

- Kajimoto, M., Muguruma, N, Okahisa, T., Takayama, T. Chemopreventive effect of RAS inhibitor on azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo (September, 2012).
- 46) 石川秀樹、J-FAPP Study II グループ。家族性大腸腺腫症に対するアスピリンによる大腸癌予防のための化学予防。第 18 回日本家族性腫瘍学会学術集会シンポジウム、大阪 (2012 年 6 月)
- 47) 中島建、石川秀樹、菅野康吉、権藤延久、阿部孝、石黒信吾、斎藤豊、酒井敏行。リンチ症候群患者の大腸腫瘍性病変の発育は速い。第 18 回日本家族性腫瘍学会学術集会シンポジウム、大阪 (2012 年 6 月)
- 48) 柚木崎紘司、石川秀樹、野田雅史、塚本潔、久野隆史、山岸大介、山崎之良、奥順介、田村公佑、李兆亮、志村陽子、川添智太郎、金鏞民、阿部孝。FAP の一卵性双生児の術後回腸嚢に腺癌を発症した一症例。第 18 回日本家族性腫瘍学会学術集会口演、大阪 (2012 年 6 月)
- 49) 小林容子、土井悟、武田祐子、上野いづみ、川崎優子、石川秀樹、岩間毅夫。家族性大腸腺腫症の医療費対策に関する活動。第 18 回日本家族性腫瘍学会学術集会口演、大阪 (2012 年 6 月)
- 50) 石川秀樹。無作為割付臨床試験による大腸癌予防研究。第 12 回日本抗加齢医学会総会シンポジウム、横浜 (2012 年 6 月)
- 51) 石川秀樹。臨床試験データセンターの取り組みについて。Gastrointestinal cancer conference 講演、東京 (2012 年 8 月)
- 52) 石川秀樹。大腸癌の発癌予防。第 22 回日本消化器病学会四国支部教育講演会講演、徳島 (2012 年 9 月)
- 53) 石川秀樹。遺伝性大腸腫瘍と遺伝カウンセリング。第 54 回日本内科学会東海支部主催生涯教育講演会講演、名古屋 (2012 年 10 月)
- 54) 石川秀樹。大腸癌予防。大阪市中央区薬剤師会講演講演、大阪 (2012 年 11 月)
- 55) 石川秀樹。大腸癌はなぜ増えたのか、予防は可能なのか。東京がん化学療法研究会講演、東京 (2013 年 1 月)
- 56) 今井俊夫、打屋尚章、高橋真美。F344 ラットにおける DMBA 誘発乳腺発がんに対する若齢期高脂肪食の影響と BCAA による抑制効果。第 19 回日本がん予防学会、岐阜 (2012 年 6 月)
- 57) 今井俊夫、五十嵐美徳、高橋真美。ラット乳腺化学発がんモデルのイニシエーション期における高脂肪食の影響。第 27 回発癌病理研究会、伊豆 (2012 年 8 月)
- 58) 今井俊夫、高橋真美。F344 ラットにおける DMBA 誘発乳腺発がんに対する若齢期高脂肪食及び BCAA の影響。第 71 回日本癌学会学術総会、札幌 (2012 年 9 月)
- 59) 今井俊夫、打屋尚章、高橋真美。DMBA 誘発ラット乳腺発がんに対する若齢期高脂肪食の影響。第 29 回日本毒性病理学会、つくば (2013 年 1 月)
- 60) 山地太樹、岩崎基、笹月静、津金昌一郎。血中のインスリン関連マーカーと大腸腺腫との関連にみられた性差。第 71 回日本癌学会学術総会、札幌 (2012 年 9 月)
- 61) 原 梓、笹月静、井上真奈美、岩崎基、島津太一、澤田典絵、山地太樹、津金昌一郎。イソフラボン摂取と胃がんリスクとの関連: 多目的コホート研究より。第 23 回日本疫学会学術総会、吹田 (2013 年 1 月)
- 62) 梯アンナ、謝 曉利、山野莊太郎、魏 民、鰐淵英機。ヒト肝臓癌のプロテオーム解析を用いた新規バイオマーカー候補分子の検討。第 101 回日本病理学会総会、東京 (2012 年 4 月)
- 63) Okabe, K., Yamano, S., Wei, M., Kato, M., Fujioka, M., Xie, X., Wanibuchi, H. Identification of novel biomarkers of rat renal carcinogenesis. Society of Toxicologic Pathology 31st Annual Symposium, Boston (June, 2012)
- 64) Wanibuchi, H., Wei, M., Kakehashi, A., Yamano S. Animal model for arsenic carcinogen. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, Sendai (July, 2012)
- 65) 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、奥村真衣、鰐淵英機。gpt delta ラットを用いた遺伝毒性・発がん性の包括的リスク評価モデルの確立。第 27 回発癌病理研究会、伊豆 (2012 年 8 月)
- 66) 鰐淵英機。gpt delta ラットを用いた遺伝毒性・発がん性の包括的リスク評価モデルの確立。第 6 回応用トキシコロジーリカレント講座、大阪

- (2012年9月)
- 67) 山野莊太郎、魏 民、田尻正喜、梯アンナ、岡部恭子、奥村真衣、多胡善幸、鰐淵英機。マウス肺扁平上皮癌の発がん過程早期における気管支肺胞幹細胞の関与。第71回日本癌学会学術総会、札幌(2012年9月)
- 68) 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、奥村真衣、武下正憲、鰐淵英機。gpt delta ラットを用いた膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の評価法の確立。第71回日本癌学会学術総会、札幌(2012年9月)
- 69) 小松弘明、西山典利、山野莊太郎、花田庄司、井上英俊、梯アンナ、魏民、鰐淵英機。プロテオーム解析による新規肺神経内分泌癌のバイオマーカー検索。第71回日本癌学会学術総会、札幌(2012年9月)
- 70) 桑江優子、梯アンナ、魏 民、若狭研一、鰐淵英機。FFPE 標本を用いたヒト浸潤性膵管癌のプロテオーム解析。第71回日本癌学会学術総会、札幌(2012年9月)
- 71) 岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、加藤 実、田尻正喜、謝 暁利、鰐淵英機。マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討。第71回日本癌学会学術総会、札幌(2012年9月)
- 72) 梯アンナ、桑江優子、山野莊太郎、魏 民、謝 暁利、若狭研一、鰐淵英機。ヒト幹細胞癌における特異的候補分子のピンポイントターゲティング。第71回日本癌学会学術総会、札幌(2012年9月)
- 73) 加藤 実、魏 民、田尻正喜、山野莊太郎、梯アンナ、仲谷達也、鰐淵英機。Steroid Sulfatase は膀胱癌の予後予測因子である。第71回日本癌学会学術総会、札幌(2012年9月)
- 74) 魏 民、山野莊太郎、加藤 実、梯アンナ、神吉将之、謝 暁利、鰐淵英機。BBN 誘発マウス膀胱発がん過程におけるがん幹細胞関連タンパク質の発現。第71回日本癌学会学術総会、札幌(2012年9月)
- 75) 鰐淵英機。膀胱癌の発症・進展におけるリスクファクターと機序。第246回日本泌尿器科学会東北地方会、福島(2012年9月)
- 76) 魏 民、山野莊太郎、加藤 実、藤岡正喜、梯アンナ、神吉将之、鰐淵英機。膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討。第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会、つくば(2013年1月)
- 77) 神吉将之、魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、鰐淵英機。ラットにおける非遺伝毒性肝発がん物質と毒性フェノタイプを予測できる遺伝子マーカーセットの探索。第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会、つくば(2013年1月)
- 78) 奥村真衣、魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、鰐淵英機。gpt delta ラットを用いた2-AAF の肝発がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討。第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会、つくば(2013年1月)
- 79) 山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、岡部恭子、武下正憲、鰐淵英機。マウス肺扁平上皮癌モデルにおける気管支肺胞幹細胞の cancer initiating cell としての可能性。第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会、つくば(2013年2月)
- 80) 梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、魏民、長野嘉介、福島昭治、鰐淵英機。ラットにおける 2-エトキシ-2-メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明。第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会、つくば(2013年1月)
- 81) 岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、謝 暁利、串田昌彦、鰐淵英機。マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討。第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会、つくば(2013年1月)
- 82) 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、福永賢輝、謝 暁利、鰐淵英機。ラット膀胱発がん物質 DMA(V) の *in vivo* 変異原性の検討。第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会、つくば(2013年2月)
- 83) 山野莊太郎、鰐淵英機。NASH-肝細胞癌発症 STAM マウスにおける病態評価。第12回分子予防環境医学研究会、つくば(2013年2月)
- 84) 鰐淵英機。肺発がんモデルにおける組織幹細胞の役割。平成24年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ、大津(2013年2月)
- 85) 魏 民、山野莊太郎、加藤 実、梯アンナ、鰐淵英機。膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討。平成24年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ、大津(2013年2月)
- 86) 山野莊太郎、岡部恭子、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機。ラット腎発がんにおけるNADPH oxidase阻害による効果。平成24年度個体レベルでのが

