

201313010A (1/3)

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

## がん化学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

(1 / 3)

研究代表者

武藤 倫弘 (国立がん研究センター研究所)

研究分担者

田中 卓二 (岐阜大学)

塚本 徹哉 (藤田保健衛生大学)

高山 哲治 (徳島大学)

石川 秀樹 (京都府立医科大学)

鈴木 貞夫 (名古屋市立大学)

今井 俊夫 (国立がん研究センター研究所)

岩崎 基 (国立がん研究センター  
がん予防・検診研究センター)

鰐淵 英機 (大阪市立大学)

清水 雅仁 (岐阜大学)

高橋 智 (名古屋市立大学)

窪田 直人 (東京大学)

平成26 (2014) 年5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
がん化学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究 武藤 倫弘	1
II. 分担研究報告	
1. 大腸・膵臓発がん抑制物質の検索 武藤 倫弘	17
2. 大腸・舌発がん抑制物質の検索 田中 卓二	24
3. 大腸発がん抑制物質の検索 塚本 徹哉	31
4. RAS阻害剤のAOM誘導大腸発癌に対する抑制効果の検討 高山 哲治	35
5. 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 石川 秀樹	38
6. 大腸ポリープ患者に対する発がん予防臨床試験 鈴木 貞夫	43
7. 乳腺発がん抑制物質の探索 今井 俊夫	49
8. 乳がん・大腸腫瘍の予防要因の解析 岩崎 基	56
9. 肝発がん抑制物質の検索 鰐淵 英機	66
10. 非アルコール性肝炎と肝発がんの抑制 清水 雅仁	72
11. NASH 関連肝発がんと前立腺発がん抑制物質の検索 高橋 智	77
12. 発がんにおけるアディポカインの関与に関する解析 窪田 直人	84
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	87
IV. 研究成果の刊行物・別刷	105



プの長径を計測した。腸ポリープ部位における細胞増殖の指標として PCNA、アポトーシスの指標として ssDNA に対する免疫染色を行った。そして、PCNA 陽性細胞数および ssDNA 陽性細胞数を計測した。細胞周期関連因子である c-Myc, cyclin D1、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の mRNA 発現レベルを realtime RT-PCR 法にて測定した。さらに、腸ポリープ組織及び肝臓における炎症性サイトカイン発現レベルを測定評価した。**【Acetazolamide による炎症関連因子発現抑制メカニズムの検討】**

細胞増殖及びストレス応答に関する転写因子の活性化状態を評価する目的で、ヒト大腸がん細胞 Caco-2 に特定の遺伝子を組み込んでいないコントロールのプラスミドベクター (NgCT) または7種の遺伝子発現プラスミド (AP-1、HIF、HSF、NF- $\kappa$ B、NRF2、p53、STAT3) を各々遺伝子導入した。その後、Caco-2 細胞に 500 mM acetazolamide 処理を行い、24 時間後に、各々の転写活性を測定した。NRF2 下流の mRNA 発現への影響を評価する目的で、ヒト大腸がん細胞における  $\gamma$  GCS、MCP-1 の mRNA 発現レベルを検討した。腸ポリープ部位においても  $\gamma$  GCS、GPx1、HO-1、NQO-1 の mRNA 発現レベルを測定した。

## (2) 大腸・舌発がん抑制物質の検索

112 匹の雄性 ICR マウスを用いた。実験群は azoxymethane (AOM) (10 mg/kg 体重、単回腹腔内投与) + dextran sodium sulfate (DSS) (1.5% 飲水投与 + 1 週間) 群、AOM + DSS + terenadine (H1 受容体アンタゴニスト、500 ppm) 群、AOM + DSS + cimetidine (H2 受容体アンタゴニスト、500 ppm) 群、AOM + DSS + clobenpropit (H3 受容体アンタゴニスト、10 ppm) 群、terenadine 群、cimetidine 群、clobenpropit 群、無処置群の計 8 群とした。各アンタゴニストは DSS 投与終了 1 週間より 15 週間、混餌投与とし、実験は 18 週で終了し、大腸の病理学的解析を実施した。

## (3) 大腸発がん抑制物質の検索

5 週齢オス C57BL/6J マウスに 10 mg/kg 体重のアゾキシメタンおよび 2% dextran sulfate sodium (DSS) を投与した。その後、A 群を対照群とし、インスタントあるいはフレンチプレスコーヒー (B、C 群)、chlorogenic acid (D 群、2500 ppm) あるいは cafestol (E 群、72 ppm) を投与し、実験第 8、12 週で屠殺した。腫瘍数に加えて、血清脂質、病理組織学的検討を行った。

## (4) RAS 阻害剤の AOM 誘導大腸発癌に対する抑制効果の検討

AOM 処理したラットに RAS 特異的阻害剤である manumycin A (腹腔内投与) または

salirasib (経口投与) を投与し、8 週後に aberrant crypt foci (ACF) 数を調べ、24 週後に腸ポリープ(がん)の数を検討した。一方、DSS と AOM を投与したマウスに thymidine phosphorylase (TP) 特異的阻害剤である 6-(2-aminoethyl) amino-5-chlorouracil (AEAC) を投与し、24 週後にマウスを屠殺して腸ポリープ(がん)の数を検討した。

## (5) 家族性大腸腺腫症患者の発がん予防

家族性大腸腺腫症患者 (FAP) を対象として、低用量アスピリン腸溶錠とプラシーボを用いた二重盲検法による無作為割付試験を行った。大腸がん予防のための食生活指導を全員に実施した上で、低用量アスピリン (100 mg) 腸溶錠を投与するグループとプラシーボ錠を投与するグループに分けた。投与期間は 6 から 10 ヶ月間である。主エンドポイントは 大腸ポリープの減少の有無とした。副エンドポイントはポリープの平均直径、高さの変化、有害事象の有無とした。試験参加時に、身長、体重、既往疾患、NSAIDs 服用の有無などをアンケートし、自記式食事摂取頻度票 (FFQ) にて食事内容を把握した。なお、本試験のために倫理モニタリング委員会を設置し、有害事象発生把握について経時的観察ができるシステムを設置した。

上記試験の結果を受けて、大腸腺腫を摘除してクリーンコロンにした FAP 患者にアスピリンを投与する試験を実施予定である。16 歳以上の FAP 200 例に対して、多施設で前向きにエントリーし、継続して大腸腺腫を内視鏡にて徹底的摘除する。主エンドポイントは、介入期間の大腸手術の有無とする。副エンドポイントは、有害事象 (穿孔、出血、大腸がん死、それ以外の死亡)、大腸発がん、粘膜内がん、内視鏡的治療困難腫瘍の有無である。

## (6) 大腸ポリープ患者に対する発がん予防臨床介入試験

試験参加者は、組織診断で確診された大腸腫瘍 (粘膜内がん・腺腫) を 1 個以上持ち、それらすべてを内視鏡的に摘除できた 40 歳以上、70 歳以下の患者である。割り付けは、層別化ブロックランダム法を採用した。試験薬はアスピリン (100 mg/日) 腸溶錠またはプラシーボ錠である。検査は、エントリー時と 2 年目に大腸内視鏡検査 (服用開始前、服用開始 2 年目)、一部施設では S 状結腸大腸粘膜 mRNA 発現 (石川担当症例のみ)、直腸 ACF 計測 (高山担当症例のみ) を行う。主エンドポイントは、2 年目の大腸内視鏡検査における新たな大腸腫瘍の発生 (腺腫、がん) の有無であり、副エンドポイントは、試験期間内の有害事象発生率、他臓器がんの発生の有無などである。大腸腫瘍の発生に

関しては2年目の大腸内視鏡検査後も1年間観察し、評価する。

#### (7) 乳腺発がん抑制物質の探索

F344雌ラットに対し、その幼若期に高脂肪食(コーン油あるいは牛脂添加食)及び分岐鎖アミノ酸(BCAA)添加食を与えた際の7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン(DMBA)誘発乳腺発がんに及ぼす影響について、昨年度の結果の再現性を確認するための実験を行った。また、高脂肪食/BCAAのDMBA投与時における血清生化学値及び乳腺組織に対する影響を検索する目的で、幼若期に同じ高脂肪食を与え、ELISAによる血清レプチン濃度の測定、ウエスタンブロットティングによる乳腺組織におけるSTAT3、リン酸化STAT3(p-STAT3)の発現解析等を行った。

#### (8) 乳がん・大腸腫瘍の予防要因の解析

コーヒー摂取と大腸腺腫との関連は、がん予防・検診研究センターの検診受診者を対象とした大腸腺腫研究(症例782人、対照738人)の食物摂取頻度調査票を含む質問票データを用いて検討した。コーヒー摂取量により4分位で群分けし、最少摂取群に対するオッズ比をロジスティック回帰分析により算出した。また上記研究の血漿検体を用いて、血漿中アミノ酸分析を味の素株式会社イノベーション研究所との共同研究により行った。

#### (9) 肝発がん抑制物質の探索

雄性Wistarラット6週齢36匹を3群に分け、Group 2及び3には、EHENを500ppmの用量で2週間飲水投与し、Group 1には、通常水を投与した。実験開始第3週から32週まで、Group 3にはapocyninを15mg/kg BWの用量で、またGroup 1及び2には、溶媒であるsalineを1回/日、5日/週で強制胃内投与を行った。実験終了後、腎腫瘍をサンプリングし、各種解析を行った。昨年度より、EHEN誘発ラット腎発がんにおける発がん抑制作用を解析してきたが、更なる分子機序解明に向けてヒト腎細胞がんにおける基盤となるシグナルであるPI3K/Akt/mTOR signaling pathwayについて免疫染色及びウエスタンブロットティング(WB)を行った。

