食物繊維が小麦ふすまなどに限定されていることなどの問題点や、投与量が適切であったかどうか、対象者が適切であったかどうかなど、まだ不明な点が多くありますが、最も信頼性の高い無作為化割付臨床試験でこのような結果になったことを、重視する必要があると思います。

#### e 食物繊維と大腸がんの考察

信頼性の高いコホート研究において、食物繊維が大腸がんの予防に有用かどうかは一定した結論は出ていません。このような状況から、食物繊維の大腸がん予防効果の知見のレベルについて、世界がん研究基金とアメリカがん研究財団の研究者らは「確定的」や「ほぼ確実」ではなく「可能性あり」と判断したのだと思います。

この判定の後に、最も信頼性の高い無作為化割付臨床試験の結果が報告されました。それらの試験で、食物繊維をサプリメントとして投与することにより前がん病変である腺腫の発生を促進する可能性が強く示されました。したがって、次回の見直しにおいて、食物繊維は「可能性あり」からも外される可能性が高いと筆者は考えています。

食物繊維のように、大腸がんを予防してくれるのは間違いない、とイメージが定着している食品成分でも、科学的知見からみるとかなりあやふやでした。このように食生活の改善によるがん予防については、しっかりとした科学的知見を用いながら行うことが重要です。

### 3 化学物質によるがん予防(化学予防)

大腸がんを予防する可能性のあるものとして、多数の化学物質が検討されています(表4)。ここでは、代表的な化学物質の最近の研究結果を紹介します。

表4 大腸がんの化学予防候補物質

- |  |   |
|--|---|
| <p>I. 非ステロイド系抗炎症薬および関連物質</p> <p>アスピリン</p> <p>スリンダク</p> <p>スリンダク・スルフォン</p> <p>インドメタシン</p> <p>ピロキシカム</p> <p>セレコキシブ</p> | <p>VI. 多価不飽和脂肪酸</p> <p>ドコサヘキサエン酸</p> <p><math>\alpha</math>-リノレン酸</p>   |
| <p>II. ビタミンおよび関連物質</p> <p>葉酸</p> <p>ビタミンC</p> <p>ビタミンD</p> <p>ビタミンE</p>  | <p>VII. カロテノイド</p> <p><math>\alpha</math>-カロテン</p> <p><math>\beta</math>-カロテン</p> <p>リコペン</p>   |
| <p>III. 5-アミノサルチル酸製剤</p> <p>サラゾスルファピリジン</p> <p>5-アミノサルチル酸</p>  | <p>VIII. その他の食品成分</p> <p>S-アリルシステイン</p> <p>フコイダン</p> <p>クルクミン</p> <p>エピカロカテキン</p> <p>ラクトフェリン</p> <p>キチン・キトサン</p>  |
| <p>IV. 食物繊維および関連物質</p> <p>ヘミセルロース</p> <p>ペクチン</p> <p>消化抵抗性澱粉<sup>レジスタント</sup></p> <p>オリゴ糖</p>                        | <p>IX. 他疾患薬</p> <p>ビオグリタゾン</p> <p>メチル酸イマチニブ</p> <p>スタチン製剤</p> <p><math>\alpha</math>-グルコシダーゼ阻害薬</p> <p>フルオロウラシル(5-FU)</p> <p>乳酸菌製剤</p> <p>ウルソデオキシコール酸</p> <p>エストロゲン</p> |
| <p>V. 微量金属および関連物質</p> <p>セレンウム</p> <p>カルシウム</p> <p>フィチン酸</p>   |   |



### a 非ステロイド系抗炎症薬

最も多く大腸がん予防のために研究されている物質は、アスピリンやスリダクなどの非ステロイド系抗炎症薬（non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs）です。

1980年に、日本の研究者が発がん剤誘発ラットにおいてNSAIDsの1つであるインドメタシンにより大腸がんが抑制されることが報告されました。その後、コホート研究においてアスピリンの常用者で大腸がんの罹患が少ないことが見いだされ、NSAIDsによる大腸がん予防が注目を集めるようになりました。