- ん研究支援活動ワークショップ、大津（2013年2月）
- 87) 清水雅仁、久保田全哉、森脇久隆。緑茶カテキンを用いたNASH・肥満関連肝腫瘍形成の抑制。第39回日本肝臓学会西部会、岡山（2011年12月）
- 88) 清水雅仁、森脇久隆。緑茶カテキンを用いた大腸癌予防-基礎研究から臨床的予備試験まで-。第98回日本消化器病学会総会、東京（2012年4月）
- 89) 清水雅仁、白木 亮、森脇久隆。栄養的および薬剤投与介入による肥満関連肝発癌予防の可能性-BCAA と非環式レチノイドを用いて-。第48回日本肝臓学会総会、金沢（2012年6月）
- 90) 清水雅仁、森脇久隆。非環式レチノイドによる肝発癌化学予防-リン酸化 RXRa を標的分子とした肝発癌化学予防-。日本ビタミン学会第64回大会、岐阜（2012年6月）
- 91) Shimizu, M., Moriwaki, H. Targeting obesity- and diabetes-related metabolic abnormalities for chemoprevention of hepatocellular carcinoma. 第71回日本癌学会学術総会、札幌（2012年9月）
- 92) 河内隆宏、清水雅仁、森脇久隆。肥満・高血圧発症ラットを用いた新規NASH 肝発癌モデルの作製-緑茶カテキン EGCG はNASH・高血圧に関連した肝腫瘍形成を抑制する-。第54回日本消化器病学会大会、神戸（2012年10月）
- 93) 大野智彦、清水雅仁、森脇久隆。非環式レチノイドと GW4064 (FXR ligand) 併用による肝癌抑制効果。第54回日本消化器病学会大会、神戸（2012年10月）
- 94) 高橋智。前立腺がんの予防、市民公開講座「がん予防の最前線」。第19回日本がん予防学会、岐阜（2012年6月）
- 95) 鈴木周五、ピッチャーヌ ポーンシリ、佐藤慎哉、白井智之、高橋智。内因性活性酸素誘導酵素 NADPH oxidase 阻害による前立腺癌進展抑制。第71回日本癌学会学術総会、札幌（2012年9月）
- 96) 鈴木周五、佐藤慎哉、龍訥、ブンファ・ワニサ、白井智之、高橋智。NADPH oxidase 阻害剤 Apocynin による前立腺発癌抑制効果。第28回前立腺シンポジウム、東京（2012年12月）
- 97) 鈴木周五、佐藤慎哉、龍訥、ブンファ・ワニサ、白井智之、高橋智。NADPH oxidase 阻害剤 Apocynin によるラット前立腺発癌抑制効果。第29回日本毒性病理学会、つくば（2013年1月）
- 98) 窪田直人。遺伝子改変マウスを用いた2型糖尿病の分子メカニズムの解明。(研究奨励賞受賞講演) 第85回日本内分泌学会学術総会、名古屋（2012年4月）
- 99) 窪田直人、窪田哲也、井上真理子、岩村智勝、佐藤寛之、林高則、高本偉碩、山内敏正、植木浩二郎、門脇孝。肝臓の糖・脂質代謝における IRS-1、IRS-2 の役割の解明。第85回日本内分泌学会学術総会、名古屋（2012年4月）
- 100) 窪田直人。遺伝子改変マウスを用いた2型糖尿病の分子メカニズムの解明。(学会賞受賞講演) 第49回日本臨床分子医学会学術集会、京都（2012年4月）
- 101) 窪田直人、窪田哲也、渡部拓、西村正治、山内敏正、植木浩二郎、門脇孝。インスリン受容体基質(IRS)に着目した肥満・2型糖尿病における肝臓の糖・脂質代謝調節機構。第55回日本糖尿病学会年次学術集会、横浜（2012年5月）
- 102) 窪田直人。(インスリン抵抗性からみた全身血管の包括的治療 ~大血管から末梢動脈疾患まで~) 血管から診た糖尿病~新たな臨床的意義~。(ランチョンセミナー) 第55回日本糖尿病学会年次学術集会、横浜（2012年5月）
- 103) 窪田直人。2型糖尿病の病態と薬物治療。第一回日本くすりと糖尿病学会学術集会、東京（2012年9月）
- 104) 窪田直人、窪田哲也、井上真理子、植木浩二郎、門脇孝。中枢神経系と肥満研究のフロンティア; 中枢におけるインスリン作用の生理的・病態生理的役割。第33回日本肥満学会、京都（2012年10月）
- 105) 窪田直人、窪田哲也、井上真理子、岩村智勝、高本偉碩、山内敏正、植木浩二郎、門脇孝。インスリン受容体基質(IRS)に着目した肥満・2型糖尿病における肝臓の糖・脂質代謝調節機構。第33回日本肥満学会、京都（2012年10月）
- 106) 窪田直人、窪田哲也、井上真理子、岩村智勝、山内敏正、植木浩二郎、門脇孝。インスリン受容体基質(IRS)に着目した肥満・2型糖尿病における肝臓の糖・脂質代謝調節機構。第

- 62回日本体質医学会総会、大阪(2012年11月)
- 107) 窪田直人。2型糖尿病の病態と治療戦略。日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2012、岐阜(2012年11月)
- 108) 窪田直人。Diabetic Vascular Complications; The role of endothelial insulin signaling in the regulation of glucose metabolism. 第20回日本血管生物医学学会学術集会、徳島(2012年12月)
- 109) 窪田直人。2型糖尿病の病態と薬物治療—今後の展望も含めて—。第50回日本糖尿病学会関東甲信越地方会、横浜(2013年1月)
- 110) 窪田直人、窪田哲也、井上真理子、植木浩二郎、門脇孝。脳内調節機構からみた肥満のメカニズムとその臨床応用; 中枢におけるインスリン作用の生理的・病態生理的役割。第27回日本糖尿病・肥満動物学会、東京(2013年2月)
- 111) 窪田直人。血管の機能 生体イメージングそして血管内皮-血管障害からみたインスリン抵抗性-。第77回日本循環器学会、横浜(2013年3月)

H. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
「腸ポリープ抑制剤」特願 2004-299217、PCT 出願中
- 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

大腸・膵臓発がん抑制物質の検索

分担研究者 武藤 倫弘 国立がん研究センター研究所
がん予防研究分野 ユニット長

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、大腸発がん促進に寄与すると考えられる NADPH oxidase の阻害作用を持つ apocynin の大腸発がんへの影響を肥満 KK-*A^y* マウス及び *Apc* 遺伝子変異のある Min マウスを用いて検討した。Apocynin のアゾキシメタン (AOM) 誘発 KK-*A^y* マウス大腸 aberrant crypt foci (ACF) 生成に与える影響を調べたところ、対照群に比較して、250 mg/L apocynin 投与群で ACF 数が約 30% 減少した。更に Min マウスにおいては 500 mg/L 投与群で腸ポリープ生成数は約 40% 減少した。また、腸ポリープにおける inducible nitric oxide synthase mRNA の発現低下が認められ、これが腸ポリープ生成抑制機序の一つと考えられた。以上の結果より、NADPH oxidase 阻害剤は大腸がん化学予防剤の候補である可能性が示された。