#### (10) 非アルコール性肝炎と肝発がんの抑制

高血圧・糖尿病を呈するSHRSP.Z-Lep<sup>fl</sup>/IzmDmcr (SHRSP-ZF)ラットに、高脂肪食とCCl<sub>4</sub>を投与し、肝前がん病変を誘発するとともに0.1%緑茶カテキンEGCG含有水を投与し、その腫瘍形成抑制効果を検討した。また、糖尿病を呈する

db/dbマウスに、肝化学発がん物質DENを投与し、肝腫瘍を誘発するとともにbiguanide系糖尿病治療薬metformin(300mg/kg/day)を飲水投与し、その腫瘍形成抑制効果を検討した。

#### (11) NASH 関連肝発がんと前立腺発がん抑制物質の探索

##### 【NASH 関連肝発がん】

10週齢雄Cx32ドミナントネガティブトランスジェニック(Cx32ΔTg)ラット、野生型ラットにDiethylnitrosamine (DEN, 200mg/kg)を単回腹腔内投与、MCD飼料を12週間投与し、各々にLuteolin(100ppm)混餌投与群を設けた。

##### 【前立腺発がん】

6週齢TRAP雄ラットにLuteolinを20, 100ppmで8週間混餌投与し、対照群を設けた。それぞれ組織学的検索、免疫染色、定量RT-PCRやマイクロアレイ解析を行なった。

#### (12) 発がんにおけるアディポカインの関与に関する解析

肝がん発症におけるインスリンシグナルの寄与を明らかにする目的で、肝臓特異的のIRS-1を欠損させたマウスを作成した。次にこのマウスと野生型マウスにジエチルニトロサミン(DEN)を投与することにより肝臓腫瘍を作成した。DEN誘導肝臓腫瘍径の測定及び炎症や増殖能関連因子の発現変化をRT-リアルタイムPCRにて評価した。また代謝関連分子、特にインスリンシグナルやワールブルク効果、脂肪酸酸化、脂肪分解に関わる分子の発現変化を評価した。

##### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

#### (1) 大腸・膵臓発がん抑制物質の探索

##### 【Minマウスの腸ポリープ生成に対するacetazolamideの影響】

Acetazolamide投与により、腸ポリープ生成数の有意な減少が認められた。特に400ppm投与群ではcontrol群の約50%にまで腸ポリープ生成数が減少した。Acetazolamide投与により腸ポリープにおけるPCNA陽性細胞数の減少と、c-Myc、cyclinD-1のmRNA発現レベルの低下が認められた。逆に、ssDNA陽性細胞数は増加し、Bcl-2の

mRNA 発現レベルは低下した。腸ポリープ、肝臓組織において、IL-6、MCP-1 の mRNA 発現レベルが低下していた。また、腸ポリープにおいては、acetazolamide による gp80 の発現レベルへの影響はなかった。IL-6、MCP-1 は炎症・細胞増殖関連因子であるため、次の実験では、IL-6、MCP-1 の発現低下メカニズムを検索した。

#### 【Acetazolamide による炎症関連因子発現抑制メカニズムの検討】

7 種類の酸化ストレスに関する転写因子のうち、acetazolamide は特に NRF2 の転写活性を増強させた。ヒト大腸がん細胞において、acetazolamide により NRF2 に制御されている  $\gamma$  GCS の mRNA 発現レベルが上昇、MCP-1 の発現レベルが低下した。また、腸ポリープ部位における発現を確認すると、 $\gamma$  GCS、GPx1、HO-1、NQO-1 の mRNA 発現レベルが上昇していた。

#### (2) 大腸・舌発がん抑制物質の検索

実験終了時における大腸がんの発生頻度(個体当たりの発生個数)は AOM + DSS 群:73% (2.73  $\pm$  3.45)、AOM + DSS + terenadine 群:93% (2.50  $\pm$  1.34)、AOM + DSS+cimetidine 群:33%,  $p < 0.05$ , (0.60  $\pm$  1.12,  $p < 0.05$ )、AOM + DSS + clobenpropit 群:40% (0.60  $\pm$  0.91,  $p < 0.05$ )と cimetidine 投与で発生頻度、発生個数が、clobenpropit で発生個数が AOM+DSS 投与群に比べて有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した。また、免疫組織化学染色にて、AOM+DSS 投与で誘発された大腸がんおよびヒト大腸がんには histidine decarboxylase (HDC) の高発現を認めた。

#### (3) 大腸発がん抑制物質の検索

第 8 週屠殺時には、A 群に比して、B~E 群で大腸腫瘍発生数の有意な減少 ( $p < 0.05$ )、C 群で腫瘍体積の低下 ( $p < 0.05$ ) が見られた。また、C 群で TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-17A、FoxP3 mRNA が低下した ( $p < 0.02$ )。

血清脂質は、第 8 週 A 群の総 cholesterol 値 84.4  $\pm$  7.0 (mean  $\pm$  SD) mg/dl に対して C 群では 66.4  $\pm$  5.5 ( $p < 0.05$ )、12 週ではそれぞれ 88.8  $\pm$  10.9, 74.2  $\pm$  8.1 ( $p < 0.0005$ ) と有意に低下した。LDL-cholesterol は、12 週で A 群の 10.8  $\pm$  1.7 対して B, C 群で 7.8  $\pm$  1.2, 8.7  $\pm$  2.7 と有意に低下した ( $p < 0.001$ )。

組織学的には、CD3 免疫染色によって T リンパ球の分布を 0-3 にスコアリングして検討した結果、A 群平均スコア 2.6  $\pm$  0.55 (mean  $\pm$  SD) に対して、E 群では 1.2  $\pm$  0.45 と有意な低下が見られた ( $p < 0.05$ )。COX-2 陽性細胞は、B~E 群で有意な低下を見た。

#### (4) RAS 阻害剤の AOM 誘導大腸発癌

#### に対する抑制効果の検討

Manumycin A を投与した AOM 処理ラットにおける ACF 数は 72.9  $\pm$  20.1 個(/匹)であり、対照群(155.6  $\pm$  56.7 個(/匹))に比べて有意に減少した ( $p < 0.01$ )。同様に、manumycin A 投与ラットの腸ポリープ数は 0.6  $\pm$  1.3 個(/匹)であり、対照群(2.2  $\pm$  2.1 個(/匹))に比べて有意に減少した ( $p < 0.05$ )。また、salirasib 投与ラットにおける腸ポリープ数は 0.8  $\pm$  1.4 個(/匹)であり、対照群(2.4  $\pm$  2.8 個(/匹))に比べて有意に減少した ( $p < 0.05$ )。機序の検討において、manumycin A 投与群ではリン酸化 ERK の発現が有意に抑制され、逆に TUNEL 陽性細胞が有意に増加していた。一方、TP 阻害剤である AEAC を投与した DSS/AOM マウスにおける腸ポリープ数は 1.4  $\pm$  1.1 個(/匹)であり、対照群(3.6  $\pm$  1.7 個(/匹))に比べて有意に抑制されていた。

#### (5) 家族性大腸腺腫症患者の発がん予防

34 人が試験薬を服用し完遂した。アスピリン群、プラシーボ群ともに 17 人ずつに割り付けられていた。主エンドポイントである大腸ポリープ減少を認めた者は、アスピリンでリスク比(95%信頼区間)は 2.33(0.72-7.55)と多い傾向であったが、有意差はなかった。層別化解析では、投与前の平均腫瘍径が 2 mm 未満の者において、アスピリン群では有意に減少を認めた。女性、40 歳未満、手術未施行、非喫煙・禁煙、非飲酒、APC 遺伝子変異保有者、投与後に摘除した腸ポリープの  $\beta$  カテニンの染色率が高い者、上皮内 COX-2 染色率が高い者で、有意差はないもののアスピリンの効果強い傾向を認めた。

一方、手術を希望しない FAP 患者に対して、これまで 1 施設で内視鏡により大腸腺腫を摘除した。手術を希望しない 87 人の患者に対して、最大 19 回、平均 5.2 回の大腸内視鏡検査により、平均 353 個、最大 1,522 個の大腸腺腫を摘除し、平均 4.1 年、最長 16 年の経過 (353.6 人年) を観察しているが、これまでに内視鏡的に摘除困難な大腸がんの発生は認めていない。また、内視鏡的摘除により穿孔や輸血を要するような出血もない。この結果に関して、現在論文投稿中である。そこで、この成績をもとに多施設臨床試験実施のプロトコールを作成し、倫理委員会の得られた施設より、リクルートを開始した (ID:UMIN000009365)。現在のエントリー数は 172 である。

#### (6) 大腸ポリープ患者に対する発がん予防臨床介入試験

2007 年 1 月に呼び掛けを開始したが当初のエントリー期間内に目標症例数に到達することができず、エントリー期間を 2 回延長し、

2009年7月末(31ヶ月間)までエントリーを行った。491人に参加を呼び掛け390人(79%)が参加同意し、エントリーを終了とした。2007年1月から2009年7月末まで31ヶ月間に491人へ参加を呼び掛け390人(79%)が参加同意した。そのうち72人が試験途中で脱落し、318人が試験を完遂した。

試験の結果、アスピリン投与により大腸ポリープの再発率が有意に抑制されることがわかった(OR=0.60)。サブ解析では非喫煙者は、よりアスピリンの効果が高かった(OR=0.37)。

#### (7) 乳腺発がん抑制物質の探索

F344 ラットの5~6週齢時に高脂肪食/BCAAを与えた実験では、牛脂食あるいはコーン油食による血清レプチン値の上昇あるいは上昇傾向が見られたが、BCAAはこれらに対する明らかな改善作用を示さなかった。一方、乳腺組織では、基礎飼料を与えた対照群に比し高脂肪(コーン油、牛脂)食を与えた群ではp-STAT3/STAT3比が高値を示し、BCAAはこれらを低下させた。また、DNAマイクロアレイを用いた解析により、乳腺組織におけるSTAT3の活性化に伴っていくつかの乳腺上皮細胞の分化関連遺伝子及びシグナル伝達関連遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。DMBA誘発乳腺発がん実験においては、対照群に比し高脂肪(コーン油、牛脂)食群では腺がんの発生頻度あるいは数が明らかな増加傾向を示した。また、牛脂食による発がん促進作用に対し、BCAAは発生頻度において抑制傾向を示したが、発生数において影響はなく、コーン油食による発がん促進作用に対し、BCAAは発生頻度および数ともに影響しなかった。