NSAIDsが大腸がんを予防する機序は、NSAIDsがもつプロスタグランジンに關与する酵素シクロオキシゲナーゼ（cyclooxygenase: COX）の活性抑制作用が注目されています。COXにはCOX-1とCOX-2の2つがありますが、大腸がん組織では正常の大腸粘膜では発現していないCOX-2が高頻度で発現しています。NSAIDsを投与することによりCOX-2の活性が減少し、大腸がんの発生が抑制される可能性が期待されています。さらにNSAIDsが大腸粘膜のアポトーシスを促進することなども報告されています。

大腸がんの超高危険度群である家族性大腸腺腫症（familial adenomatous polyposis: FAP）に対してNSAIDsの1つであるスリダクを投与する臨床試験が数多く行われ、すべての試験で投与6か月以内にポリープの消退効果を認めたことが報告されています。

しかし、NSAIDsには腸管粘膜傷害やそれによる出血、出血傾向の発生などの副作用があり長期間の投与は困難であること、などの問題点があつて、予防薬として長期間の投与は困難でした。COX-2だけを選択的に阻害するCOX-2選択的阻害薬は粘膜傷害が少ないため、大腸がん予防効果が期待されましたが、この薬は心毒性をもつことが判明し使用できなくなりました。

現在、心疾患予防のために、低用量のアスピリン腸溶錠が広く用いられています。日本でも320万人の人が心疾患予防のために長期

間服用しているきわめて安全な薬剤ですが、この錠剤を長期間服用することにより大腸がんを予防することが期待されています。厚生労働省第3次対がん総合戦略研究事業の1つとして700人の大腸腺腫患者を対象とした二重盲検無作為化割付臨床試験が進行中であり、その結果が待たれます。

## b 葉酸

多くの症例対照研究やコホート研究では、野菜の摂取は大腸がんの発生を抑制することが示されています。野菜には葉酸が豊富なことから、葉酸が大腸がんを予防する主成分ではないかと考えられるようになりました。アメリカの看護師を対象としたコホート研究の報告では、葉酸をサプリメントとして15年以上300 $\mu$ g以上摂取すると、大腸がんの相対危険度が0.21に減少すると報告しています。15年未満では抑制効果がみられないため、葉酸が大腸がんを予防するためには長い期間が必要と考えられています。また、これらの効果はアルコール飲酒者でより顕著にみられていました。

1999年にハーバード大学のがん予防センターから出された大腸がん予防のための提言では、400 $\mu$ gの葉酸を含むビタミン剤を毎日服用することが勧められています。しかし、葉酸は、レバーやほうれん草、春菊、焼き海苔などに多く、日本食では葉酸を比較的多く摂取できるため、日本人では欧米人ほど葉酸のサプリメントの必要性は高くないかもしれません。また、最近の研究において、葉酸をサプリメントとして投与する大規模な臨床試験で、葉酸が大腸腫瘍の発生を促進することが報告されました。また、1つだけの臨床試験ですが、このような結果が報告されていますので、現時点では葉酸のサプリメントを摂取することは推奨できないと考えられます。

## c ウルソデオキシコール酸

ウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid: UDCA) は、胆汁



うっ滞を伴う肝疾患の利胆作用やコレステロール系胆石の溶解を目的として用いられている薬剤ですが、化学発がん動物モデルによる検討で、大腸がんの発生を予防する可能性も指摘されています。原発性硬化性胆管炎（primary sclerosing cholangitis：PSC）を合併した潰瘍性大腸炎患者 52 人を、UDCA 投与群とプラセボ群の 2 群に分けた臨床試験の結果が報告されました。355 人年の経過観察において、異形腫瘍またはがんの発生は、UDCA 投与群で相対危険度が 0.26 と有意に顕著な減少を認めました。この試験は PSC を合併した潰瘍性大腸炎患者に対する試験なので、PSC を合併しない潰瘍性大腸炎患者でも、同様の発がん予防効果があるか否かの検討が必要と考えられます。

UDCA が大腸がんを予防する機序ですが *in vitro* において UDCA は結腸がん細胞の増殖を抑制すること、大腸腺腫、大腸がん患者や異形腫瘍をもつ潰瘍性大腸炎患者の便では、がんの促進物質と考えられているデオキシコール酸（deoxycholic acid：DCA）の濃度が上昇していますが、UDCA は便中の DCA 濃度を減少させること、大腸粘膜のアラキドン酸代謝の変化、テロメラーゼ活性の抑制、COX-2 発現の抑制などが報告されています。

