

1990;81:1101-8)。また、5件中3件が日本からの報告であり、2001年以降は新しい研究が追加されていなかった。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が特徴である。

コーヒー摂取がリスク低下に関連するメカニズムとしては、コーヒー酸やフェルラ酸などの抗酸化作用や、クロロゲン酸などによる糖吸収の抑制作用が指摘されている。

今後の課題として、他にポリフェノールを含有する飲料(緑茶、紅茶、ウーロン茶など)との関連を検討し、コーヒーに特異的に見られる関連かどうかを確かめる予定である。

2. 血漿中分岐鎖アミノ酸濃度と大腸腺腫との関連

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。

E. 結論

今年度は、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のデータを用いて、インスリン抵抗性に関連する食物要因としてコーヒーに着目し、大腸腺腫との関連を検討した。その結果、全体として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唆している。また分岐鎖アミノ酸もインスリン抵抗性への関与が示唆されている食物要因であるが、血中分岐鎖アミノ酸濃度と大腸腺腫との関連を検討するために、上記研究の血漿検体を用いて血中濃度の分析を行っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Charvat H, Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Tsugane S, for the JPHC Study Group. Impact of five modifiable lifestyle habits on the probability of cancer occurrence in a Japanese population-based cohort: Results from the JPHC study. *Prev Med.* 2013;57:685-9.
2. Hara A, Sasazuki S, Inoue M, Miura T, Iwasaki M, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Tsugane S, for the Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Plasma isoflavone concentrations are not associated with gastric cancer risk among Japanese men and women. *J Nutr.* 2013;143:1293-8.
3. 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*. 2014;66(1):57-67.
4. Pandey JP, Kistner-Griffin E, Black L, Namboodiri AM, Iwasaki M, Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. IGKC and FcgammaR genotypes and humoral immunity to HER2 in breast cancer. *Immunobiology*. 2014;219:113-7.
 5. Pandey JP, Namboodiri AM, Kistner-Griffin E, Iwasaki M, Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. Racially restricted contribution of immunoglobulin Fcgamma and Fcgamma receptor genotypes to humoral immunity to human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer. *Clin Exp Immunol*. 2013;171:273-7.
 6. Shi J, Sung H, Zhang B, Lu W, Choi JY, Xiang YB, Kim MK, Iwasaki M, Long J, Ji BT, Park SK, Zheng Y, Tsugane S, Yoo KY, Wang W, Noh DY, Han W, Kim SW, Lee MH, Lee JW, Lee JY, Shen CY, Matsuo K, Ahn SH, Gao YT, Shu XO, Cai Q, Kang D, Zheng W. New Breast Cancer Risk Variant Discovered at 10q25 in East Asian Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22:1297-303.
 7. Suzuki R, Iwasaki M, Hara A, Inoue M, Sasazuki S, Sawada N, Yamaji T, Shimazu T, Tsugane S, for the 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*. 2013;24:2117-28.
 8. Zheng W, Zhang B, Cai Q, Sung H, Michailidou K, Shi J, Choi JY, Long J, Dennis J, Humphreys MK, Wang Q, Lu W, Gao YT, Li C, Cai H, Park SK, Yoo KY, Noh DY, Han W, Dunning AM, Benitez J, Vincent D, Bacot F, Tessier D, Kim SW, Lee MH, Lee JW, Lee JY, Xiang YB, Zheng Y, Wang W, Ji BT, Matsuo K, Ito H, Iwata H, Tanaka H, Wu AH, Tseng CC, Van Den Berg D, Stram DO, Teo SH, Yip CH, Kang IN, Wong TY, Shen CY, Yu JC, Huang CS, Hou MF, Hartman M, Miao H, Lee SC, Putti TC, Muir K, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsana P, Sangrajrang S, Shen H, Chen K, Wu PE, Ren Z, Haiman CA, Sueta A, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Pharoah PD, Wen W, Hall P, Shu XO, Easton DF, Kang D. Common genetic determinants of breast-cancer risk in East Asian women: a collaborative study of 23 637 breast cancer cases and 25 579 controls. *Hum Mol Genet*. 2013;22:2539-50.
 9. Abe SK, Inoue M, Sawada N, Iwasaki M, Ishihara J, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, Shibuya K, Tsugane S. Rice, bread, noodle and cereal intake and colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective Study (JPHC Study). *Br J Cancer*. 2014;110:1316-21.