#### (8) 乳がん・大腸腫瘍の予防要因の解析

対象者全体において、最多摂取群のオッズ比(95%信頼区間)は0.66(0.48-0.92)、傾向性の検定のp値は0.02と有意な負の関連が見られた。男女別の解析においても同様の負の関連が見られた。そこで更に大腸腺腫の部位別、大きさ別、個数別に解析を行った。部位別では、近位結腸および遠位結腸において、いずれも有意な負の関連が観察されたが、直腸においては関連が見られなかった。大きさ別では5mm未満の腺腫において有意な負の関連が見られたが、5mm以上では有意な負の関連は見られなかった。同様に個数別では1個の場合に有意な負の関連が見られたが、2個以上の場合には有意な負の関連は見られなかった。喫煙、飲酒、BMI、身体活動で層別解析を行ったが、いずれの層においても負の関連が見られ、有意な交互作用は観察されなかった。

保存血漿500mLを用いて、液体クロマトグラフィー/質量分析法により、35種類のアミノ酸の分析を開始した。

#### (9) 肝発がん抑制物質の検索

EHEN単独投与群の腎臓周辺組織、異型尿細管(ATH)及び腎細胞腫瘍(RCT)について、各種染色を行ったところ、周辺尿細管組織と比較し、TGF $\alpha$ 、IGF1R、phospho-PDK1、phospho-mTOR、phospho-S6及びphospho-4EBP1のATHからRCTにかけての発現増加、及びPTENの発現減少を認めた。以上より、EHEN誘発ラット腎発がんでは、PI3K/Akt/mTOR signaling pathwayが発がん過程の早期より恒常的に活性化していることが明らかとなった。一方、EHEN-Apocynin投与群では、EHEN投与群の腫瘍と比較して、TGF $\alpha$ 及びIGF1Rの発現低下が認められたが、その他のリン酸化蛋白発現に変動は認められなかった。さらに、WBにてphospho-mTOR、phospho-S6、phospho-4EBP1について検討したが、いずれのリン酸化蛋白も発現量に差は見られなかった。

#### (10) 非アルコール性肝炎と肝発がんの抑制

非肥満・正常血圧対照群であるWKY/Izmラットと比較しSHRSP-ZFラットで、肝障害、高血糖・高インスリン血症、脂質異常を認めた。NASH activity scoreは、対照群と比較しSHRSP-ZFラットで高く、EGCG投与によって低下した。肝前がん病変数は、対照群と比較しSHRSP-ZFラットで増加し、EGCG投与によって減少した。SHRSP-ZFラットでは、肝線維化やレニン-アンジオテンシン系(RAS)の亢進、炎症、酸化ストレスの上昇を認めたが、EGCGはこれらを抑制した。

DEN単独投与群と比較しmetformin投与群において、肝前がん病変数と肝腫瘍の発生率は有意に減少していた。Metformin投与群において、血清インスリン値、血清レプチン値、HOMA-IRの低下、血清アディポネクチン値、QUICKIの上昇と、肝Akt、mTOR、p70S6蛋白のリン酸化抑制が認められた。

#### (11) NASH関連肝発がんと前立腺発がん抑制物質の検索

##### 【NASH関連肝発がん】

最終体重、肝および腎重量に群間差は見られなかった。LuteolinはCx32 $\Delta$ Tgおよび野生型ラット両者において肝組織における酸化ストレスや炎症性サイトカイン発現レベルを有意に低下させると同時にNASHの進展を抑制し、肝前がん病変として考えられているGST-P陽性細胞巢の発生数を有意に抑制した。

##### 【前立腺発がん】

最終体重、肝、腎および前立腺腹葉重量に群間差は観察されなかった。TRAP に対して luteolin を投与した結果、前立腺における酸化ストレスの低下、アポトーシスの亢進および細胞増殖の抑制を惹起し、前立腺前がん病変である PIN から腺がんへのプログレッションを有意に抑制した。マイクロアレイ解析および定量 RT-PCR により、luteolin 濃度依存性に Gpx2 発現が抑制されることがわかり、この抑制効果には Gpx2 が関与していることが示唆された。

## (12) 発がんにおけるアディポカインの関与に関する解析

肝臓特異的 IRS-1 欠損マウスでは DEN 誘導性の腫瘍の増大、進展が有意に低く、炎症、増殖能の低下が認められた。また代謝関連分子について検討すると、インスリンシグナルやワールブルク効果の減弱、脂肪酸酸化、脂肪分解が抑制されていた。以上の結果から肝臓細胞がんの進展に IRS-1 を介したインスリンシグナルが重要な役割を果たしている可能性が示された。

## D. 考察

Acetazolamide による腸ポリープ生成の抑制機序に関しては、IL-6、MCP-1 の産生低下が関与していると考えられた。IL-6、MCP-1 は慢性炎症を誘発し、発がんに関与している炎症性サイトカインである。また IL-6 は JAK-STAT 経路を活性化することにより、c-Myc や cyclin D1 などの増殖因子を誘導し、細胞増殖を亢進することが知られている。Acetazolamide は IL-6、MCP-1 の発現を抑制し、細胞増殖の阻害に関与している可能性が考えられた。また、NRF2 は IL-6 を含む炎症性サイトカインの発現を抑制することも報告されているため、acetazolamide による IL-6 発現抑制作用に関しては、NRF2 の活性化が影響していると考えられた。Acetazolamide は細胞に酸化的なストレスを与えることで、NRF2 を活性化していると考えられるが、詳細なメカニズム解析はこれからの課題である。本研究の結果より、acetazolamide は有用な大腸発がん化学予防剤の候補になると考えられた。

ヒスタミンは炎症とともに大腸がんを始めとするがんの発症やその増殖への寄与が知られているが、それらは *in vitro* 実験によるものである。今回の *in vivo* 実験の結果から、ヒスタミン受容体、特に H2、H3、H4 受容体をターゲットとした大腸がん化学予防方法が示唆された。H2 受容体アンタゴニストである cimetidine の *in vivo* 発がんへの影響に関しては、抑制と促進の相反する報告がある。最近、細胞や組織内のヒスタミン量を制御する HDC を欠損したマウスでは、炎症関連大腸

発がんや皮膚発がんが促進されるという報告がなされた。この結果は今回の実験結果とは異なるが、いずれにせよヒスタミン、HDC、ヒスタミン受容体が大腸発がんに関与することを示している。今後、マウス・ラットに誘発した大腸がん、ヒト大腸がんの H1-H4 の発現、HDC 量を解析するとともに、メカニズム解析を実施し、ヒスタミン受容体、特に H3、H4 のアンタゴニストやアゴニストを利用した大腸がん化学予防剤の開発を継続する必要がある。

大腸発がんにおけるコーヒーによる修飾効果を検討すると、実験第 8 週では、C 群では腫瘍体積の有意な低下、Treg 細胞の転写因子である FoxP3 の有意な低下、E 群で TNF- $\alpha$ 、iNOS、Th17 細胞のマーカーである IL-17A、FoxP3 の低下が見られた。組織学的には、CD3 陽性の Tリンパ球は、A 群で最も多く分布しており、E 群では有意な減少であった。ヒト潰瘍性大腸炎で Th17 経路の重要性が報告されていることから、今後 Th17 経路に焦点を当てて検討する必要性が示唆された。COX-2 も A 群に比して B~E 群とも減少が観察されており、複数の要因が関与している可能性が考えられた。血清脂質の検討では、インスタントコーヒーあるいはフレンチプレスコーヒー飲水をした B、C 群で、総コレステロール、LDL-コレステロール、トリグリセリド値の減少が観察された。コーヒー成分の複合的な効果が影響している可能性が示された。

Manumycin A や salirasib などの RAS 阻害剤が大腸がん化学予防剤になり得ることが示唆された。Salirasib のような経口投与の出来る RAS 阻害剤は特にがん化学予防剤に適しており、今後の臨床応用に向けた研究が期待される。また、RAS 阻害剤のがん予防機序の一つとして、RAF/MEK/ERK 経路のシグナル伝達の阻害が明らかになった。このことは、RAS 阻害剤のみならず、RAF 阻害剤や MEK 阻害剤も大腸がん化学予防剤になり得ることを示唆している。一方、潰瘍性大腸炎においては、その高い発がんリスクが問題となっている。本研究で用いた TP 阻害剤は、我々が以前、DSS を用いた潰瘍性大腸炎モデルの炎症を抑制することを示している。従って、TP 選択的阻害剤が炎症を抑制するのみならず、発がんも抑制することが明らかとなった。

FAP 患者は大腸がんの予防のため大腸を切除することが標準治療となっている。日本の診療現場では、大腸腺腫数が比較的少ない場合や、大腸腺腫が小さい場合には、FAP と診断されても、すぐに手術をするのではなく、大きな腺腫を内視鏡的に摘除して経過をみることも行われてきている。しかし、腺腫を摘除することにより大腸がんの発生が予防でき、且つ大腸切除を避けることができ



るのか、または手術の時期を遅らせることができるのか、などについての知見はまったく得られていない。そこで、手術を希望しないFAP患者に対して、積極的に内視鏡により大腸腺腫を摘除し、日本における大腸内視鏡専門施設による多施設研究により、手術の時期を遅らせることができるのかを検討することが必要であり、臨床試験が進行中である。

アスピリンは、解熱鎮痛薬や抗血小板薬として長年使用されており、ヨーロッパ諸国や米国では、大腸がんの抑制に有効性を示す臨床試験研究結果が出ているが、アジア人におけるエビデンスは乏しい(無作為化比較試験レベルでは無かった)。大腸がん罹患率の比較的高い日本において廉価な既存薬剤の新薬効発見(ドラッグ・リポジショニング)によりその発生を抑制し得る可能性を見出すことは医療経済への貢献も大きいといえる。今回、アスピリンの有効性は、喫煙者では示されず、非喫煙者に限り有効であることが見出されたが、検証とともにそのメカニズム解析が必要であると考えられた。