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

【NADPH oxidase 阻害剤の肥満 KK-*A^y* マウス大腸前がん病変に与える影響の検討】

6 週齢雌 KK-*A^y* マウスに、azoxymethane (AOM) を 1 匹当たり 200 μ g の用量で、週 1 回、計 3 週間腹腔内投与した。AOM 投与と同時に NADPH oxidase 阻害剤、apocynin を 250、500 mg/L の濃度で飲水投与し、13 週齢時に全マウスの大腸 aberrant crypt foci (ACF) 数及び ACs 数を測定した。全身における酸化ストレスの評価は血液中の酸化(ox)LDL 値を ELISA で測定することにより評価した。

【NADPH oxidase 阻害剤の Min マウス腸ポリープ生成に与える影響の検討】

Min マウスの genotype の解析は、報告に従い、3 週齢の時にマウスの尾サンプルから DNA を抽出し、PCR-RFLP 法を用いて行った。7 週齢雄 Min マウスも KK-*A^y* マウスと同様に apocynin を 500 mg/L の用量で 6 週間飲水投与した。実験期間中は毎週体重と摂餌量を計測した。13 週齢において解剖を行い、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)、血清トリグリセリド及び総コレステロール量を測定した。全身における酸化ストレスの評価として血中酸化(ox)LDL 値を ELISA で測定した。ROS の評価として、腸ポリープ部位及び非ポリープ部位(上皮)より抽出した mRNA より各種炎症マーカーを realtime-PCR にて評価した。更に生成する一酸化窒素(NO)の評価としてニトロチロシンの発現を、また細胞増殖の指標として PCNA の発現を免疫染色にて評価した。統計学的解析には Dunnett の多重比較検定を用いた。P < 0.05 である場合に有意であるとした。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立がん研究センターの動物実験倫理委員会の承諾を得て行い、実験動物取り扱い(倫理)規定を遵守して

行った。

C. 研究結果

【NADPH oxidase 阻害剤の肥満 KK-*A*^y マウス大腸前がん病変に与える影響の検討】

実験中の体重、摂餌量、全身状態変化において、apocynin 投与による差を認めなかった。13 週齢の apocynin を投与した KK-*A*^y マウスの血清における oxLDL 量を測定したところ、非投与 KK-*A*^y マウスでは平均 216 pg/mL、250 mg/L 投与では平均 195 pg/mL、500 mg/L 投与では平均 188 pg/mL であった。大腸 ACF 生成数は、対照群では 70.5 ± 17.2 (SD) 個に比較して、250 mg/L apocynin 投与群で 48.3 ± 20.6 個 ($p < 0.05$) と減少し、500 mg/L apocynin 投与群では 55.8 ± 22.3 個と減少傾向を認めた。また、大腸の各部位において有意に減少が見られたのは中位と遠位部位であった。ACF のサイズを示す ACs/Focus の値に変化は見られなかった。

【NADPH oxidase 阻害剤の Min マウス腸ポリープ生成に与える影響の検討】

13 週齢の apocynin を投与した Min マウスの血清における oxLDL 量を測定したところ、非投与 Min マウスでは平均 348 pg/mL、投与 Min マウスでは平均 310 pg/mL と若干の低下傾向を認めた。また、Min マウスの腸ポリープ上皮における NADPH oxidase の構成因子 (NOX1, NOX2, p22phox) の発現量を Realtime PCR にて測定したところ、NOX1 は非ポリープ部位の約 5 倍、p22phox は約 10 倍にその発現量が上昇していた。NOX2 の発現量は変わらなかった。また、NOX1, NOX2 p22phox の発現量は apocynin 投与によって有意に抑制しないことがわかった。実験中の体重、摂餌量、全身状態変化においても apocynin 投与による差を認めなかった。

13 週齢における雄 Min マウスの腸ポリープ数は 50.4 ± 6.1 (SE) 個であった。500 mg/L apocynin 投与によって腸ポリープ数は減少し、30.6 ± 3.3 個となった ($p < 0.05$)。また、小腸の各部位において有意に減少が見られたのは遠位部位であり、非投与群で 34.1 ± 4.6 個に対し、投与群では 19.7 ± 1.3 個 ($p < 0.05$) であった。大腸は非投与群で 1.1 ± 0.4 個に対し、投与群では 0.3 ± 0.8 個であり、減少傾向を示した。

次に腸ポリープ数への影響のメカニズムを明らかにする目的で、酸化関連因子に注目し、且つ発がん促進に寄与すると考えられている inducible nitric oxide

synthase (iNOS)、Pai-1、IL-6 の発現変化を検討した。その結果、apocynin 投与によって iNOS の発現が低下していた。その他、細胞増殖に関わる c-Myc の発現が減少していた。このため、腸ポリープ部位における免疫染色行くと、投与群の腸ポリープにおいてニトロチロシンの抗体で染まる核の数の若干の低下を主に腸ポリープ基底部に認めることが出来た。しかしながら、細胞の増殖を示す PCNA 染色では腸ポリープ全体的な染色陽性像が認められた。

D. 考察

わが国において食生活の欧米化による大腸がんの増加が指摘されている。また、動物発がん実験においても高脂肪食は大腸発がんを促進する。一方、食生活に起因する脂質異常症、糖尿病、肥満等メタボリックシンドロームの原因と考えられる内臓脂肪量と大腸腺腫数及び血中アディポサイトカイン値が相関することも報告されるとともに、高トリグリセリド血症が大腸粘膜内がん、腺腫、腺がんの発症リスクを上昇させることもわかってきた。一方、肥満や過体重における内臓脂肪の蓄積が大腸がんのリスクを上昇させる理由として強い酸化ストレス状態が注目されている。細胞内の補酵素 NADPH は、脂肪合成及びエネルギー生成時に利用されるため、肥満において NADPH は余剰な状態にあり、この余った NADPH の除去は NADPH oxidase により行われるが、この酸化反応時に活性酸素種 (ROS) が産生される。しかし、NADPH oxidase 阻害による大腸がん予防効果はあまり良く分かっていない。

我々はこれまでに 2 種類の *Apc* 遺伝子欠損マウスの血清トリグリセリド値が経時的に急激に上昇することを見出した。更に、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) リガンドや NO-1886 (LPL 誘導剤) を用い、*Apc* 遺伝子欠損 Min マウスでみられる高トリグリセリド血症状態を改善すると、腸ポリープ生成が抑制できることを見出してきた。また、トリグリセリドで制御される Pai-1 の阻害剤は Min マウスの腸ポリープ生成を抑制することも見出した。*Apc* 遺伝子欠損マウスは太ったマウスではないが、生化学的・分子生化学的にメタボリックシンドロームの病態をよく反映しているマウスであると考えられる。更に、Agouti タンパクが異常発現し、過食により肥満となる KK-*A*^y マウスもメ

タボリックシンドロームの病態をよく反映しているマウスである。このマウスは、多遺伝子によって肥満が誘導されるヒトと同じ過食による肥満を呈し、AOM 誘発大腸発がんの高い感受性を示すことを我々は見出している。更に、血清脂質値や血清 Pai-1 値が高い。今回、NADPH oxidase 阻害剤として apocynin を用い、Min マウス及び KK-A^y マウスにおける前がん病変への影響を検討した。

Apocynin は民間薬として肝疾患、心疾患、喘息に用いられていた西ヒマラヤ産コオウレン属の植物 *Picrorhiza kurroa* の根茎から単離された化合物で、NADPH oxidase の阻害作用を持つことが知られている。NADPH oxidase 阻害剤を用いた理由としては、近年 NADPH oxidase 阻害剤は動脈硬化を阻害する薬剤としても期待されており、企業における開発も盛んだからである。また、NADPH oxidase の構成成分で NOX1 はヒト大腸上皮において強く発現している。