10. Wada K, Nagata C, Tamakoshi A, Matsuo K, Oze I, Wakai K, Tsuji I, Sugawara Y, Mizoue T, Tanaka K, Iwasaki M, Inoue M, Tsugane S, Sasazuki S, for the Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan. Body mass index and breast cancer risk in Japan: a pooled analysis of eight population-based cohort studies. Ann Oncol. 2014;25:519-24.

2. 学会発表

1. 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、神奈川県横浜市. 2013年10月
2. 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、宮城県仙台市、2014年1月

G. 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

Table 1. Characteristics of controls according to the quartiles of coffee intake.

	Quartiles of coffee intake (ml/day)			
	Q1 (<25.7)	Q2 ($\geq 25.7 \square 113.6$)	Q3 ($\geq 113.7 \square 290.7$)	Q4 (>290.7)
Men, n (%)	86 (62.3)	130 (65.0)	93 (61.6)	144 (69.23)
Age (years), mean (SD)	61.1 (5.4)	60.8 (6.1)	59.8 (5.8)	58.3 (6.0)
BMI (kg/m ²), mean (SD)	22.9 (3.0)	23.0 (2.7)	22.7 (2.7)	23.4 (2.9)
Physical activity,* mean (SD)	37.3 (9.8)	36.8 (8.1)	35.9 (6.2)	36.0 (6.6)
Ever smoker, n (%)	49 (35.5)	90 (45.0)	70 (46.4)	126 (60.6)
Ever drinkers, n (%)	91 (65.9)	143 (71.5)	103 (68.2)	156 (75.0)
Supplement use, n (%)	4(2.9)	11 (5.5)	5 (3.3)	8 (3.9)
Diabetes mellitus history, n (%)	6 (4.3)	11 (5.5)	7 (4.6)	18 (8.7)
Parental colorectal cancer, n (%)	8 (5.8)	17 (8.5)	10 (6.6)	18 (8.7)
NSAID use, n (%)	7 (5.1)	19 (9.5)	17 (11.3)	10 (4.8)
Dietary intake, † mean (SD)				
Total energy (kcal/day)	1823 (465)	1899 (491.0)	1936 (476)	2013 (514)
Total fiber (mg/day)	13.9 (5.5)	13.4 (5.0)	13.9 (4.7)	13.1 (4.7)
Folic acid (mg/day)	450.4 (162.4)	433.5 (158.5)	405.5 (140.3)	393.2 (142.8)
Isoflavone (mg/day)	52.7 (59.7)	44.8 (28.9)	44.8 (25.6)	42.6 (25.9)
Vegetable (g/day)	214.0 (132.6)	200.4 (122.7)	205.8 (107.1)	190.3 (124.0)
Fruit (g/day)	222.1 (161.4)	224.3 (162.4)	229.8 (160.7)	210.7 (165.2)

*METs-hr/d. † Energy-adjusted values except for total energy.

Table 2. Logistic regression models of the effect of coffee intake on colorectal adenoma.

	Quartiles of coffee intake (ml/day)				P trend
	Q1 (<25.7)	Q2 ($\geq 25.7 \square 113.7$)	Q3 ($\geq 113.7 \square 290.7$)	Q4 (>290.7)	
Both					
Case/controls	163/138	212/200	160/151	203/208	
OR (95% CI)*	1.00 (reference)	0.91 (0.67 \square 1.22)	0.93 (0.67 \square 1.28)	0.86 (0.64 \square 1.16)	0.38
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.85 (0.62 \square 1.16)	0.83 (0.59 \square 1.16)	0.66 (0.48 \square 0.92)	0.02
Men					
Case/controls	113/86	132/130	104/93	149/144	
OR (95% CI)*	1.00 (reference)	0.78 (0.53 \square 1.13)	0.89 (0.59 \square 1.32)	0.85 (0.59 \square 1.22)	0.61
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.72 (0.49 \square 1.07)	0.81 (0.53 \square 1.24)	0.67 (0.45 \square 1.01)	0.11
Women					
Case/controls	50/52	80/70	56/58	54/64	
OR (95% CI)*	1.00 (reference)	1.19 (0.72 \square 1.97)	1.00 (0.59 \square 1.72)	0.88 (0.51 \square 1.50)	0.46
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	1.14 (0.65 \square 1.99)	0.75 (0.41 \square 1.39)	0.62 (0.34 \square 1.16)	0.052

*Adjusted for age, sex (in both) and screening period.