幼若期に高脂肪食/BCAAを与えた実験において、BCAAはレプチン受容体を介さず、mTOR活性化作用あるいはmTOR-STAT3経路等を介してSTAT3活性に影響を与えた可能性があるが更なる検討が必要である。DMBA誘発F344ラット乳腺発がん実験において、高脂肪食にBCAAを併用することにより、コーン油群及びQuick Fat群において増加した高分化腺がんの発生頻度及び数が減少あるいは減少傾向を示した。高分化腺がんに対する発がん促進作用についてはSmad2/3をリン酸化するキナーゼAの発現増加が関与している可能性があることから、BCAAの活性として既に報告されている肝がん細胞におけるPI3K/Akt阻害による抗アポトーシス作用などとの関連性も踏まえながら研究を進める必要がある。

コーヒー摂取と大腸がんとの関連については多くの先行研究があり、弱い負の関連が観察されている。一方、大腸腺腫との関連を見た研究は少なく、我々が調べたところ5件のみであった。今回の研究は、症例数が782例と5件の先行研究の中では最大であり、食物摂取頻度調査票から推計した食物・栄養要因も交絡要因として調整した結果である点の特徴である。また今回の結果は、発がん過程の早期の段階から予防的に作用している可能性を示唆している。味の素株式会社と共同研究契約の締結など必要な手続きを行い、2013年11月より分析を開始した。検体数が約1500検体と多数であるため分析に時間を要しているが、2014年9月ごろには分析が終了する予定である。

EHEN誘発ラット腎発がんにおける機序として、前がん病変から腫瘍にかけて、

PI3K/Akt/mTOR signaling pathwayが恒常的に活性化していることが明らかとなった。興味深いことに、TGF $\alpha$ 及びIGF1R等シグナルの上流におけるリガンドとレセプター双方の発現が増加していたことより、オートクラインループによる自己活性化の機序が病態の進行に重要である可能性が考えられた。一方で、apocynin投与により腫瘍内でTGF $\alpha$ 及びIGF1Rの発現低下が認められたが本パスウェイ下流の種々のリン酸化蛋白の発現量に差は認められなかった。以上の結果より、apocyninによる内因性NADPH oxidase阻害による腎発がん抑制作用は、PI3K/Akt/mTOR signaling pathway非依存性である可能性が示された。

肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常、adipokineの不均衡に加え、RASの活性化に伴う炎症および酸化ストレスの亢進と肝線維化の促進が、SHRSP-ZFラットにおける肝前がん病変の発症促進に繋がっている可能性が明らかになった。SHRSP-ZFラットを用いて作成した肝発がんモデルは、ヒト非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態を反映しており、肥満・NASH関連肝発がん抑制薬の有効性をスクリーニングするのに有用と考えられた。またEGCGは、脂肪肝炎および肝線維化を改善し、酸化ストレスの亢進とレニンアンジオテンシン系の過剰活性化を抑制することで、肥満・糖尿病・高血圧ラットにおける肝前がん病変形成を抑制すると考えられた。Metforminは、血清adipokine不均衡の改善と、肝PI3K/Akt/mTORシグナルの制御を介して、肥満マウスの肝発がんを抑制すると考えられた。

Luteolinは、Cx32 $\Delta$ Tgと野生型ラット両方の、NASHおよび肝前がん病変の形成を予防した。LuteolinによるNASH抑制効果は、野生型ではNASHの初期過程、Cx32 $\Delta$ Tgラットでは後期課程で発揮される傾向があったが、この差異はCx32がNASHの進展に抑制的に作用するためと考えられる。Cx32発現に関わらずluteolinがNASHの進展を抑制することから、幅広くNASH関連肝がんの予防物質として使用できる可能性が示された。また、luteolinはTRAPラット前立腺発がんも抑制した。発がん抑制メカニズムとして、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導と酸化ストレスの抑制が考えられ、酸化ストレス応答遺伝子Gpx2が関与することが示唆された。NASH関連肝がんと前立腺がんに対し、共通に見られたluteolinの効果として、組織内活性酸素の抑制による酸化ストレスの低下が挙げられた。

高脂肪食や運動不足といった生活習慣に起因するエネルギー過剰の状態は肥満・内臓脂肪蓄積を引き起こし、更には異所性脂肪蓄積や炎症、インスリン抵抗性やそれに伴う高インスリン血症をきたす。インスリンは

血糖降下作用を有する代謝ホルモンであるが、同時に増殖因子の側面を持つため、本研究成果により、NAFLD を背景とした肝がん増加においても、高インスリン血症が重要な役割を担っていることが示され、インスリン抵抗性改善を介した高インスリン血症を改善させることが、NAFLD を背景とした肝がんの予防には重要であることが示唆された。

## E. 結論

Acetazolamide は Min マウス腸ポリープ生成数を約 50%まで減少させた。そのメカニズムの一つとして、acetazolamide は NRF2 を活性化することで IL-6、MCP-1 の発現レベルを低下させ、細胞増殖を抑制することが示唆された。また、acetazolamide は Bcl-2 の発現を抑制することにより、アポトーシスを誘導し易くする作用が新たに見出された。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、pH や酸化ストレスに寄与する carbonic anhydrase に着目し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期待される。

H2 および H3 アンタゴニストは炎症関連大腸発がん抑制作用を示すことが判明した。現在、その機構解析を進めているところである。今回使用した H3 アンタゴニスト clobenpropit は、H3 インバースアゴニスト、H4 アゴニストでもあり、スタミン受容体 H2 に加え、炎症関連大腸発がんには H3、H4 も係っていること、またこれらをターゲットとした発がん抑制の可能性が示された。

C57BL/6 マウスを用いて、AOM+DSS 大腸発がん系に対するコーヒーおよびその主成分による炎症の抑制効果と発がん抑制効果を検討した。フレンチプレスコーヒーに含まれる cafestol などのコーヒーオイル成分が、Th17 経路を介して炎症抑制効果を発揮して発がん抑制に働いた可能性が示された。

RAS 阻害剤や TP 選択的阻害剤の大腸発がんに対する抑制効果が示唆され、K-RAS や TP 分子を標的とした大腸がん予防薬の有効性が示唆された。

家族性大腸腺腫症に対して、徹底的な大腸腺腫摘除を行う前向き登録研究を行い、さらに大腸がん予防効果を高めるために、その集団に対してアスピリンや 5-ASA を用い臨床試験を実施する予定である。

大腸がん化学予防のため、低用量アスピリン腸溶錠 (100 mg/day) の効果を評価する臨床試験は試験が完遂し、アスピリンの有効性を小規模な介入試験で示すことが出来た。より大規模な検証を実施し、有効な予防法としての確立と、家族性大腸腺腫症 (家族性

大腸ポリポーシス) やリンチ症候群 (遺伝性非ポリポーシス大腸がん) のオーファンドラッグ (希少疾患薬) としての承認等をめざす研究計画立案も必要と考えられた。

若齢期高脂肪食は肥満状態の有無に関わらず高レプチン血症を介して乳腺組織における STAT3 活性化を誘発するが、BCAA を含む栄養成分により STAT3 の活性化を制御できる可能性があり、今後、食品成分の探索と機序解明が生活習慣に関連の深いがんの予防研究に必要なことが示された。

コーヒーの摂取量が多い群で大腸腺腫のリスク低下が見られた。部位別の解析では、直腸では関連が見られなかったが、結腸において有意な負の関連が見られた。今回の研究は、症例数が 782 例と 5 件の先行研究の中では最大であり、食物摂取頻度調査票から推計した食物・栄養要因も交絡要因として調整した結果である点が特徴である。今回の結果は、発がん過程の早期の段階から予防的に作用している可能性を示している。

ラット腎発がんモデルを用いた apocynin の発がん抑制作用を検討したところ、apocynin は腎発がん予防に極めて有用であることが示唆された。その機序として、ヒト腎細胞がんの分子機序として重要とされている PI3K/Akt/mTOR signaling pathway 以外の経路により発がん抑制作用を示すことがわかった。今後、既存の分子標的治療薬である mTOR 阻害剤と apocynin の併用の効果を検討する予定である。

NASH は高血圧症を合併することが報告されているが、今回の研究結果によって、高血圧によって惹起されたレニンアンギオテンシン系の過剰活性化に伴う炎症や酸化ストレスの亢進が、肥満・NASH 関連肝発がん予防を実践する上で、重要な標的分子となりうる可能性が明らかになった。また、日常生活で容易に摂取可能な緑茶カテキンや、世界中で広く使用されている糖尿病治療薬の metformin を用いて、肥満・NASH に関連した様々な分子異常を制御し、これらの病態を合併する慢性肝疾患患者の肝発がん抑制を目的とした臨床介入を行うことで、慢性肝疾患患者の予後が改善される可能性が示された。

Luteolin は、毒性変化を伴わず、NASH 関連肝発がんおよび前立腺発がんを抑制することが明らかとなった。両者に対する luteolin の共通な発がん抑制メカニズムとして、酸化ストレスの抑制が示唆された。これらの結果から luteolin は、NASH 関連肝がんおよび前立腺がんに対する化学予防剤として有望であると期待された。