本検討において、Min マウスに生成した腸ポリープにおける NADPH oxidase の構成成分の発現量を検討すると NOX1 も p22phox も上昇しており、その発現が腺腫にて上昇していることが初めて分かった。Apocynin の NOX1 や p22phox の発現における影響であるが、apocynin は活性阻害剤であるから、NOX1 も p22phox の発現には強く影響を及ぼさず、減少傾向のみに留まったと考えられる。両マウスにおける全身的酸化ストレスを血液中の酸化 (ox) LDL 値より測定すると、apocynin の投与により改善することが分かった。Apocynin の投与により KK-A^y マウスにおける ACF 生成数を減少させた。また、Min マウスに生成した腸ポリープ数も減少させた。更に、腸ポリープ部位における ROS の影響として iNOS の発現量を検討すると apocynin の投与によりその発現量が減少した。また、免疫染色を行うことにより NO の影響を受けるニトロチロシン陽性細胞数の若干の低下を腸ポリープ基底部分で認めることが出来た。しかしながら、細胞の増殖を示す PCNA 染色では腸ポリープ全体的な染色陽性像とその染色強度の低下が認められ、その相関性には更なる解明が必要と考えられた。NADPH oxidase 阻害と NF-kappaB 活性阻害との関連が報告されており、iNOS の発現が NF-kappaB によっても制御されていることを考えると今後、apocynin による NF-kappaB 転写活性阻害能を検討する必要がある。

以上の結果より、NADPH oxidase は一部 iNOS 発現を介し大腸発がんに関与している可能性が示された。NADPH oxidase 阻害剤の発がん抑制作用が、乳腺がん等の他の肥満関連がんにおいても認められるか検討する必要がある。今回は、腺がんではなく腺腫の状態において NADPH oxidase の発現が高いことが見出されたが、がんにおけるその発現も検討する必要がある。これらの研究を進めることにより、より詳細な大腸発がんの機序や大腸発がん予防方策のデータが得られるものと考えられる。

E. 結論

現在、食の欧米化や運動の不足に伴って、大腸がん及びメタボリックシンドローム患者が増加していることを考えると、メタボリックシンドロームのモデルを用いた検討を今後さらに詳細に行うことにより、大腸がん予防方法の新たな知見が得られるものと考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究論文

1. 論文発表

- 1) Arai, Y., Totoki, Y., Takahashi, H., Nakamura, H., Hama, N., Kohno, T., Tsuta, K., Yoshida, A., Asamura, H., Mutoh, M., Hosoda, F., Tsuda, H., Shibata, T. Mouse model for ROS1-rearranged lung cancer. *PLoS One*, **8**:e56010, 2013.
- 2) Ueno, T., Imaida, L., Yoshimoto, M., Hayakawa, T., Takahashi, M., Imai, T., Yanaka, A., Tsuta, K., Komiya, M., Wakabayashi, K., Mutoh, M. Non-invasive X-ray micro-computed tomographic evaluation of indomethacin on urethane-induced lung carcinogenesis in mice. *Anticancer Res.*, **32**:4773-4780, 2012.
- 3) Ueno, T., Teraoka, N., Takasu, S., Nakano, K., Takahashi, M., Yamamoto, M., Fujii, G., Komiya, M., Yanaka, A., Wakabayashi, K., Mutoh, M. Suppressive effect of pioglitazone, a PPAR gamma ligand, on azoxymethane-induced colon aberrant crypt foci in KK-Ay mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **13**:4067-4073, 2012.

- 4) Ishino, K., Mutoh, M., Totsuka, Y., Nakagama, H. Metabolic syndrome : A novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett.*, in press, 2012.
- 5) Shimura, M., Yamamoto, M., Fujii, G., Takahashi, M., Komiya, M., Noma, T., Tanuma, S., Yanaka, A., Mutoh, M. Novel compound SK-1009 suppresses interleukin-6 expression through modulation of activation of nuclear factor-kappaB pathway. *Bio. Pharm. Bull.*, **35**:2186-2191, 2012.
- 6) Takahashi, M., Mutoh, M., Ishigamori, R., Fujii, G., Imai, T. Involvement of inflammatory factors in pancreatic carcinogenesis and preventive effects of anti-inflammatory agents. *Semin. Immunopathol.*, **35**:203-227, 2013.
- 7) Hori, M., Onaya, H., Takahashi, M., Hiraoka, N., Mutoh, M., Kosuge, T., Nakagama, H. Invasive ductal carcinoma developing in pancreas with severe Fatty infiltration. *Pancreas*, **41**:1137-1139, 2012.
- 8) Yoshimoto, M., Hayakawa, T., Mutoh, M., Imai, T., Tsuda, K., Kimura, S., Umeda, IO., Fujii, H., Wakabayashi, K. In vivo SPECT imaging with ¹¹¹In-DOTA-c(RGDfK) to detect early pancreatic cancer in a hamster pancreatic carcinogenesis model. *J. Nucl. Med.*, **53**:765-771, 2012.
- 9) Takasu, S., Mutoh, M., Takahashi, M., Nakagama, H. Lipoprotein lipase as a candidate target for cancer prevention/therapy. *Biochem. Res. Int.*, **2012**:398697, 2012.
- 10) Matsubara, S., Takasu, S., Tsukamoto, T., Mutoh, M., Masuda, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y. Induction of glandular stomach cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int. J. Cancer*, **130**:259-266, 2012.
- 11) Ito, K., Ishigamori, R., Mutoh, M., Ohta, T., Imai, T., Takahashi, M. A^β allele promotes azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis via macrophage migration in hyperlipidemic/diabetic KK mice. *Cancer Sci.*, in press.
- 12) Komiya, M., Fujii, G., Takahashi, M., Iigo, M., Mutoh, M. Prevention and intervention trials for colorectal cancer. *Jpn. J Clin. Oncol.*, in press
2. 学会発表
- 1) 一二三佳恵、高橋真美、藤井元、山本真史、中野勝也、小宮雅美、志村美聖、石ヶ守里加子、谷中昭典、武藤倫弘。Angiotensin II受容体拮抗薬およびbiganide薬の併用投与によるMinマウス腸ポリープ生成抑制。平成23年度「固体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、琵琶湖ホテル（2012年1月18, 19日）
- 2) 中野勝也、藤井元、高橋真美、山本真史、一二三佳恵、志村美聖、中西るり、小宮雅美、谷中昭典、武藤倫弘。低密度リポタンパク受容体欠損のマウス大腸異常腺窩巣生成に対する影響。平成23年度「固体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、琵琶湖ホテル（2012年1月18, 19日）
- 3) 中野勝也、武藤倫弘、高橋真美、藤井元、山本真史、一二三佳恵、志村美聖、中西るり、小宮雅美、谷中昭典。大腸aberrant crypt foci生成に対するlow-density lipoprotein受容体欠損の影響。第8回日本消化管学会総会学術集会、仙台（2012年2月10-11日）
- 4) Yanaka, A., Hifumi, Y., Fujii, G., Takahashi, M., Yamamoto, M., Nakano, K., Shimura, M., Mutoh, M. Combination effects of angiotensin II receptor blocker and metformin on suppression of intestinal polyp formation in Min mice Digestive Disease Week May 19-22, 2012, SanDiego, CA, USA.
- 5) 武藤倫弘。大腸発がんメカニズムにおける脂質代謝の寄与。第19回日本がん予防学会、岐阜（2012年6月22, 23日）
- 6) 志村美聖、山本真史、藤井元、高橋真美、小宮雅美、中西るり、石ヶ守里加子、一二三佳恵、野間寛陽、谷中昭典、田沼靖一、武藤倫弘。SK1009におけるIL-6産生阻害メカニズムの検討。第19回日本がん予防学会、岐阜（2012年6月22, 23日）