#### d 乳酸菌製剤、オリゴ糖

腸内細菌叢を変化させることにより大腸がんを予防する研究もいくつか試みられています。腸内細菌叢を変化させるためには、生菌製剤を投与する方法（プロバイオティクス）と、オリゴ糖など腸内細菌の栄養源を投与して腸内細菌のバランスを変える方法（プレバイオティクス）があります。

動物実験による実験で、乳酸菌やビフィズス菌を投与することにより大腸がんの発生を予防できることが報告されています。臨床試験としては、イタリアでラクツロース（lactulose）を投与する臨床試験が行われ、大腸がんの前がん病変である腺腫の発生を有意差はないも

の軽度抑制することが報告されています。

筆者らは、食物繊維のところで一部を紹介しましたが、世界ではじめて乳酸菌製剤を投与する大腸がん発がん予防試験を実施しました。エンドポイントを、異型度が中等度以上の腫瘍の発生の有無にした場合、非投与群に対する乳酸菌製剤投与群の2年目の相対危険度は0.80(95%信頼区間0.52-1.22)、4年目は0.65(95%信頼区間0.43-0.98)と、4年目で有意な減少を認めました。すなわち、乳酸菌製剤を摂取している者は、摂取していない者に比して、発がんリスクの高い中等度異型以上の腺腫の発生が抑制されたため、乳酸菌製剤の服用が大腸がんを予防できる可能性が示されました。

乳酸菌製剤を用いた大腸がん予防のための臨床試験は、筆者らの研究がはじめての報告なので、外国でも同様の臨床試験を行い、同じ結果が出ることを確認すること、さらには、乳酸菌製剤を服用している集団を長期間追跡し大腸がんの発生が減少することを確認することなどが必要と考えています。

## おわりに

大腸がんを予防する研究は、まだ十分な成果は出ていませんが、きわめて重要ながん研究分野と考えられ、積極的に研究が行われています。近い将来、大きく進歩することが期待されています。

(石川秀樹)

## ●引用文献

- 1) World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A global perspective, Washington; 1997.  
▶世界中で報告されている発がんに影響を与える環境因子についての疫学研究の報告書。がんの疫学研究で欠かすことのできないバイブル的書物の1つ。
- 2) Ishikawa H, Akedo I, Otani T, et al: Randomized trial of dietary fiber and Lactobacillus casei administration for prevention of colorectal tu-



mors. I Int J Cancer 2005; 116: 762-7.

- ▶厚生労働省第2次がん克服10ヶ年戦略事業で実施された小麦ふすまと乳酸菌製剤を用いた大腸がん予防臨床試験の原著報告.

◎もっと学びたい人のための参考図書 .....

- 坪野吉孝：食べ物とがん予防—健康情報をどう読むか，東京：文春新書 242；2002.
- ▶食品とがん予防について，疫学的データの読み方についてわかりやすく書いた一般向け書籍.
- 中村好一：基礎から学ぶ楽しい疫学，東京：医学書院；2002.
- ▶疫学研究について，初心者にもわかりやすく解説した教科書であるが，内容はきわめて高度で十分に記述されている.
- 石川秀樹：大腸がんのことがとても良く分かる本，東京：PHP 研究所；2007.
- ▶大腸がんの基本や最新の疫学的知見をわかりやすく記載した一般向け書籍.



## Plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1) blockers suppress intestinal polyp formation in Min mice

Michihiro Mutoh\*, Naoko Niho, Masami Komiya, Mami Takahashi, Rina Ohtsubo, Kiyoshi Nakatogawa<sup>1</sup>, Kentaro Ueda<sup>1</sup>, Takashi Sugimura and Keiji Wakabayashi

Cancer Prevention Basic Research Project, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan and <sup>1</sup>Shizuoka Coffein Co. Ltd, 129 Suidocho, Shizuoka-shi 420-0008, Japan

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 3 3542 2511;  
Fax: +81 3 3543 9305;  
Email: mimutoh@gan2.ncc.go.jp