耐糖能異常や脂質異常症、高血圧の改善が心血管腎疾患の予防に重要であることがわかっているが、NAFLD もまた、これらを基盤病態としてその発症が促進されることが示

唆されている。NAFLD を背景とした肝がんの発症・進展増加を抑制するためにインスリン抵抗性を改善させることは肝臓がん予防方法として有用と考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 in Immunopathol*, **35**: 203-227, 2013.
- 2) Arai Y, Totoki Y, Nakamura H, Hama N, Kohno T, Tsuta K, Yoshida A, Asamura H, Mutoh M, Takahashi H, Tatsuno K, Hosoda F, Tsuda H, Aburatani H, Miyano S, Shibata T. Mouse model for ROS-1-rearranged lung cancer. *PLoS One*, **8**: e56010, 2013.
- 3) Fujimoto K, Fujii G, Mutoh M, Mochida Y, Tanaka H, Wada M. Suppression of intestinal polyp development through inhibition of P-glycoprotein by verapamil in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. *Eur J Cancer Prev*, **22**: 8-10, 2013.
- 4) Iimuro M, Arakawa T, Matsumoto T, Wakabayashi K, Mutoh M. Effects of Dietary Calcium on *Helicobacter pylori*-induced Gastritis in Mongolian gerbils. *Anticancer Res*, **33**: 3667-3674, 2013.
- 5) Hayakawa T, Mutoh M, Imai T, Tsuta K, Yanaka A, Fujii H, Yoshimoto M. SPECT imaging using <sup>111</sup>In-DOTA-c(RGDfK) to detect nodules in a mouse lung carcinogenesis model. *Ann Nucl Med*, **27**: 640-647, 2013.
- 6) Ito K, Ishigamori R, Mutoh M, Ohta T, Imai T, Takahashi M. *A<sup>Y</sup>* Allele promotes azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis via macrophage migration in hyperlipidemic/diabetic KK mice. *Cancer Sci*, **104**: 835-843, 2013.
- 7) Komiya M, Fujii G, Takahashi M, Iigo M, Mutoh M. Prevention and intervention trials for colorectal cancer. *Japanese J Clin Oncol*, **43**: 685-694, 2013.
- 8) Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H. Metabolic syndrome: Anovel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Letts. (Spl; Technologies in Carcinogenesis)* **334**: 56-61, 2013.
- 9) Shimizu S, Fujii G, Takahashi M, Nakanaishi R, Komiya M, Shimura M, Noma N, Onuma W, Yano T, Mutoh M. Sesamol suppresses cyclooxygenase-2 transcriptional activity in colon cancer cells and modifies intestinal polyp development in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. *J Clin Biochem Nutr*, **54**: 95-101, 2014.
- 10) Komiya M, Fujii G, Takahashi M, Shimura M, Noma N, Shimizu S, Onuma W, Mutoh M. Bi-directional regulation between adiponectin and plasminogen activator-inhibitor-1 in 3T3-L1 cells. *IN VIVO*, **28**: 13-19, 2014.
- 11) Ishikawa H, Mutoh M, Suzuki S, Tokudome S, Saida Y, Abe T, Okamura S, Tajika M, Joh T, Tanaka S, Kudo S, Matsuda T, Iimuro M, Yukawa T, Takayama T, Sato Y, Lee K, Kitamura S, Mizuno M, Sano Y, Gondo N, Sugimoto K, Kusunoki M, Goto C, Matsuura N, Sakai T, Wakabayashi K. Preventive effects of low-dose enteric-coated aspirin tablets on development of colorectal tumor in Asian patients. *GUT*, in press
- 12) Yoshimi K, Tanaka T, Serikawa T, Kuramoto, T. Tumor suppressor APC protein is essential in mucosal repair from colonic inflammation through angiogenesis. *Am J Pathol*, **182**: 1263-1274, 2013.
- 13) Tanaka T. Introduction for inflammation and cancer. *Semin Immunopathol*, **35**: 121-122, 2013.
- 14) Tanaka T, Ishikawa H. Mast cells and inflammation-associated colorectal carcinogenesis. *Semin Immunopathol*, **35**: 245-254, 2013.
- 15) 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**: 361-369, 2013.
- 16) Inoue H, Maeda-Yamamoto M, Nesumi A, Tanaka T, Murakami A. Low and medium but not high doses of green tea polyphenols ameliorated dextran sodium sulfate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem*, **77**: 1223-1228, 2013.
- 17) Yoshida R, Nagata M, Nakayama H, Niimori-Kita K, Hassan W, Tanaka T, Shinohara M, Ito T. The pathological significance of Notch1 in oral squamous cell carcinoma. *Lab Invest*, **93**:

- 1068-1081, 2013.
- 18) Ohno T, Shimizu M, Baba A, Kochi T, Kubota M, Shirakami Y, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Metformin suppresses diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup> mice. *Front. Cancer Endocrinol*, in press
  - 19) Sumi T, Shirakami Y, Shimizu M, Kochi T, Ohno T, Kubota M, Shiraki M, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. (–)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses hepatic preneoplastic lesions developed in a novel rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Springer Plus*, **2**: 690, 2013
  - 20) Asada K, Ando T, Niwa T, Nanjo S, Watanabe N, Okochi-Takada E, Yoshida T, Miyamoto K, Enomoto S, Ichinose M, Tsukamoto T, Ito S, Tatematsu M, Sugiyama T, Ushijima T. FHL1 on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the formation of an epigenetic field defect. *Oncogene*, **32**: 2140-2149, 2013.
  - 21) Fang J, Seki T, Tsukamoto T, Qin H, Yin H, Liao L, Nakamura H, Maeda H. Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) involves suppression of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Carcinogenesis*, **34**: 2833-2841, 2013.
  - 22) Jiang J, Cao D, Tsukamoto T, Wang G, Jia Z, Suo J, Cao X. Anticancer effects of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Oncol Lett*, **5**: 1562-1566, 2013.
  - 23) Nojiri A, Toyoda T, Tanaka T, Yoshida T, Tatematsu M, Tsukamoto T. Inflammation enhanced X-irradiation induced colonic tumorigenesis in the Min mouse. *Asian Pac J Cancer Prev*, **14**: 4135-4139, 2013.
  - 24) Toyoda T, Tsukamoto T (equal contributors), Yamamoto M, Ban H, Saito N, Takasu S, Shi L, Saito A, Ito S, Yamamura Y, Nishikawa A, Ogawa K, Tanaka T, Tatematsu M. Gene expression analysis of a Helicobacter pylori-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model: identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. *BMC Gastroenterol*, **13**: 122, 2013.
  - 25) Tsukamoto T, Toyoda T, Mizoshita T, Tatematsu M. Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in rodent models. *Semin Immunopathol*, **35**: 177-190, 2013.
  - 26) Tsuda M, Okamoto K, Muguruma N, Sannomiya K, Nakagawa T, Miyamoto H, Kitamura S, Goji T, Kimura T, Okahisa T, Izumi K, Takayama T. Suppressive effect of RAS inhibitor manumycin A on aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced rat colorectal carcinogenesis model. *J Gastroenterol Hepatol* **28**: 1616-23, 2013.
  - 27) Nakajima T, Saito Y, Tanaka S, Iishi H, Kudo S, Ikematsu H, Igarashi M, Saitoh Y, Inoue Y, Kobayashi K, Hisashi T, Tsuruta O, Sano Y, Yamano H, Shimizu S, Yahagi N, Watanabe T, Nakamura H, Fujii T, Matsuda T, Ishikawa H, Sugihara K. Current status of endoscopic resection strategy for large, early colorectal neoplasia in Japan. *Surg Endosc*, **27**: 3262-3270, 2013.
  - 28) Todo M, Horinaka M, Tomosugi M, Tanaka R, Ikawa H, Sowa Y, Ishikawa H, Fujiwara H, Otsuji E, Sakai T. Ibuprofen enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation. *Oncol Rep*, **30**: 2379-2384, 2013.
  - 29) Yamada S, Doyama H, Yao K, Uedo N, Ezoe Y, Oda I, Kaneko K, Kawahara Y, Yokoi C, Sugiura Y, Ishikawa H, Takeuchi Y, Saito Y, Muto M. An efficient diagnostic strategy for small, depressed early gastric cancer with magnifying narrow-band imaging: a post-hoc analysis of a prospective randomized controlled trial. *Gastrointest Endosc*, **79**: 55-63, 2014.
  - 30) Yao K, Doyama H, Gotoda T, Ishikawa H, Nagahama T, Yokoi C, Oda I, Machida H, Uchita K, Tabuchi M. Diagnostic performance and limitations of magnifying narrow-band imaging in screening endoscopy of early gastric cancer: a prospective multicenter feasibility study. *Gastric Cancer*, in press.
  - 31) Imai T, Cho YM, Takahashi M, Kitahashi T, Takami S, Nishikawa A, Ogawa K. High susceptibility of heterozygous (+/fa) lean Zucker rats to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induc