†Adjusted for age, sex (in both), screening period, cigarette smoking, alcohol drinking, body mass index, physical activity, parental colorectal cancer history, supplemental vitamin use, non-steroidal anti-inflammatory drug use, and total calorie, isoflavone, folate and fiber intake.

Table 3. Logistic regression models of the effect of coffee intake on colorectal adenoma according to site, size and number.

	Quartiles of coffee intake				P trend
	Q1 (<25.7)	Q2 ($\geq 25.7 \square 113.6$)	Q3 ($\geq 113.7 \square 290.7$)	Q4 (>290.7)	
Controls	138	200	151	208	
Site of adenoma					
Proximal colon					
Case	94	106	80	104	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.74 (0.51 \square 1.07)	0.73 (0.49 \square 1.09)	0.64 (0.43 \square 0.94)	0.03
Distal colon					
Case	58	73	57	73	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.77 (0.5 \square 1.19)	0.76 (0.47 \square 1.21)	0.61 (0.39 \square 0.96)	0.04
Rectum					
Case	10	29	18	24	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	1.93 (0.88 \square 4.25)	1.47 (0.62 \square 3.47)	1.03 (0.45 \square 2.38)	0.48
Size of adenoma					
<5 mm					
Case	95	119	83	116	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.82 (0.57 \square 1.17)	0.71 (0.47 \square 1.06)	0.63 (0.43 \square 0.93)	0.02
≥ 5 mm					
Case	68	93	77	87	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.86 (0.57 \square 1.30)	1.01 (0.65 \square 1.56)	0.68 (0.44 \square 1.04)	0.12
Number of adenoma					
1 adenoma					
Case	95	130	81	119	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.83 (0.58 \square 1.18)	0.66 (0.44 \square 0.99)	0.63 (0.43 \square 0.93)	0.01
> 1 adenoma					
Case	68	82	79	84	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.86 (0.57 \square 1.31)	1.15 (0.74 \square 1.79)	0.70 (0.45 \square 1.09)	0.23

†Adjusted for age, sex (in both), screening period, cigarette smoking, alcohol drinking, body mass index, physical activity, parental colorectal cancer history, supplemental vitamin use, non-steroidal anti-inflammatory drug use, and total calorie, isoflavone, folate and fiber intake.

Table 4. Logistic regression models of the effect of coffee intake on colorectal adenoma stratified by the selected factors.

	Quartiles of coffee intake				P trend
	Q1 (<25.7)	Q2 (≥ 25.7 □ 113.3)	Q3 (≥ 113.7 □ 290.7)	Q4 (>290.7)	
6)					
Cigarette smoking					
Never smoker					
Case/controls	91/89	105/110	74/81	61/82	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.95 (0.62 □ 1.45)	0.87 (0.54 □ 1.39)	0.62 (0.38 □ 0.99)	0.051
Ever smoker					
Case/controls	72/49	107/90	86/70	142/126	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.79 (0.49 □ 1.29)	0.87 (0.52 □ 1.45)	0.75 (0.47 □ 1.21)	0.35
Alcohol drinking					
Never drinker					
Case/controls	48/41	43/52	37/37	33/44	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.77 (0.40 □ 1.47)	0.91 (0.45 □ 1.88)	0.46 (0.22 □ 0.95)	0.07
Ever drinker					
Case/controls	115/97	169/148	123/114	170/164	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.90 (0.62 □ 1.30)	0.81 (0.54 □ 1.21)	0.71 (0.49 □ 1.04)	0.06
Body mass index (kg/m ²)					
<25					
Case/controls	111/113	155/156	114/124	141/154	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.96 (0.67 □ 1.38)	0.82 (0.56 □ 1.22)	0.75 (0.51 □ 1.11)	0.10
≥ 25					
Case/controls	52/25	57/44	46/27	62/54	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.54 (0.28 □ 1.06)	0.82 (0.39 □ 1.71)	0.49 (0.25 □ 0.98)	0.12
Physical activity (median /METs –hr/day)					
< median					
Case/controls	85/68	104/100	88/77	112/103	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.80 (0.51 □ 1.26)	0.85(0.53 □ 1.37)	0.75(0.47 □ 1.19)	0.30
\geq median					
Case/controls	78/70	108/100	72/74	91/105	
OR (95% CI)†	1.00 (reference)	0.87(0.55 □ 1.37)	0.76(0.46 □ 1.26)	0.58(0.36 □ 0.93)	0.02

†Adjusted for age, sex, screening period, parental colorectal cancer history, supplemental vitamin use, non-steroidal anti-inflammatory drug use, and total calorie, isoflavone, folate and fiber intake. Cigarette smoking, alcohol drinking, body mass index, physical activity were adjusted in the alternate models.