Obesity and hyperlipidemia are known to increase colorectal tumor risk. We noticed that Min mice, featuring a defect in the *adenomatous polyposis coli* (*Apc*) gene, develop intestinal polyps along with high serum triglyceride (TG) levels up to 10-fold those observed in wild-type mice. In these mice, messenger RNA (mRNA) expression of lipoprotein lipase, which catalyzes hydrolysis of TG, is downregulated. In the present study, we focused on adipocytokines, especially plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1), which is involved in hyperlipidemic status and may promote intestinal polyp formation in Min mice. Serum Pai-1 levels in the 15-week-old male Min mice were eight times higher than in wild-type mice and hepatic Pai-1 mRNA levels were 11-fold increased. In addition, Pai-1 immunostaining was strong in small intestinal epithelial cells of Min mice. Administration of a PAI-1 inhibitor, SK-216, at 25, 50 and 100 p.p.m. doses in the diet for 9 weeks reduced serum Pai-1 levels and hepatic Pai-1 mRNA levels of Min mice to the wild-type levels. Moreover, SK-216 at 50 and 100 p.p.m. significantly reduced total numbers of intestinal polyps to 64 and 56% of the untreated group value, respectively. Serum TG levels were also decreased by 43% at the dose of 100 p.p.m. Administration of 50 p.p.m. SK-116, another PAI-1 inhibitor, for 9 weeks similarly reduced serum Pai-1 levels and total numbers of intestinal polyps to 70% of the untreated group value. These results indicate that Pai-1 induction associated with hypertriglyceridemia may contribute to intestinal polyp formation with *Apc* deficiency, and PAI-1 could thus be a novel target for colorectal chemopreventive agents.

### Introduction

Colon cancer is one of the most common solid cancers, has an increasing incidence in developed countries and is now widely considered to be obesity associated (1,2). Hyperlipidemia, especially hypertriglyceridemia, is known to increase the risk of colorectal tumor (3–5) and recently we reported an age-dependent hyperlipidemic state in *adenomatous polyposis coli* (*Apc*)-deficient Min and *Apc*1309 mice, animal models of familial adenomatous polyposis (6–8). Familial adenomatous polyposis is characterized by the appearance of hundreds of adenomatous polyps in the colon and rectum due to germ line mutations of the *APC* gene. Truncating mutations in *APC* activate Wnt signaling to promote cell growth and are observed in almost 70% of the sporadic colorectal cancers (9).

Although the direct link between *APC* deficiency and hyperlipidemia has yet to be clarified, it is notable that serum triglyceride (TG) levels in *Apc*-deficient mice are almost 10-fold than those in wild-type littermates, this appearing due to low messenger RNA (mRNA)

**Abbreviations:** Ab, antibody; APC, adenomatous polyposis coli; LPL, lipoprotein lipase; mRNA, messenger RNA; Pai-1, plasminogen activator inhibitor-1; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; TG, triglyceride.

expression levels for lipoprotein lipase (LPL), which catalyzes hydrolysis of TG (6). We have demonstrated that induction of LPL mRNA by peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and - $\gamma$  agonists and a selective LPL-inducing agent, NO-1886, which lacks potential for activating the peroxisome proliferator-activated receptor pathways, suppressed both the hyperlipidemic status and intestinal polyp formation (6–8). Adipocytokines upregulated in the metabolic syndrome, also associated with a hyperlipidemic status, may be factors impacting on intestinal polyp formation. During investigation of expression levels of adipocytokines in Min mice, we have occasionally detected remarkable elevation of hepatic plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1) expression.

PAI-1 is a direct binding primary inhibitor of plasminogen activators, uPA and tPA, and is known to be induced by TG, very low-density lipoprotein (TG-rich lipoprotein), transforming growth factor  $\beta$ , various growth factors, tumor suppressor p53 and Nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) (10–12). Moreover, a very low-density lipoprotein response element has been identified in the promoter region of the PAI-1 gene locus that mediates very low-density lipoprotein-induced PAI-1 transcription in endothelial cells (13). PAI-1 can also inhibit activation of metalloproteinases via inhibition of plasmin production from plasminogen. Metalloproteinases degrade extracellular matrix proteins, which modulate cellular adhesion and migration (14,15). In contrast to its antiproteolytic activity, it has been reported that PAI-1 promotes cancer invasion and metastasis (16). Furthermore, PAI-1 could modulate cell proliferation and stimulate angiogenesis. In one experiment using Pai-1-deficient mice, Pai-1 deficiency abolished cancer invasion and angiogenic activity (17). In this context, it should be mentioned that PAI-1 is significantly upregulated in neoplastic tissue of the human colon (18). The PAI-1 promoter 4G/5G polymorphism, in which the 4G allele is associated with high PAI-1 expression, may influence the development of aggressive fibromatosis in familial adenomatous polyposis patients (19). Thus, it is conceivable that Pai-1 is one of the factors that explain linkages between hyperlipidemia and intestinal tumorigenesis.