- ed mammary carcinogenesis. *Oncol Res*, **29**: 1914–1922, 2013.
- 32) Onuma K, Ochiai M, Takahashi M, Imai T, Nakagama H, Hippo Y. Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**: 11127–11132, 2013.
- 33) Iwasaki M, Mizusawa J, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Tsugane S. Green tea consumption and breast cancer risk in Japanese women: A case-control study. *Nutr Cancer*, **66**: 57–67, 2014.
- 34) Suzuki R, Iwasaki M, Hara A, Inoue M, Sasazuki S, Sawada N, Yamaji T, Shimazu T, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Fruit and vegetable intake and breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Cancer Causes Control*. **24**: 2117–2128, 2013.
- 35) Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Nagano K, Nishimaki F, Banton M, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*, **273**: 390–400, 2013.
- 36) Wei M, Yamada T, Yamano S, Kato M, Kakehashi A, Fujioka M, Tago Y, Kitano M, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **273**: 1–9, 2013.
- 37) Kochi T, Shimizu M, Ohno T, Baba A, Sumi T, Kubota M, Shirakami Y, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Enhanced development of azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in hypertensive rats. *Int J Mol Sci*, **14**: 14700–14711, 2013.
- 38) Nagano J, Shimizu M, Hara T, Shirakami Y, Kochi T, Nakamura N, Ohtaki H, Ito H, Tanaka T, Tsurumi H, Saito K, Seishima M, Moriwaki H. Effects of indoleamine 2,3-dioxygenase deficiency on high-fat diet-induced hepatic inflammation. *PLoS One*, **8**: e73404, 2013.
- 39) Baba A, Shimizu M, Ohno T, Shirakami Y, Kubota M, Kochi T, Terakura D, Tsurumi H, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by acyclic retinoid and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor in human hepatoma cells. *BMC Cancer*, **13**: 465, 2013.
- 40) Kochi T, Shimizu M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Kubota M, Shirakami Y, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Non-alcoholic steatohepatitis and preneoplastic lesions develop in the liver of obese and hypertensive rats: Suppressing effects of EGCG on the development of liver lesions. *Cancer Letts*, **342**: 60–69, 2013.
- 41) Shimizu M, Shirakami Y, Hanai T, Imai K, Suetsugu A, Takai K, Shiraki M, Moriwaki H. Pharmaceutical and nutraceutical approaches for preventing liver carcinogenesis: Chemoprevention of hepatocellular carcinoma using acyclic retinoid and branched-chain amino acids. *Mol Nutr Food Res*, doi: 10.1002/mnfr.201300538
- 42) Qin XY, Wei F, Tanokura M, Ishibashi N, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S. The effect of acyclic retinoid on the metabolomic profiles of hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0082860
- 43) Kobayashi D, Kawai N, Sato S, Naiki T, Yamada K, Yasui T, Tozawa K, Kobayashi T, Takahashi S, Kohri K. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. *Prostate*, **73**: 913–922, 2013.
- 44) Pitchakarn P, Chewonarin T, Ogawa K, Suzuki S, Asamoto M, Takahashi S, Shirai T, Limtrakul P. Ellagic acid inhibits migration and invasion by prostate cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*, **14**: 2859–2863, 2013.
- 45) Suzuki S, Pitchakarn P, Sato S, Shirai T, Takahashi S. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation. *Exp Toxicol Pathol*, **65**: 1035–1041, 2013.
- 46) Tang D, Kryvenko ON, Wang Y, Trudeau S, Rundle A, Takahashi S, Shirai T, Rybicki BA. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-

- [4,5-b]pyridine(PhIP)-DNA adducts in benign prostate and subsequent risk for prostate cancer. *Int J Cancer*, **133**: 961-971, 2013.
- 47) Suzuki S, Shiraga K, Sato S, Punfa W, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Shirai T, Takahashi S. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Cancer Sci*, **104**: 1711-1717, 2013.
- 48) Sato S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Komiya M, Ne L, Kato H, Sagawa H, Yamashita Y, Shirai T, Takahashi S. Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. *J Toxicol Pathol*, **27**: 43-49, 2014.
- 49) Kubota T\*, Kubota N\*, Kadowaki T. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*, **14**: 207-216, 2013 (\*co-first authors).
- 50) Nakaya K, Kubota N\*, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, Ueki K, Kadowaki T\*. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism*, **62**: 939-951, 2013 (\*co-corresponding authors).
- 51) Kumagai H\*, Kubota N\*, Kubota T\*, Takahashi T, Inoue M, Kawai T, Iwayama K, Moroi M, Sugi K, Kadowaki T. Combined treatment with low-dose pioglitazone and beraprost sodium improves glucose intolerance without causing body weight gain. *Diabetology International*, **4**: 226-232, 2013 (\*co-first authors).
- 52) Shirakawa J, Togashi Y, Sakamoto E, Kaji M, Tajima K, Orime K, Inoue H, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetes*, **62**: 3448-3458, 2013.
2. 学会発表
- 1) 小宮雅美、藤井 元、中西るり、志村美聖、野間寛陽、高橋真美、石野孔祐、戸塚ゆ加里、武藤倫弘、中釜 斉。NADPH オキシダーゼ阻害剤によるマウス腸発がん抑制。第20回日本がん予防学会、渋谷(2013年7月5,6日)
- 2) 藤井 元、武藤倫弘、小宮雅美、中西るり、志村美聖、野間寛陽、清水聡美、尾沼若奈、中釜 斉。Global(All-over)なメチル化状態のスクリーニング的定量方法の確立。第20回日本がん予防学会、渋谷(2013年7月5,6日)
- 3) 武藤倫弘、藤井 元、中西るり、小宮雅美、志村美聖、野間寛陽、高橋真美、清水聡美、尾沼若奈、中釜 斉。Low-density lipoprotein 受容体の欠損による細胞増殖抑制。第20回日本がん予防学会、渋谷(2013年7月5,6日)
- 4) 高橋真美、伊藤久美子、石ヶ守里加子、中西るり、武藤倫弘、藤井 元、太田敏博、今井俊夫。アゾキシメタン誘発大腸発がん高感受性のII型糖尿病モデルマウスにおけるA $\nu$ アレルによる腫瘍形成促進。第20回日本がん予防学会、渋谷(2013年7月5,6日)
- 5) Mutoh, M. Effects of low-dose aspirin on colorectal tumor recurrence in Japanese population. The 1<sup>st</sup> World Congress on Controversies in Gastroenterology (cigi), Berlin, Germany (June 13-15,2013)
- 6) 藤井 元、中西るり、小宮雅美、高橋真美、志村美聖、野間寛陽、清水聡美、尾沼若奈、武藤倫弘。大腸がん細胞増殖における低密度リポ蛋白受容体の役割。第24回日本消化器癌発生学会、金沢(2013年9月5,6日)
- 7) 野間寛陽、志村美聖、藤井 元、高橋真美、小宮雅美、中西るり、清水聡美、田沼靖一、武藤倫弘。炭酸脱水素酵素の low-density lipoprotein receptor 欠損マウスにおける腸発がんへの寄与。第24回日本消化器癌発生学会、金沢(2013年9月5,6日)
- 8) 武藤倫弘、高橋真美、小宮雅美、中西るり、志村美聖、野間寛陽、清水聡美、尾沼若奈、藤井 元。大腸がんにおける脂質代謝異常の関与とその予防。第24回日本消化器癌発生学会、金沢(2013年9月5,6日)
- 9) 清水聡美、藤井 元、高橋真美、小宮雅美、中西るり、志村美聖、野間寛陽、矢野友啓、武藤倫弘。ゴマ由来成分 sesamol による腸発がん抑制作用の検証。第24回日本消化器癌発生学会、金沢(2013年9月5,6日)
- 10) 小宮雅美、藤井 元、中西るり、志村美聖、野間寛陽、高橋真美、尾沼若奈、清水聡美、武藤倫弘。マウス腸発がんに対するNADPH oxidase 阻害剤の抑制効果。第24回日本消化器癌発生学会、金沢(2013年9月5,6日)
- 11) 志村美聖、藤井元、高橋真美、小宮雅美、中西るり、石ヶ守里加子、野間寛

- 陽、田沼靖一、武藤倫弘。Cyclooxygenase-2 の発現と活性を複合阻害することによるマウス腸癌がん抑制効果。第 24 回日本消化器癌発生学会、金沢(2013 年 9 月 5,6 日)
- 12) 高橋真美、石ヶ守里加子、中西るり、尾沼若奈、小宮雅美、藤井元、武藤倫弘、田中卓二、今井俊夫。A<sup>ν</sup> アレルによる膵臓癌がん及び大腸癌がんの促進におけるマクロファージコロニー刺激因子の関与。第 24 回日本消化器癌発生学会、金沢(2013 年 9 月 5,6 日)
- 13) 武藤倫弘。NADPH oxidase をターゲットとした腸癌がん抑制。第 28 回発癌病理研究会、沖縄(2013 年 8 月 26-28 日)
- 14) 高橋真美、石ヶ守里加子、尾沼若奈、小宮雅美、藤井元、武藤倫弘、田中卓二、今井俊夫。A<sup>ν</sup> アレルによる膵臓癌がん促進に置ける M-CSF の関与。第 72 回日本癌学会総会、横浜(2013 年 10 月 3-5 日)
- 15) 武藤倫弘、小宮雅美、藤井元、高橋真美、志村美聖、野間寛陽、石野孔輔、戸塚ゆ加里、清水聡美、中釜斉。肥満 KK-A<sup>ν</sup> マウス及び Min マウスの腸癌がんにおける NADPH oxidase 阻害剤アポサイニンの影響。第 72 回日本癌学会総会、横浜(2013 年 10 月 3-5 日)
- 16) 藤井元、武藤倫弘、小宮雅美、高橋真美、志村美聖、野間寛陽、清水聡美、中釜斉。LDL 受容体遺伝子のノックダウンは大腸がん培養細胞株の増殖を抑制する。第 72 回日本癌学会総会、横浜(2013 年 10 月 3-5 日)
- 17) 杉江茂幸、田中卓二。中釜法 PhIP 投与による誘発前立腺がんにおける去勢の修飾作用。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 31 日-2 月 1 日)
- 18) 杉江茂幸、坂本寛文、松岡ゆかり、波多野裕一郎、川口順敬、細野芳樹、桐生拓司、田中卓二、市原周。嚢胞形成性 Solid papillary carcinoma in situ の一例。第 54 回日本臨床細胞学会蔵会(春期大会)、東京(2013 年 5 月 31 日~6 月 2 日)
- 19) 杉江茂幸、波多野裕一郎、中嶋早苗、久米真、田中卓二、加藤隆弘、福田信宏。大腸癌、腹膜中皮腫重複の 1 例。第 102 回病理学会総会、札幌(2013 年 6 月 6~8 日)
- 20) Tanaka, T. Dietary crocin inhibits colitis-associated colorectal carcinogenesis in mice. 8<sup>th</sup> Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition (APCCN2013), Tokyo, June 9-12, 2013.
- 21) 杉江茂幸、田中卓二。炎症関連マウス大腸癌がんにおけるタキシフォリンの修飾効果。第 20 回日本がん予防学会、東京(2013 年 7 月 5~6 日)
- 22) 久野壽也、田中卓二、和泉有希乃、伊原由希子、大村弥生、立川優果、館林里菜、原明。炎症関連 TSOD マウス大腸癌がんに対する ACE 阻害薬 enalapril の修飾効果。第 20 回日本がん予防学会、東京(2013 年 7 月 5~6 日)
- 23) 杉江茂幸、川端邦裕、森卓之、Nguyen Huu Tung、正山征洋、田中卓二。Crocin による炎症関連マウス大腸癌がんの抑制。日本食品化学学会 第 19 回総会・学術大会、名古屋(2013 年 8 月 29~30 日)
- 24) Kuno, T., Tanaka, T., Takamatsu, M., Hatano, Y., Tomita, H., Hirose, Y., Hirata, A., Hara, A. Deoxycholic acid, secondary bile acid promotes AOM-induced colorectal carcinogenesis in distal colon of mice but not proximal colon. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama (October 3-5, 2013)
- 25) Sugie, S., Yoshimi, K., Kuramoto, T., Tanaka, T. KAD rats are susceptible to 4-NQO-induced tongue carcinogenesis. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama (October 3-5, 2013)
- 26) Tanaka, T., Kochi, T., Shimizu, M., Sugie, S., Moriwaki, H. 4'-Geranyloxyferulic acid-L-NAME suppresses inflammation-associated colorectal carcinogenesis in mice. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama (October 3-5, 2013)
- 27) Okada, H., Honda, M., Sakai, Y., Yamashita, T., Shirasaki, T., Takegoshi, K., Kaneko, S., Campbell, J.S., Tanaka, T. Inhibition of micro RNA-214 ameliorates hepatic fibrosis and development of hepatocellular carcinoma in platelet-driven growth factor-C transgenic mice. 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2013 AASLD), Washington, DC (November 1-5, 2013)
- 28) Takegoshi, K., Honda, M., Okada, H., Sunagozaka, H., Kaneko, S., Takamura, T., Matsuzawa, N., Tanaka, T. Branched-chain amino acids improve liver fibrosis and reduce tumorigenesis