- 7) 高須伸二、武藤倫弘、一二三佳恵、若林敬二、中釜斉。アンジオテンシンII受容体拮抗薬のMinマウス腸ポリープ生成抑制効果。第19回日本がん予防学会、岐阜 (2012年6月22, 23日)
- 8) 一二三佳恵、藤井 元、高橋真美、山本真史、高須伸二、小宮雅美、中西るり、志村美聖、野間寛陽、谷中昭典、武藤倫弘。Metformin及びlosartan併用投与によるMinマウス腸ポリープ生成抑制。第19回日本がん予防学会、岐阜 (2012年6月22, 23日)
- 9) 小宮雅美、藤井 元、高橋真美、中西るり、志村美聖、野間寛陽、武藤倫弘。AdiponectinとPai-1の相互作用機構の解明。第19回日本がん予防学会、岐阜 (2012年6月22, 23日)
- 10) 高橋真美、石ヶ守里加子、中西るり、武藤倫弘、今井俊夫。膵臓特異的K-ras変異体発現マウスの膵臓発がん過程におけるオステオポンチンの作用。第19回日本がん予防学会、岐阜 (2012年6月22, 23日)
- 11) 武藤倫弘。アディポサイトカインと大腸発がん。第44回日本動脈硬化学会、福岡 (2012年7月19, 20日)
- 12) Wakabayashi, K., Matsubara, S., Takasu, S., Tsukamoto, T., Mutoh, M., Totsuka, Y. Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. 3rd ACEM.
- 13) 堀美香、高橋真美、女屋博昭、平岡伸介、山路太樹、武藤倫弘、金井弥栄、中釜斉。脂肪膵の膵がんにおける意義及びCTを用いた評価方法の確立。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 14) 高橋真美、石ヶ守里加子、小宮雅美、武藤倫弘、今井俊夫。膵臓特異的K-ras変異体発現マウスと肥満モデルKK-A^yマウスとの交配による膵臓発がん促進。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 15) 石野孔祐、戸塚ゆ加里、武藤倫弘、中釜斉。ヒト白血球を用いた肥満関連DNA付加体の網羅的解析。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 16) 新井康仁、十時泰、高橋裕之、中村浩実、濱奈津子、河野隆志、蔦幸治、吉田朗彦、武藤倫弘、細田文恵、津田均、柴田龍弘。肺腺癌からのROS1融合遺伝子の単離とマウスモデルの作成。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 17) 武藤倫弘。糖尿病関連がんにおける高トリグリセリド血症の役割。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 18) 藤井 元、山本真史、高橋真美、野間寛陽、志村美聖、武藤倫弘。Minマウス腸ポリープ生成抑制に対するロサルタン+メトホルミンの相乗効果。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 19) 志村美聖、山本真史、藤井元、小宮雅美、野間寛陽、高橋真美、谷中昭典、田沼靖一、武藤倫弘。SK-1009におけるIL-6産生阻害作用メカニズムの検討。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 20) 野間寛陽、武藤倫弘、藤井元、志村美聖、小宮雅美、高橋真美、田沼靖一。松かさリグナン配糖体の大腸がん細胞におけるCOX-2発現の抑制効果。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 21) 小宮雅美、藤井 元、野間寛陽、志村美聖、高橋真美、武藤倫弘。肥満関連がんにおけるアディポネクチンとPai-1の相互作用の役割。第71回日本癌学会総会、札幌 (2012年9月19-21日)
- 22) 吉留弘子、藤本京子、櫻井瞳、波多江日成子、木本裕、小川浩一、藤井元、武藤倫弘、和田守正。Apc^{Min/+}マウスにおけるトウモロコシ繊維の腸ポリープ数減少効果。第29回日本薬学会九州支部大会、熊本 (2012年12月8-9日)
- 23) 藤本京子、櫻井瞳、波多江日成子、吉留弘子、木本裕、小川浩一、藤井元、武藤倫弘、和田守正。トウモロコシ繊維によるApc^{Min/+}マウスにおける腸ポリープ数の減少。第35回日本分子生物学会年会、福岡 (2012年12月11-14日)
- 24) Mutoh, M., Fujii, G., Komiya, M., Takahashi, M., Nakagama, H. Role of hyperlipidemia in intestinal carcinogenesis in association with lipoprotein receptor. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Feb. 21-25, Maui, Hawaii, USA
- 25) Takahashi, M., Hori, M., Hiraoka, N., Yamaji, T., Mutoh, M., Kanai, Y., Nakagama, H. Involvement of fatty infiltration in pancreatic cancer in humans and animals. Ninth AACR-Japanese Cancer

Association Joint Conference, Feb.
21-25, Maui, Hawaii, USA

H. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
「腸ポリープ抑制剤」特願 2004-299217、
PCT 出願中
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

大腸・舌発がん抑制物質の検索

分担研究者 田中 卓二 岐阜大学 非常勤講師

研究要旨 一酸化窒素 (NO) の腫瘍に対する作用に着目し、発がん抑制候補物質であるフェルラ酸誘導体 4'-geranyloxy-ferulic acid (GOFA) に L-NAME を付加した NO ドナー化合物、GOFA-L-NAME を合成し、炎症関連大腸発がんに対する影響を検討した。その結果、100 ppm および 500 ppm GOFA-L-NAME 投与により、AOM/DSS 誘発大腸腺がんの発生頻度・個数が有意に低下し、GOFA-L-NAME の炎症関連大腸発がんに対する有用性が示唆された。

A. 研究目的

一酸化窒素 (NO) の半減期 (3~6 秒) は極めて短く、水相に比較し油相に 6 倍溶解やすく、拡散により容易に細胞膜を通過して、細胞内の標的分子に働く。NO の生体内での作用は、NO 合成酵素 (NOS) のアイソフォーム (nNOS、iNOS、eNOS) の相違、組織 NO 産生量およびアンカッピングの有無によって規定される。NO は至適低濃度では生体防御的に、過剰高濃度では障害因子として作用し、その二面性が知られている。一方、NO の発がんへの関与は、一般的に高濃度では抑制的に、低濃度では促進的に働くとされている。これは、NO の p53 や apoptosis への作用によると考えられている。近年、この NO のがんへの作用に着目した研究が実施されている。最大の抗増殖性活性と最小副

作用を有する理想的な NO ドナー化合物を作出し、がん抑制に寄与しようとするものである。例えば、NO 部分を既知の薬剤に付加することによって NO ドナー薬剤 (NO-NSAID など) が開発され、個々の薬剤の抗腫瘍効果に付加的効果を提供し、一方で副作用 (NSAID 誘発消化性潰瘍) を最小化しようとする試みが行われている。

分担研究者は、これまでフェルラ酸誘導体 4'-geranyloxy-ferulic acid (GOFA) の発がん抑制効果について報告してきた (Nutr Cancer, 60: 675, 2008; Int J Cancer 126: 830, 2010)。本研究では NO ドナー化合物、GOFA-L-NAME を合成し、炎症関連大腸発がんモデルを使用して、炎症を背景とする大腸発がんに対する影響を検討した。

B. 研究方法

実験は 56 匹の雄性 ICR マウス (5 週齢) を使用した。実験群は AOM/DSS 群 (n=12)、AOM/DSS/100 ppm GOFA-L-NAME 群 (n=12)、AOM/DSS/500 ppm GOFA-L-NAME 群 (n=12)、500 ppm GOFA-L-NAME 群 (n=5)、AOM 群 (n=5)、DSS 群 (n=5)、無処置群 (n=5) の 7 群とした。大腸腫瘍は AOM (10 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与後、1.5% DSS を 1 週間飲水投与して誘発した。GOFA-L-NAME は DSS 投与 1 週後より 15 週間混餌投与した。実験は 18 週で終了し、病理組織学的解析を行った。

別に、4 週間の短期実験にて、1.5% DSS の 1 週間飲水投与マウスにて GOFA-L-NAME 混餌投与 (100, 500 ppm) の大腸粘膜における Cox-2, iNOS (Nos2), Tnf-alpha, Il-1beta, Il-6, Mip-2 (IL-6) の mRNA 発現を quantitative real-time RT-PCR 法にて解析した。実験群は 1.5% DSS 群 (n=5)、1.5% DSS+100 ppm GOFA-L-NAME 群 (n=5)、1.5% DSS+500 ppm GOFA-L-NAME 群 (n=5)、500 ppm GOFA-L-NAME 群 (n=5)、無処置群 (n=5) とした。