In this study, we examined the effects of Pai-1 inhibitors, SK-216 and SK-116, in the diet on both hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice and demonstrated concomitant suppression of both. The possible mechanisms of its action in *Apc*-deficient mice and usage of PAI-1 inhibitors as possible candidates for colon cancer prevention are also discussed.

### Materials and methods

#### Cell culture

Azoxymethane-induced F344 rat colon cancer-derived cell line RCN-9, which was obtained from RIKEN Bioresource Center (Tsukuba, Japan), was used. RCN-9 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 5% fetal bovine serum at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>.

#### Animals and chemicals

Male C57BL/6-*Apc*<sup>Min/+</sup> mice (Min mice) were purchased from The Jackson Laboratory Maine, USA at 6 weeks of age and genotyped as previously reported (20). Heterozygotes of the Min strain and wild-type (C57BL/6J) mice were acclimated to laboratory conditions for 1 week. Five mice were housed per plastic cage with sterilized softwood chips as bedding in a barrier-sustained animal room at 24 ± 2°C and 55% humidity on a 12 h light/dark cycle. The PAI-1 inhibitors SK-216, disodium [5-[[6-[5-(1,1-dimethylethyl-2-benzoxazolyl)-2-naphthalenyl]oxy] pentyl] propanedioate, and SK-116, disodium [5-[[6-[4-phenyl-6-(phenylmethoxy)-2-pyrimidinyl]-2-naphthalenyl]oxy] pentyl]propanedioate, were chemically synthesized at Shizuoka Coffein Co. Ltd. Their structures are shown in Figure 1. *In vitro* data showed that these compounds reverse the inhibitory effects of PAI-1 against both tPA and urokinase using the method described by Charlton *et al.* (21). IC<sub>50</sub> for SK-216 is 44  $\mu$ M and that for SK-116 is 35  $\mu$ M were reported in international patent WO04/



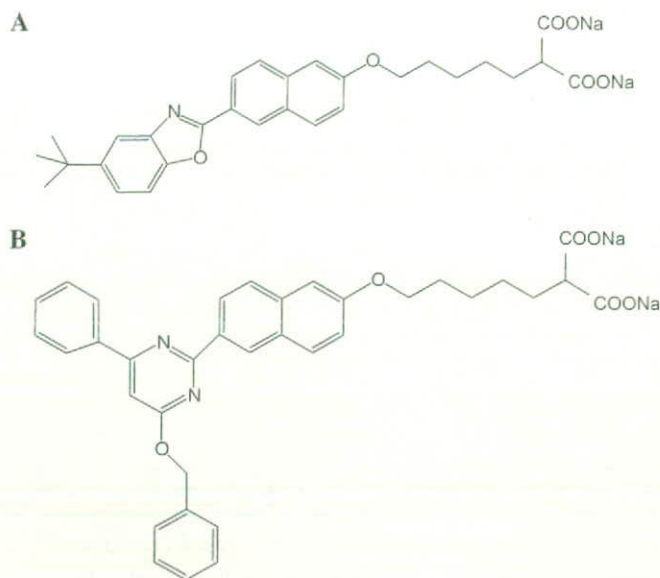


Fig. 1. Structures of SK-216 (A) and SK-116 (B).

010996 and WO04/011442, respectively. SK-216 was well mixed at concentrations of 25–100 p.p.m. in AIN-76A powdered basal diet (CLEA Japan, Tokyo, Japan). SK-116 was also well mixed at 50 p.p.m. in the same way.