- in mice fed an atherogenic high fat diet by suppressing PDGFR-beta/EPK signaling. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2013 AASLD), Washington, DC (November 1-5, 2013)
- 29) 塚本徹哉、田中卓二。AOM +DSS誘発マウス大腸発がんに対するコーヒーおよびその成分による抑制効果。第20回日本がん予防学会、渋谷(2013年7月5,6日)
- 30) Tsukamoto, T., Mizutani, Y., Tanaka, T. Suppression of azoxymethane + dextran sulfate sodium-induced mouse colon tumorigenesis with coffee and its ingredients. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama (October 3-5, 2013)
- 31) Kimura, T., Muguruma, N., Takayama, T. Suppressive effect of the farnesyltransferase inhibitor for aberrant crypt foci as a precursor of colorectal cancer. 第56回日本消化器病学会大会、神戸(2013年9月23,24日)
- 32) 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、東京(2013年1月15日)
- 33) 石川秀樹。大腸癌はなぜ増えたのか、予防は可能なのか。日本消化器内視鏡技師学会、京都(2013年5月11日)
- 34) 石川秀樹。現場における大腸癌予防対策(シンポジウム)。第4回日本プライマリ・ケア連合学会、仙台(2013年5月19日)
- 35) Ishikawa, H. Effect of low-dose aspirin on colorectal adenoma growth in patients with familial adenomatous polyposis (plenary session). The 1<sup>st</sup> World congress on Controversies in gastroenterology, Berlin (15 Jun 2013)
- 36) 石川秀樹。大腸がんはなぜ増えたのか、予防は可能なのか(市民公開講座)。第20回日本がん予防学会、東京(2013年7月6日)
- 37) 石川秀樹。乳酸菌製剤による大腸癌予防臨床試験(シンポジウム)。第11回日本機能性食品医学学会総会、東京(2013年12月8日)
- 38) 石川秀樹。健やかな大腸を保つ生活のひけつ。健康フォーラム 健腸生活のすすめ、名古屋(2014年3月1日)
- 39) 鈴木美奈、小嶋雅代、細野晃弘、荒井健介、辻村尚子、岡京子、藤田ひとみ、岡本尚子、神谷真有美、近藤文、鈴木貞夫。医学生の喫煙に関する意識と行動に関する状況調査。第72回日本公衆衛生学会総会、津市(2013年10月23日~25日)
- 40) 鈴木貞夫、小嶋雅代、細野晃弘、柴田清、荒井健介、辻村尚子、岡京子、藤田ひとみ、岡本尚子、神谷真有美、近藤文、鈴木美奈。慢性萎縮性胃炎の疫学-肥満との関連を中心に。第72回日本公衆衛生学会総会、三重県津市(2013年10月23日~25日)
- 41) 鈴木貞夫、小嶋雅代、細野晃弘、荒井健介、辻村尚子、岡京子、藤田ひとみ、岡本尚子、神谷真有美、近藤文、鈴木美奈。地域住民のペプシノーゲン検査による萎縮性胃炎の評価と関連因子について。第24回日本疫学会学術総会、宮城県仙台市(2014年1月24日~25日)
- 42) 今井俊夫、打屋尚章、藤井元、武藤倫弘、高橋真美。高脂肪食による乳腺発がん促進に関与する発現遺伝子の探索。第20回日本がん予防学会、東京(2013年7月)
- 43) 今井俊夫、藤井元、武藤倫弘、高橋真美。若齢期高脂肪食によるラット乳腺発がんの促進/進展に対するライフステージ特異的細胞周期関連遺伝子の発現調節異常の関与。第72回日本癌学会学術総会、横浜(2013年10月)
- 44) 今井俊夫、打屋尚章、藤井元、武藤倫弘、高橋真美。高脂肪食により誘発されるレプチン抵抗性に対する臓器感受性差と乳腺発がん。第30回日本毒性病理学会、徳島(2014年1月)
- 45) 岩崎基、津金昌一郎。移民研究から推定されるがん予防効果。第72回日本癌学会学術総会、横浜市(2013年10月)
- 46) 鈴木礼子、岩崎基、原梓、井上真奈美、笹月静、澤田典絵、山地太樹、島津太一、津金昌一郎。野菜・果物の摂取量とホルモン受容体(ER/PR)別乳がん罹患との関連~JPHC多目的コホート研究。第24回日本疫学会学術総会、仙台市、(2014年1月)
- 47) 鰐淵英機。膀胱癌の病理診断の基礎知識、第101回泌尿器科学会総会「卒後教育プログラム」、札幌(2013年4月)
- 48) Nakatani, S., Ishimura, E., Mori, K, Wanibuchi, H., Inaba M. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy. the 50th ERA-EDTA Congress, Istanbul, Turkey (May 2013)
- 49) 鰐淵英機、桑江優子、魏民、若狭研一、梯アンナ。ヒト肝細胞癌における特異的候補分子の機能解析。第102回日本病理学会総会、札幌(2013年6月)



- 50) 鰐淵英機、魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、藤岡正喜。ヒ素発がん性の機序の解明。第20回日本がん予防学会、東京(2013年7月)
- 51) 梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、長野嘉介、西牧富久美、魏 民、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28回発癌病理研究会、沖縄県南城市(2013年8月)
- 52) Okumura, M., Wei, M., Yamano, S., Fujioka, M., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in F344 rats. The European Cancer Congress 2013, Amsterdam, the Netherlands (Sep 2013)
- 53) 魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、加藤実、武下正憲、梯アンナ、鰐淵英機。1,2-ジクロロプロパンのマウスおよびハムスターの肝臓における代謝および毒性発現機序の検討。第72回日本癌学会学術総会、横浜(2013年10月)
- 54) 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、奥村真衣、下村衣里、梯アンナ、鰐淵英機。gpt delta ラットを用いた DMA(V), iAs(III)の変異原性および遺伝子変化の検討。第72回日本癌学会学術総会、横浜(2013年10月)
- 55) 梯アンナ、桑江優子、加藤 実、山野莊太郎、神吉将之、魏 民、若狭研一、鰐淵英機。ヒト肝細胞癌における新規特異的候補分子ターゲットの機能解析。第72回日本癌学会学術総会、横浜(2013年10月)
- 56) 山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、三島胡桃、鰐淵英機。内因性NADPH オキシダーゼインヒビターであるアポサイニンラット腎発がんにおいて発がん抑制作用を有する。第72回日本癌学会学術総会、横浜(2013年10月)
- 57) 奥村真衣、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機。ラット中期多臓器発がん性試験法を用いた DPAA(diphenyl arsenic acid)の発がん修飾作用の検討。第72回日本癌学会学術総会、横浜(2013年10月)
- 58) 鰐淵英機、奥村真衣、藤岡正喜、魏 民。多臓器発がん性試験法を用いたラットにおけるジフェニルアルシン酸の発がん性の検討。第19回ヒ素シンポジウム、福岡(2013年11月)
- 59) Yamano, S., Wei, M., Wanibuchi, H. Cancer initiating cell of lung squamous cell carcinoma in mice might be derived from of the bronchiolar alveolar stem cell. 第18回日韓がんワークショップ、岐阜(2013年11月)
- 60) 魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、梯アンナ、下村衣里、神吉将之、鰐淵英機。シリアンハムスターにおける1,2-dichloropropanの強制経口投与による肝毒性とその発現機序の検討。第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島(2014年1月)
- 61) 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機。肝発がんにおける LC-Ms/Ms及び*in vitro*機能解析を用いた新規特異的候補分子の検討。第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島(2014年1月)
- 62) 山野莊太郎、尾崎清和、武田周二、串田昌彦、井澤武史、山手丈至、平田暁大、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機。EHEN投与ラットの前腸由来臓器への分化多能性を示す肝芽腫の一例。第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島(2014年1月)
- 63) 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、下村衣里、三島胡桃、福永賢輝、鰐淵英機。ラット膀胱におけるプロボリスの発がん促進作用及びその機序の検討。第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島(2014年1月)
- 64) 奥村真衣、藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、三島胡桃、多胡善幸、鰐淵英機。ラット中期多臓器発がんモデルを用いたDPAA(diphenyl arsenic acid)の発がん修飾作用の検討。第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島(2014年1月)
- 65) 三島胡桃、山野莊太郎、藤岡正喜、魏 民、北野光昭、鰐淵英機。EHEN誘発ラット腎発がんにおいて内因性NADPH oxidase 阻害剤 apocyninは抑制作用を有する。第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島(2014年1月)
- 66) 下村衣里、藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、梯アンナ、串田昌彦、鰐淵英機。DMA<sup>V</sup>およびiAs<sup>III</sup>ラット膀胱、肝臓における変異原性の解析。第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島(2014年1月)
- 67) 梯アンナ、魏 民、福島昭治、鰐淵英機。ラット肝発がんにおけるValerianの予防効果。第13回分子予防環境医学研究会、和歌山(2014年1~2月)
- 68) 三島胡桃、山野莊太郎、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機。EHEN誘発ラット腎発がんにおいて内因性NADPH oxidase 阻害剤 apocyninは抑制作用を有する。第13回分子予防環境医学研究会、和歌山(2014年1~2月)
- 69) Wei, M., Yamano, S., Fujioka, M.,

- Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. 平成25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(2014年2月)
- 70) 山野莊太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機。ラット腎発がんにおけるNADPH oxidase(NOX)の役割。平成25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(2014年2月)
- 71) 清水雅仁、森脇久隆。ASH・肥満関連分子異常を標的とした肝癌再発予測と肝発癌化学予防。JDDW2013、東京(2013年10月9日~12日)
- 72) Shimizu, M., Moriwaki, H. Targeting obesity-related metabolic abnormalities for chemoprevention of hepatocellular carcinoma. The 3<sup>rd</sup> Asian-Pacific Topic Conference, Tokyo (November 2013)
- 73) Shimizu, M., Terakura, D., Kochi, T., Ohno, T., Kubota, M., Shirakami, Y., Tanaka, T., Moriwaki, H. Preventive effects of branched-chain amino acids supplementation on the spontaneous development of hepatic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-*db/db* obese mice. 104<sup>th</sup> AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting Washington, DC, USA (April 2013)
- 74) Shimizu, M., Moriwaki, H. Chemoprevention of obesity- and diabetes-related liver carcinogenesis by branched-chain amino acids and acyclic retinoid. The 3<sup>rd</sup> AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research, National Harbor, MD, USA (September 2013)
- 75) 清水雅仁、寺倉大志、森脇久隆。シンポジウム3「NAFLD/NASHの病態解明と治療への展開」:肝および内臓脂肪の炎症制御を介した分岐鎖アミノ酸によるNAFLD関連肝腫瘍形成の抑制。第99回日本消化器病学会総会、鹿児島(2013年3月21日~23日)
- 76) 清水雅仁、寺倉大志、河内隆宏、白上洋平、田中卓二、森脇久隆。ワークショップ「炎症および傷害物質に関連した発がん予防」:肝および内臓脂肪の炎症制御を介した分岐鎖アミノ酸による肥満・糖尿病関連肝腫瘍形成の抑制。第20回日本がん予防学会、東京(2013年7月5日~6日)
- 77) 白上洋平、清水雅仁、森脇久隆、清島満。ワークショップ「炎症および傷害物質に関連した発がん予防」:非アルコール性脂肪肝炎関連肝発癌新規モデルとペントキシフィリンによる発癌抑制効果。第20回日本がん予防学会、東京(2013年7月5日~6日)
- 78) 清水雅仁、森脇久隆。シンポジウム「レチノイド研究温故知新-レチノイドの新たな作用点を求めて-」:非環式レチノイドによる肝発癌化学予防 - Chemoprevention of hepatocellular carcinoma by acyclic retinoid-。日本レチノイド研究会第24回学術集会、東京(2013年8月30日~31日)
- 79) 清水雅仁、白上洋平、森脇久隆。パネルディスカッション1「C型肝炎を背景とした肝細胞癌-予防から再発治療まで-」:非環式レチノイドと分岐鎖アミノ酸を用いた肝発癌抑制-肥満関連肝発癌抑制と両剤の併用投与による相乗的肝癌細胞増殖抑制-。JDDW2013、東京(2013年10月9日~12日)
- 80) 高橋智。前立腺癌の病理組織学的診断~Gleason分類を中心に~、卒後教育プログラム「泌尿器科腫瘍:泌尿器がんの病理診断の基礎知識」。第101回日本泌尿器科学会総会、札幌(2013年4月)
- 81) 鈴木周五、佐藤慎哉、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102回日本病理学会総会、札幌(2013年6月)
- 82) 佐川弘之、内木綾、佐藤慎哉、竹山廣光、高橋智。ラット非アルコール性脂肪肝炎に対する Luteolin の予防効果の検討。第20回日本がん予防学会、東京(2013年7月)
- 83) 佐川弘之、内木綾、加藤寛之、鈴木周五、竹山廣光、高橋智。ラット非アルコール性脂肪肝炎に対するルテオキンの予防効果とコネキシン32の役割の検討。第72回日本癌学会学術総会、横浜(2013年10月)
- 84) 内木綾、加藤寛之、久野壽也、高橋智。ラット非アルコール性脂肪肝炎における Connexin 32 の役割と luteolin による予防効果。第30回日本毒性病理学会、徳島(2014年1月)
- 85) 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)
- H. 知的所有権の取得状況  
 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

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 carbonic anhydrase の阻害作用を持つ acetazolamide の大腸発がんへの影響を *Apc* 遺伝子変異のある *Min* マウスを用いて検討した。その結果、400 ppm acetazolamide 投与群では *Min* マウス腸ポリープ生成数はコントロール群に生成した腸ポリープ数の約 50%まで減少した。そのメカニズムの一つとして、acetazolamide は NRF2 を活性化することで IL-6、MCP-1 の発現レベルを低下させ、細胞増殖を抑制する機序が考えられた。また、acetazolamide は Bcl-2 の発現を抑制することにより、アポトーシスを誘導し易くする作用が新たに示唆された。以上より、acetazolamide は大腸がん化学予防剤候補となる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

【*Min* マウスの腸ポリープ生成に対する acetazolamide の影響】

5 週齢の雄 *Min* マウスに、200、400 ppm acetazolamide (carbonic anhydrase の非特

異的阻害剤)を基礎食 AIN-76A に混ぜ与えた。13 週齢にて屠殺し、肝臓、腎臓、脾臓、腸管を摘出した。小腸は近位(4 cm)、中位及び遠位部に分け、特に近位部位の腸ポリープは計測後摘出し、-80 度で保存した。残りの小腸と大腸を合わせた 4 部分についてはホルマリン固定後、実体顕微鏡を用いて腸ポリープの数及

び腸ポリープの長径を計測した。

次に腸ポリープ部位における細胞増殖、またはアポトーシスを評価する目的で 細胞増殖の指標として PCNA、アポトーシスの指標として ssDNA に対する免疫染色を行った。そして、PCNA 陽性細胞数および ssDNA 陽性細胞数を計測した。

細胞周期関連因子である c-Myc, cyclin D1、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の mRNA 発現レベルを realtime RT-PCR 法にて測定した。

さらに、腸ポリープ組織及び肝臓における炎症性サイトカイン発現レベルを評価する目的で、Min マウスの腸ポリープ、肝臓組織より RNA を抽出し、炎症関連遺伝子である IL-6、MCP-1、Pai-1 の mRNA 発現レベルを realtime RT-PCR 法にて測定した。また、Min マウスの腸ポリープにおける IL-6 受容体(gp80)の発現レベルも測定評価した。

#### 【Acetazolamide による炎症関連因子発現抑制メカニズムの検討】

細胞増殖及びストレス応答に関する転写因子の活性化状態を評価する目的で、ヒト大腸がん細胞 Caco-2 に 7 種類のプラスミドベクター (AP-1、HIF、HSF、NF- $\kappa$ B、NRF2、p53、STAT3) と、特定の DNA を組み込んでいないプラスミドベクター (NgCT) を各々遺伝子導入した。その後、Caco-2 細胞に 500 mM acetazolamide 処理を行い、24 時間後に、基質としてルシフェラーゼを加え、プレートリーダーにてその発光量を測定した。

NRF2 下流の mRNA 発現への影響を評価する目的で、ヒト大腸がん細胞における  $\gamma$  GCS、MCP-1 の mRNA 発現レベルを検討した。腸ポリープ部位においても  $\gamma$  GCS、GPx1、HO-1、NQO-1 の mRNA 発現レベルを測定した。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

### 【Min マウスの腸ポリープ生成に対する acetazolamide の影響】

Acetazolamide 投与により、腸ポリープ生成数の有意な減少が認められた。特に 400 ppm 投与群では control 群の約 50%にまで腸ポリープ生成数が減少した。Acetazolamide 投与により腸ポリープにおける PCNA 陽性細胞数の減少と、c-Myc、cyclinD-1 の mRNA 発現レベルの低下が認められた。逆に、ssDNA 陽性細胞数は増加し、Bcl-2 の mRNA 発現レベルは低下した。腸ポリープ、肝臓組織において、IL-6、MCP-1 の mRNA 発現レベルが低下していた。また、腸ポリープにおいては、acetazolamide による gp80 の発現レベルへの影響はなかった。IL-6、MCP-1 は炎症・細胞増殖関連因子であるため、次の実験では、IL-6、MCP-1 の発現低下メカニズムを検索した。

### 【Acetazolamide による炎症関連因子発現抑制メカニズムの検討】

7 種類の酸化ストレスに関する転写因子のうち、acetazolamide は特に NRF2 の転写活性を増強させた。ヒト大腸がん細胞において、acetazolamide により NRF2 に制御されている  $\gamma$  GCS の mRNA 発現レベルが上昇、MCP-1 の発現レベルが低下した。また、腸ポリープ部位における発現を確認すると、 $\gamma$  GCS、GPx1、HO-1、NQO-1 の mRNA 発現レベルが上昇していた。

## D. 考察