(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

実験終了時に詳細な肉眼的観察を行い、次いで病理組織学的解析を実施した。その結果、大腸腺がんの発生率は AOM/DSS

群 : 100%、AOM/DSS/100 ppm GOFA-L-NAME 群 : 42% ($p < 0.005$)、AOM/DSS/500 ppm GOFA-L-NAME 群 : 17% ($p < 0.001$) であった。一方、大腸腺がんの発生個数 (/匹) は AOM/DSS 群 : 3.50 ± 2.47 、AOM/DSS/100 ppm GOFA-L-NAME 群 : 0.50 ± 1.67 ($p < 0.01$ 、93% 抑制率)、AOM/DSS/500 ppm GOFA-L-NAME 群 : 0.17 ± 1.39 ($p < 0.001$ 、95% 抑制率) であった。大腸腺腫の発生率 (発生個数 / 匹) は AOM/DSS 群 : 92% (2.17 ± 1.47)、AOM/DSS/100 ppm GOFA-L-NAME 群 : 33%, $p < 0.005$ (0.42 ± 0.67 、 $p < 0.001$ 、81% 抑制率)、AOM/DSS/500 ppm GOFA-L-NAME 群 : 17%, $p < 0.001$ (0.17 ± 1.39 、 $p < 0.001$ 、92% 抑制率) であった。他群に大腸腫瘍の発生はなかった。

短期実験の結果では、DSS 投与により発現が増加した大腸粘膜における Cox-2, Nos2, Tnf-alpha, Il-1beta, Il-6, Mip-2 (IL-6) の mRNA 発現が 500 ppm GOFA-L-NAME 混餌投与で有意 ($p < 0.05$ ないし $p < 0.001$) に低下し、100 ppm GOFA-L-NAME 混餌投与では Mip-2 (IL-6) 発現のみが有意 ($p < 0.05$) に低下していた。

D. 考察

本研究の結果から、GOFA に L-NAME を付加した NO ドナー化合物、GOFA-L-NAME の炎症関連大腸発がん抑制効果が示唆された。加えて、GOFA-L-NAME は大腸粘膜における Cox-2, Nos2, Tnf-alpha, Il-1beta, Il-6, Mip-2 (IL-6) などの炎症性サイトカインの発現も 500 ppm GOFA-L-NAME 混

餌投与で低下していた。この効果は、今回新たに見出された GOFA-L-NAME の抗炎症作用に起因すると推察された。本実験で得られた GOFA-L-NAME の発がん抑制結果（100 ppm GOFA-L-NAME, 93%抑制率; 500 ppm GOFA-L-NAME, 95%抑制率）は、これまで報告した 100 ppm GOFA (73%抑制率)、500 ppm GOFA (87%抑制率) の抑制率に比べ、特に低濃度（100 ppm）で上昇しており、GOFA-L-NAME の炎症関連大腸発がんに対する有用性が示唆された。

これまで、腫瘍発生における NO の役割を検討するためにいくつかの NO ドナー化合物が使用されてきた。古くは、*N*-nitroso 化合物で、そのうち dimethylnitroamine は半世紀前に見出されたもので、発がん物質であった。NO は、従来の治療薬に対する腫瘍細胞耐性を克服する薬剤としても有効とされる。NO の腫瘍に対する多様な作用（抗腫瘍から腫瘍発生促進）は、NO が作用する細胞系、反応のレドックス状態、その細胞内濃度と細胞内暴露期間など、微小環境に依存している。

NO ドナーの医療適用は、顕著な低血圧を惹起する血管拡張やシアン化物のような中毒性代謝産物の蓄積などの副作用によって制限されてきた。しかし、近年は、最大の抗増殖性活性と最小副作用を有する理想的な NO ドナー化合物を作出するための研究が進行中である。例えば、NO-NSAID などが合成され、個々の薬剤の抗腫瘍効果に付加的効果を提供し、一方で副作用を最小化しようとするものであ

る。NO-NSAID は、NCI 後援の第一相無作為試験（結腸直腸がんの高危険群患者に対する NO-アスピリン錠の効果）が進行中である。

今回得られた GOFA-L-NAME の炎症関連大腸発がん抑制効果の詳細な機構解析は前がん性病変（dysplastic crypts）発生への影響や Lgr5⁺がん幹細胞への影響を中心に進行中である。別に新規合成した auraptene-L-NAME-beta-cyclodextrin、GOFA-L-NAME-beta-cyclodextrin の炎症関連大腸発がん抑制効果を検証中である。

E. 結論

NO ドナー化合物として新規に合成した GOFA-L-NAME は炎症関連大腸発がんを顕著に抑制することが判明した。抑制機構として、GOFA-L-NAME の抗炎症作用が示唆された。NO ドナー化合物は新規がん化学予防剤の素材として有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shimizu, M., Kubota, M., Tanaka, T., Moriwaki, H. Neutraceutical approach for preventing obesity-related colorectal and liver carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(1): 579-595, 2012.

Tanaka, T., Tanaka, T., Tanaka, M., Kuno, T. Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of beta-cryptoxanthin and hesperidin. *J. Biomed. Biotechnol.*, Volume 2012, Article ID 516981, 2012.

Tanaka, T. Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *Int. J. Inflammation*,

- Volume 2012, Article ID 658786, 2012.
- Tanaka, T., Shimizu, M., Moriwaki, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*, 17(3): 3202-3242, 2012.
- Kuno, T., Tsukamoto, T., Hara, A., Tanaka, T. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *J. Biophys. Chem.*, 3(2): 156-173, 2012.
- Mann, P.C., Vahle, J., Keenan, C.M., Baker, J.F., Bradley, A.E., Goodman, D.G., Harada, T., Herbert, R., Kaufmann, W., Kellner, R., Nolte, T., Rittinghausen, S., Tanaka T. International harmonization of toxicologic pathology nomenclature: an overview and review of basic principles. *Toxicol. Pathol.*, 40(4 Suppl):7S-13S, 2012.
- Tanaka, T. Animal models of carcinogenesis in inflamed colorectum: Potential use in chemoprevention study. *Curr. Drug Targets*, 13(14): 1689-1697, 2012.
- Katsurano, M., Niwa, T., Yasui, Y., Shigematsu, Y., Yamashita, S., Takeshima, H., Lee, M.S., Kim, Y.J., Tanaka, T., Ushijima, T. Early-stage formation of an epigenetic field defect in a mouse colitis model, and non-essential roles of T- and B-cells in DNA methylation induction. *Oncogene*, 31(3): 342-351, 2012.
- Hata, K., Kubota, M., Shmizu, M., Moriwaki, H., Kuno, T., Tanaka, T., Hara, A., Hirose, H. Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 33(3): 702-707, 2012.
- Ogawa, K., Takeshi Hara, T., Shimizu, M., Ninomiya, S., Nagano, J., Sakai, H., Hoshi, M., Ito, H., Tsurumi, H., Saito, K., Seishima, M., Tanaka, T., Moriwaki, H. Suppression of azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by 1-methyltryptophan, an inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Cancer Sci.*, 103(5): 951-958, 2012.
- Shimasaki, T., Ishigaki, Y., Nakamura, Y., Takata, T., Nakaya, N., Nakajima, H., Satoh, I., Zhao, X., Kitano, A., Kawakami, K., Tanaka, T., Takegami, T., Tomosugi, N., Minamoto, T., Motoo, Y. Glycogen synthase kinase 3beta inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to Gemcitabine. *J. Gastroenterol.*, 47(3): 321-333, 2012.
- Okada, H., Honda, M., Campbell, J.S., Sakai, Y., Yamashita, T., Takebuchi, Y., Hada, K., Shirasaki, T., Takabatake, R., Nakamura, M., Sunakozaka, H., Tanaka, T., Fausto, N., Kaneko, S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res.*, 72(17): 4459-4471, 2012.
- Tanaka, T. Preclinical cancer chemoprevention studies using animal model of inflammation-associated colorectal carcinogenesis. *Cancers*, 4(3): 673-700, 2012.
- Nakajima, H., Koizumi, K., Tanaka, T., Ishigaki, Y., Yoshitake, Y., Yonekura, H., Sakuma, T., Fukushima, T., Umehara, H., Ueno, S., Minamoto, T., Motoo, Y. Loss of HITS (FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis. *Int. J. Oncol.*, 41(4): 1347-1357, 2012.
- Yoshimi, K., Hashimoto, T., Niwa, Y., Hata, K., Serikawa, T., Tanaka, T., Kuramoto, T. Use of a chemically induced-colon carcinogenesis-prone *Apc*-mutant rat in a chemotherapeutic bioassay, *BMC Cancer*, 12(1):448, 2012.
- Terakura, D., Shimizu, M., Iwasa, J., Baba, A., Kochi, T., Ohno, T., Kubota, M., Shirakami, Y., Shiraki, M., Takai, K., Tsurumi, H., Tanaka, T., Moriwaki, H. Preventive effects of branched-chain amino acid supplementation on the spontaneous development of hepatic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-db/db obese mice. *Carcinogenesis*, 33(12): 2499-2506, 2012.
- Kawabata, K., Tung, N.H., Shoyama, Y., Sugie, S., Mori, T., Tanaka, T. Dietary crocin inhibits colitis and colitis-associated colorectal carcinogenesis in male ICR mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med. (eCAM)*, Vol. 2012, Article ID 820415, 2012.
- Sakamoto, H., Takenaka, M., Ushimaru, K., Tanaka, T. Use of liquid-based cytology (LBC) and cell blocks from cell remnants for cytologic, immunohistochemical, and immunocytochemical diagnosis of malignancy. *Open J. Pathol.*, 2(3): 58-65, 2012.