#### Animal experiments

To investigate the effects of PAI-1 inhibitors on intestinal polyp formation, 10 male Min mice at 7 weeks of age were given SK-216 and SK-116 in the diet for 8 weeks. Food and water were available *ad libitum*. The animals were observed daily for clinical signs and mortality. Body weights and food consumption were measured weekly. Animals were anesthetized with ether and killed, and blood samples were collected from the abdominal aorta. Serum levels of TG and total cholesterol were measured as reported (6). The experiments were conducted according to the Guidelines for Animal Experiments in National Cancer Center of the Committee for Ethics of Animal Experimentation of the National Cancer Center.

The intestinal tract was removed, filled with 10% buffered formalin and separated into the small intestine, cecum and colon. The small intestine was divided into the proximal segment (4 cm in length) and then the proximal (middle) and distal halves of the remainder. All segments were opened longitudinally and fixed flat between sheets of filter paper in 10% buffered formalin. The numbers and sizes of polyps and their distributions in the intestine were assessed with a stereoscopic microscope (6).

To investigate the effects of PAI-1 inhibitors on Pai-1 expression levels in mouse intestinal mucosa, C57/BL6 mice were purchased from CLEA Japan at 6 weeks of age and were given either 0 or 100 p.p.m. SK-216 for 1 week. A day before killing, 200  $\mu$ l soy oil (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) was given by gavage to the mice. The intestinal mucosa was removed by scraping for further reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) analysis.

#### Real-time PCR analysis and RT-PCR analysis

Tissue samples from liver of mice were rapidly deep-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was isolated from tissues by using IsoGen (Nippon Gene, Tokyo, Japan), treated with DNase (Invitrogen) and 3  $\mu$ g aliquots in a final volume of 20  $\mu$ l were used for synthesis of cDNA using an Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and an oligo(dT) primer. Real-time PCR was carried out using a DNA Engine Option<sup>TM</sup> 2 (MJ Japan Ltd, Tokyo, Japan) with SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo Co., Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions. Primers for mouse Pai-1 (5' primer-GACACCTCAGCATGTTTCATC and 3' primer-AGGGTTGCACTAAACATGTCAG) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (5' primer-TTGTCTCCTGCGACTTCA and 3' primer-CAC-CACCTGTGCTGTA) were employed (22). To assess the specificity of each primer set, amplicons generated from the PCR reaction were analyzed for melting curves and also by electrophoresis in 2% agarose gels.

Tissue samples from intestinal mucosa were treated the same as liver samples and 1  $\mu$ l of cDNA was included in a final volume of 10  $\mu$ l with a PTC-200 DNA Engine (MJ Research, Waltham, MA) by using an Omniscript RT Kit

(Qiagen). Cycling conditions were as follows:  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 s, annealing temperature ( $60^{\circ}\text{C}$ ) for 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  for 60 s and 32 cycles after an initial step of  $95^{\circ}\text{C}$  for 3 min. A final elongation step of  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min completed the PCR. The products were then electrophoresed on 2% agarose gels.

#### Immunohistochemical staining

Small intestines were fixed, embedded and sectioned as Swiss rolls for further immunohistochemical examination with the avidin-biotin complex immunoperoxidase technique and polyclonal rabbit anti-Pai-1 antibodies (Abs) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at  $100\times$  dilution. As the secondary Ab, biotinylated horse anti-rabbit IgG, affinity purified was employed at  $200\times$  dilution. Staining was performed using avidin-biotin reagents (Vectastain ABC reagents; Vector Laboratories), 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide, and the sections were counterstained with hematoxylin to facilitate orientation. As a negative control, consecutive sections were immunostained without exposure to the primary Ab.

#### Enzyme-linked immunosorbent assay

The concentration of Pai-1 in the plasma was determined using a MOUSE PAI-1 Total Antigen ELISA Kit (Innovative Research, MI, USA) for five samples each from wild-type mice, untreated Min and PAI-1 inhibitor-treated Min mice, according to the manufacturer's protocol.

#### Western blot analysis

Protein expression was analyzed by western blot. Cells ( $2 \times 10^5$ ) were seeded in 24-well plates. After treatment, cells were lysed in 100  $\mu$ l lysis buffer [0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 20% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 5% sodium dodecyl sulfate]. Equal amounts of protein were separated in 10% polyacrylamide gel electrophoresis-sodium dodecyl sulfate gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, MA). Abs against the Pai-1 (Santa Cruz Biotechnology) were used at a 1:2000 dilution. Peroxidase-conjugated secondary Abs for anti-rabbit IgG were obtained from GE Healthcare, Buckingham shire, UK. Blots were developed with enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents (Amersham Biosciences, Buckingham shire, UK).

#### NF $\kappa$ B-DNA-binding activity assay

The activity of NF $\kappa$ B binding to oligonucleotides containing an NF $\kappa$ B consensus binding sites was measured by using TransAM<sup>TM</sup> NF $\kappa$ B Transcription Assay Kits according to the manufacturer's instructions (ActiveMotif, CA, USA). Briefly, RCN-9 cells treated with 50  $\mu$ M SK-216 for 6 h were harvested from 24-well plates, and nuclear fractions were isolated by using a Nuclear Extract Kit from ActiveMotif. Nuclear fractions were applied to 96-well plates coated with oligonucleotides containing an NF $\kappa$ B consensus binding site. After treatment with anti-NF $\kappa$ B Ab, another peroxidase-linked Ab specific for NF $\kappa$ B was added. The substrate solution was added and optical density was assessed using the microplate reader set to 450 nm.

#### Statistical analysis

All the results are expressed as mean  $\pm$  standard error values, with statistical analysis using Dunnett's test, except for the serum Pai-1 level investigation in Figure 2A. The Mann-Whitney test was used for statistical analyses of the serum Pai-1 level. Differences were considered to be statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

#### Expression of Pai-1 in serum, liver and small intestine

Serum Pai-1 was obviously increased (approximately eight times) in Min mice at 15 weeks of age as compared with wild-type littermates (Figure 2A). Pai-1 mRNA levels in the Min mice livers were also almost 11-fold elevated (Figure 2B). Furthermore, expression of Pai-1 was detected in small intestinal epithelial cells, but appeared weaker in stromal cells of Min mice (Figure 2C). Expression of Pai-1 was similar in both polyp and non-tumorous epithelial cells in the intestine (Figure 2D). Pai-1 immunostaining was strong in small intestinal epithelial cells of Min mice, but slightly weak in wild-type littermates, and no artificial stain was detected in controls using the second Ab only (data not shown).

#### Suppression of intestinal polyp formation in Min mice by Pai-1 inhibitors

Administration of SK-216 at 25, 50 and 100 p.p.m. for 9 weeks did not affect body weights, food intake or clinical signs of Min mice