Tanaka, T. Introduction for inflammation and cancer. *Semin. Immunopathol.*, 35(2): 121-122, 2013.

Shimizu, M., Tanaka, T., Moriwaki, H. Obesity and hepatocellular carcinoma: targeting obesity-related inflammation for chemoprevention of liver carcinogenesis. *Semin. Immunopathol.*, 35(2): 191-202, 2013.

Tanaka, T., Ishikawa, H. Mast cells and inflammation-associated colorectal carcinogenesis. *Semin. Immunopathol.*, 35(2): 245-254, 2013.

Kuno, T., Hatano, Y., Tomita, H., Hara, A., Hirose, Y., Hirata, A., Mori, H., Terasaki, M., Masuda, S., Tanaka, T. Organo-Magnesium Suppresses Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis in Male Crj: CD-1 Mice. *Carcinogenesis*. 34(2): 361-369, 2013.

坂本寛文、竹中麻紀代、牛丸一樹、田中卓二：液状処理細胞診による子宮内膜の細胞像について。日本臨床細胞学会誌 52(1): 8-11, 2013.

2. 学会発表

吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志：Apc 変異ラットにおける DSS 誘発大腸炎感受性機構の解明。平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ「個体レベルのがん研究のパラダイム—動物がんモデルと分子機構の解明—」、大津、1 月 18-19 日、2012 年。

杉江茂幸、尾山 武、田中卓二：PhIP 誘発大腸発がんにおける去勢の修飾作用。第 28 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2 月 2-3 日、2012 年。

田中卓二、久野壽也、原 明：C57BL/KsJ-*db/db-Apc^{Min/+}*マウスにおける腸管腫瘍発生。第 28 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2 月 2-3 日、2012 年。

久野壽也、田中卓二、廣瀬善信、原明：TSOD マウスの 4-nitroquinoline 1-oxide 誘発肺発癌感受性の検討。第 28 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2 月 2-3 日、2012 年。

Tanaka, T., Hata, K., Shimizu, M., Kuno, T., Hara, A., Hirose, Y. Congenic C57BL/KsJ-*db/db-Apc^{Min/+}* mice increase intestinal tumors. 平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ「個体レベルのがん研究のパラダイム—動物がんモデルと分子機構の解明—」、大津、1 月 18-19 日、2012 年。

吉見一人、田中卓二、芹川忠夫、庫本高志：Apc 変異ラットにおける DSS 誘発大腸炎感受性機構の解明。第 59 回日本実験動物学会総会、別府、5 月 24-26 日、2012 年。

竹中麻紀代、牛丸一樹、坂本寛文、田中卓二：液状処理細胞診による子宮内膜の細胞像について。第 53 回日本臨床細胞学会総会（春期大会）、幕張メッセ、千葉、6 月 1-3 日、2012 年。

豊田武士、塚本徹哉、高須伸二、時 亮、田中卓二、立松正衛、西川秋佳、小川久美子：ヘリコバクター・ピロリ感染齧歯類モデルにおける HMG-CoA 還元酵素阻害剤の化学予防効果の検討。第 19 回日本がん予防学会、岐阜、6 月 22-23 日、2012 年。

川端邦裕、Nguen Huu Tung、久野壽也、原 明、正山征洋、田中卓二：Crocin による炎症関連大腸発がんモデルに対する修飾効果。第 19 回日本がん予防学会、岐

阜、6月22~23日、2012年。

杉江茂幸、田中卓二：炎症関連マウス大腸発がんにおけるバイカリンの修飾効果。第19回日本がん予防学会、岐阜、6月22~23日、2012年。

塚本徹哉、田中卓二：コーヒーおよびその成分を用いたDSS誘発大腸炎に対する抑制効果の検討。第19回日本がん予防学会、岐阜、6月22~23日、2012年。

三好規之、永沢友樹、田中卓二、若林敬二、大島寛史：肥満モデルマウスKK-Ayにおける山薬およびジオスゲニンの大腸発がん予防分子機構解析。第19回日本がん予防学会、岐阜、6月22~23日、2012年。

久野壽也、田中卓二、廣瀬善信、平田暁大、原明：Fenofibrateの4-NQO誘発肥満、高脂血症マウス肺増殖性病変に及ぼす影響。第19回日本がん予防学会、岐阜、6月22~23日、2012年。

Tanaka, T., Epifano, F., Kochi, T., Genovese, S., Scauri, L., Shimizu, M., Moriwaki, H. 4'-GERANYLOXYFERULIC ACID-L-NAME INHIBITS INFLAMMATION-RELATED COLORECTAL CARCINOGENESIS IN MICE. International Congress on Natural Products Research (ICNPR) 2012, New York City, USA, July 28-August 1, 2012.

Tanaka, T. Kawabata, K. A water-soluble carotenoid crocin suppresses AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis in mice. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer

Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

Tsuchida, T., Zheng, Y., Zhang, R.-R., Ishibashi, N., Tanaka, T., Taniguchi, H. The cyclic retinoid Peretinoin inhibits the development of precancerous cells to block hepatocellular carcinogenesis. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

Kochi, T., Shimizu, M., Terakura, D., Baba, A., Ohno, T., Kubota, M., Shirakkami, Y., Tanaka, T., Moriwaki, H. Development of a new nonalcoholic steatohepatitis-related liver tumorigenesis model using obese and hypertensive rats. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

Shimizu, M., Hata, K., Kubota, M., Kuno, T., Hara, A., Hirose, Y., Tanaka, T., Moriwaki, H. Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

Terakura, D., Shimizu, M., Moriwaki, H., Tanaka, T., Kubota, M., Kochi, T., Baba, A., Ohno, T., Ninomiya, S. Preventive effects of BCAA on the development of hepatic preneoplastic

lesion in C57BL/KsJ-db/db obese mice. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

Yoshimi, K., Tanaka, T., Kuramoto, T. Functional analysis of the extreme C-terminal Apc gene in DSS-induced colitis. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

Sugie, S. Tanaka, T. Chemopreventive effect of baicalin in inflammation related colon carcinogenesis. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

Kuno, T., Tanaka, T., Takamatsu, M., Hatano, Y., Tomita, H., Hirose, Y., Hirata, A., Hara, A. A PPARalpha agonist, fenofibrate, suppresses 4-NQO-induced pulmonary proliferative lesions in obese and hyperlipidemic mice. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

Tsukamoto, T., Tanaka, T. Preventive effect of coffee on dextran sulfate sodium induced colitis. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21, 2012.