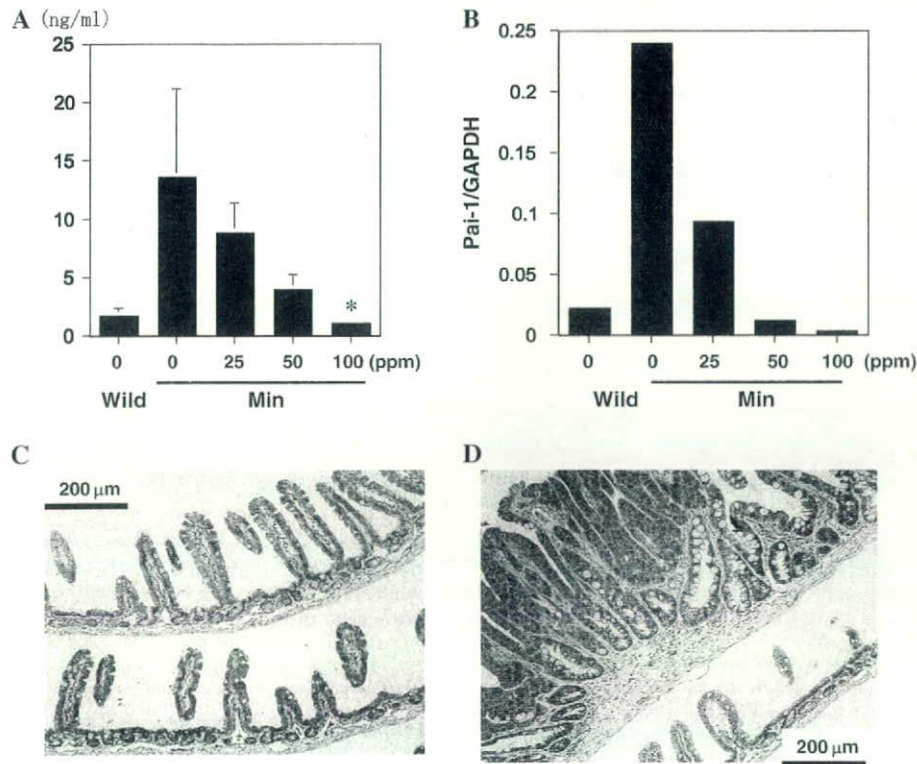


throughout the experimental period. Average daily food intake did not differ significantly among the groups, being 3.1, 3.4, 3.1 and 3.0 g per mouse per day for the 0, 25, 50 and 100 p.p.m. groups of Min mice, respectively. During the experiment, severe hemorrhage, which may occur with fibrinolysis, was not observed in both Pai-1 inhibitor-treated or -untreated mice. In addition, there were no changes observed in any organ weights that might have been attributable to toxicity.

Table I summarizes data for the number and distribution of intestinal polyps in the basal diet and SK-216 treated groups. Almost all polyps developed in the small intestine, with only a few in the colon (6). The total number of polyps was significantly decreased by administration of 50 and 100 p.p.m. SK-216 to 64 and 56% of the untreated control value, respectively. Reduction in the proximal, middle

and distal parts was by 56, 48 and 28% with 50 p.p.m. and by 63, 59 and 28% with 100 p.p.m., respectively. Treatment with SK-216 did not affect the numbers of colon polyps. Administration of 50 p.p.m. SK-116 also decreased the total number of polyps to 70% of the untreated control value with significant reduction in the proximal section (Table II).

Figure 3 shows the size distributions of intestinal polyps in the basal diet, SK-216- and SK-116-treated groups. The maximal number of polyps was observed in the size range between 0.5 and 3.0 mm in diameter. Administration of 50 and 100 p.p.m. SK-216 reduced the numbers of polyps of all sizes (Figure 3A). Administration of 50 p.p.m. SK-116 reduced the numbers of polyps sized <1.5 mm in diameter (Figure 3B).



**Fig. 2.** Changes of serum Pai-1 level, liver Pai-1 mRNA and protein expression in the small intestine of Min mice. (A) Serum Pai-1 levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay using samples from Min mice ( $n = 5$  each group) given diets containing SK-216 at doses of 25–100 p.p.m. for 9 weeks and also that from untreated wild-type mice ( $n = 5$ ). Data are means  $\pm$  standard errors \* $P < 0.05$ . (B) Quantitative real-time PCR analysis of Pai-1 mRNA expression in the livers of Min mice given diets containing SK-216 at doses from 25–100 p.p.m. for 9 weeks and also that in untreated wild-type mice. Data are mean of two mice of each group. (C) Immunohistochemistry of Pai-1 expression in normal parts of the small intestine of a Min mouse. (D) Immunohistochemistry of Pai-1 expression in a polyp part of the small intestine in a Min mouse. Bars represent 200  $\mu$ m. Data are representative of six mice.

**Table I.** Suppression of intestinal polyp development in Min mice by SK-216

No. of polyps/mouse		Small intestine			Colon	Total
Group (p.p.m.)	No. of mice	Proximal	Middle	Distal		
0	10	5.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	19.7 $\pm$ 2.4	40.6 $\pm$ 4.1	0.5 $\pm$ 0.3	67.0 $\pm$ 4.8
25	10	3.6 $\pm$ 0.6 (69) <sup>b</sup>	15.6 $\pm$ 2.4 (79)	44.5 $\pm$ 5.8 (110)	1.6 $\pm$ 0.3	65.3 $\pm$ 7.6 (97)
50	10	2.3 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup> (44)	10.3 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup> (52)	29.1 $\pm$ 2.9 (72)	1.3 $\pm$ 0.3	43.1 $\pm$ 4.0 <sup>c</sup> (64)
100	10	1.9 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup> (37)	8.1 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup> (41)	25.3 $\pm$ 1.6 <sup>d</sup> (62)	0.7 $\pm$ 0.2	37.7 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup> (56)

<sup>a</sup>Data are means  $\pm$  standard errors.

<sup>b</sup>Numbers in parentheses are percentages of the control basal diet values.

<sup>c</sup>Significantly different from the basal diet group at  $P < 0.01$ .

<sup>d</sup>Significantly different from the basal diet group at  $P < 0.05$ .