寺倉大志、清水雅仁、馬場 厚、大野智彦、河内隆宏、久保田全哉、岩佐淳平、白上洋平、田中卓二、森脇久隆：分岐ア

ミノ酸は肝および脂肪組織の炎症を改善し肥満関連肝腫瘍形成を抑制する。第20回日本消化器関連学会週間 (JDDW2012)、神戸、10月10~13日、2012年。

Nohmi, T., Toyoda-Hokaiwado, N., Yasui, Y., Takamune, M., Yamada, M., Muramatsu, M., Masumura, K., Ohta, T., Tanaka, T. MODURATORY EFFECTS OF CAPSAICIN ON N-DIETHYLNITROSAMINE-INDUCED MUTAGENESIS AND HEPATOCARCINOGENESIS IN GPT DELTA RATS. 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens (3rd ACEM) and 15th Conference of Chinese Environmental Mutagen Society, Hangzhou, China, October 23-26, 2012.

森 栄、山口吉夫、田中卓二、丹羽憲司：術中捺印細胞診が有用であったアンドロゲン産生性顆粒膜細胞腫 (GCT) の1例。第51回日本臨床細胞学会秋期大会、新潟、11月9~10日、2012年。

杉江茂幸、安藤ちあき、坂本寛文、波多野裕一郎、中嶋早苗、久米 真、田中卓二：吸引穿刺細胞診にて診断しえた膵臓の solid-pseudopapillary tumor の一例。第51回日本臨床細胞学会秋期大会、新潟、11月9~10日、2012年。

Yasui, Y., Tanaka, T. Marine carotenoids, astaxanthin and fucoxanthin, inhibit colitis and colitis-associated colorectal carcinogenesis in mice. 2012 Annual Conference & Exhibition, Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health

Products and Dietary Supplements,
Hawaii, USA, December 2-6, 2012

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

大腸発がん抑制物質の検索

分担研究者 塚本徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨 マウスを用いてコーヒーによる大腸がん予防効果を検討した。C57BL/6J マウスに azoxymethane 投与後、2 % dextran sulfate sodium を飲水投与し、水 (A 群 : 対照群)、インスタントコーヒー (B 群)、フレンチプレスコーヒー (C 群)、chlorogenic acid (D 群、2500 ppm)、cafestol (E 群、72 ppm) 投与群を設け、実験第 8 および 12 週で屠殺した。第 8 週では、A 群に比して、B から F 群で腫瘍発生個数の有意な減少、C 群で腫瘍体積の有意な低下が見られた。炎症性マーカーの検討では、C 群で TNF- α 、iNOS、IL-17A、FoxP3 の低下、E 群で FoxP3 の低下が見られた。Cafestol を多く含むフレンチプレスコーヒーが、Th17 あるいは Treg 経路に関与し、DSS による炎症を抑制して大腸発がんの制御に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、コーヒー摂取と発がんに関して多数の疫学的な解析が行われており、一日 5 杯以上のコーヒーを摂取するヒトで大腸がんリスクが危険率 0.6 から 0.9 程度に有意に低下するといういくつかの報告がなされている。発がんには炎症反応が重要な役割を果たしているおり、植物中のポリフェノールによる抗酸化作用が発がん抑制に有効であるとの報告や、コーヒーが耐糖能の改善に有効であるとの報告があるが、コーヒーおよびコーヒー成分が炎症反応および発がんをどのように抑制しているかは明らかになっていない。そこで、抽出方法の異なるコーヒーおよび主なコーヒー含有成分を用いて、マウス大腸発がん抑制実験を行い、コーヒーによる大腸がん抑制機構を検討した。

B. 研究方法

Th1 優位と言われている C57BL/6J、

Th2 優位の BALB/c、あるいはクローズドコロニーの ICR マウスを用いて、大腸炎誘発物質である dextran sulfate sodium (DSS) による炎症惹起とコーヒーおよびその主成分による炎症抑制作用を検討した予備的な実験では、C57BL/6J マウスにおいて、その効果をもっとも良好であった。そこで、今回、C57BL/6J 系統を用いて、大腸発がん抑制実験を行った。

5 週齢の雄 C57BL/6J マウスに、10 mg/kg 体重の azoxymethane (AOM) を腹腔内投与し (実験第 0 週)、1 週間後から、2 % DSS を 5 日間飲水投与した (実験第 1-2 週)。その後、実験第 2 から 12 週に、水道水 (A 群 : 対照群)、インスタントコーヒー (B 群) あるいはフレンチプレスコーヒー (C 群) を自由飲水投与した。D 群として、コーヒー中の抗酸化物質の主成分と考えられる chlorogenic acid (2500 ppm) を混餌投与した。濃度の設定は以

下のように計算した。インスタントコーヒー 1 cup (2 g)あたり、chlorogenic acid として、約 70 から 220mg 含有しており、体重 50kg のヒトが 1 日 5 杯飲むとして、マウスの体重 30g で換算し、マウスが 1 日 2.5 から 3g エサを食べるとして、その 10 倍を混餌投与とした。粉エサ中に 2,500 ppm (0.25%)の濃度で調整した。E 群には、コーヒーオイルの主成分である cafestol (E 群、72 ppm) を混餌投与した。Cafestol は、スカンジナビアスタイルやトルコスタイルのコーヒー中に 5.3 ~7.2mg/cup 含有しているコーヒーオイルの主成分である(6mg として以下計算した)。インスタントコーヒーやドリップフィルターコーヒーにはほとんど含まれていない。Cafestol についても、体重 50kg のヒトが 1 日 5 杯コーヒーを飲むとして、マウスの体重 30g で換算し、その 10 倍を混餌投与とした。粉エサ中に 72 ppm で調整した。なお、インスタントコーヒーには、chlorogenic acid 等の抗酸化物質が含まれており、フレンチプレスコーヒーには、さらにコーヒーオイルの成分が含まれているとされている。

屠殺は、第 8 週 (n=5) および 12 週 (n=20) で行い、大腸の長さ、各臓器重量、担癌個体頻度、大腸腫瘍発生数、腫瘍体積を計測した。また、背景粘膜の炎症性サイトカイン等の発現を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18

年 6 月文部科学省告示) 及び藤田保健衛生大学動物実験取扱規定を遵守し、同大学動物実験委員会の承認のもとに遂行した (承認番号: M2131)。

C. 研究結果

(1) 体重

実験第 8 週屠殺時の体重は、A、B、C、D、E 群それぞれ、 28.18 ± 0.27 、 26.95 ± 0.25 、 26.69 ± 0.31 、 27.87 ± 0.23 、 27.65 ± 0.23 g (平均 \pm 標準誤差)と各群に有意な差はなかった。第 12 週においても、 30.07 ± 0.31 、 27.96 ± 0.28 、 28.16 ± 0.35 、 29.24 ± 0.40 、 28.98 ± 0.32 g と各群間に有意な差は見られなかった。

(2) 大腸の長さ

DSS 飲水後の炎症による癒痕化で、大腸の長さの短縮が見られることがあるため、各群での大腸の長さを比較検討した。第 8 週では、A、B、C、D、E 群それぞれ、 7.58 ± 0.54 、 7.26 ± 0.22 、 7.16 ± 0.24 、 7.48 ± 0.22 、 7.60 ± 0.12 cm (平均 \pm 標準誤差)と群間に統計学的に有意な差は見られなかった。第 12 週においても、各群それぞれ、 7.51 ± 0.13 、 7.87 ± 0.12 、 7.67 ± 0.10 、 8.00 ± 0.13 、 7.71 ± 0.12 cm と有意な差はなかった。

(3) 臓器重量

肝臓、左右腎臓、心臓の絶対重量および相対重量を比較検討したが、群間に有意な差は見られなかった。