肝発がん抑制物質の検索

分担研究者 鰐淵英機 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 教授

研究要旨 本研究では、酸化ストレスの蓄積に着目し、内因性 NADPH oxidase inhibitor である Apocynin のラット腎発がん修飾作用の検討を行った。雄性 Wistar ラット及び EHEN を組み合わせた化学発がんモデルで Apocynin の評価を行った結果、EHEN 単独投与群と比較し、EHEN-Apocynin 投与群において細胞増殖能及び血管新生能を抑制することで腫瘍のみならず前がん病変の発生頻度及び個数を抑制した。その機序として PI3K/Akt/mTOR signaling pathway について検討した結果、本パスウェイに非依存的に抑制することが明らかとなった。以上より、Apocynin は EHEN 誘発ラット腎発がんモデルにおいて、PI3K/Akt/mTOR signaling pathway 非依存的に発がん抑制作用を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

腎臓は、薬物の排泄を担い、種々の物質の再吸収なども行うことから、常に高い酸化ストレスが負荷される臓器である。加えて、酸化ストレスの負荷は、糖尿病性腎症をはじめ種々の疾患に関与することが報告されている。今回の研究では、酸化ストレスに着目し、内因性 NADPH Oxidase inhibitor である Apocynin のラット腎発がん修飾作用の検討を行った。

B. 研究方法

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 500 ppm の用量で 2 週間飲水投与し、Group 1 には、水道水を投与した。実験開始第 3 週から 32 週まで、Group 3 には Apocynin を 15 mg/kg BW の用量で、また Group 1 及び 2 には、溶媒である saline を 1 time/day, 5 days/week

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、各種解析に興じた。動物実験に関しては、大阪市立大学動物実験委員会の承認を取り(承認番号:12023)、動物実験施設の飼育規定を遵守し、動物愛護の精神で飼育した。

C. 研究結果

これまでに、EHEN 誘発ラット腎発がんにおける発がん抑制作用を明らかにしてきたが、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ェスタンブロッティング(WB)にて検討を行った。まず、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 α 、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 の発現現象を認めた。以上の結果より、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 α 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 について検討した結果、いずれのリン酸化蛋白においても発現量に差は見られなかった。

D. 考察

今回行った免疫染色の結果より、EHEN 誘発ラット腎発がんにおける機序として、前がん病変である ATH から腫瘍である RCT 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 α 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 α 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

的である可能性が示唆された。

E. 結論

本研究では、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。その結果、Apocynin は発がん抑制作用を示し、腎発がん予防に極めて重要である可能性が示唆された。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 に関して検討した結果、本パスウェイに非依存的に発がん抑制作用を示した。今後の展望として、既存の分子標的治療薬である mTOR 阻害剤と Apocynin の併用療法においてもがん細胞において有用であるかを検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*, 42, 1034-1039, 2013.

Xie XL, Kakehashi A, Wei M, Yamano S, Takeshita M, Yunoki T, Wanibuchi H. l-Leucine and l-isoleucine enhance growth of BBN-induced urothelial tumors in the rat bladder by modulating expression of amino acid transporters and tumorigenesis-associated genes. *Food Chem*

- Toxicol, 59, 137-144, 2013.
- Hanada S, Nishiyama N, Mizuguchi S, Yamano S, Kakehashi A, Wei M, Inoue H, Komatsu H, Chung K, Suehiro S, Wanibuchi H. Clinicopathological significance of combined analysis of cytokeratin19 expression and preoperative serum CYFRA21-1 levels in human lung squamous cell carcinoma. *Osaka City Med J*, 59, 35-44, 2013.
- Komatsu H, Kakehashi A, Nishiyama N, Izumi N, Mizuguchi S, Yamano S, Inoue H, Hanada S, Chung K, Wei M, Suehiro S, Wanibuchi H. Complexin-2 (CPLX2) as a potential prognostic biomarker in human lung high grade neuroendocrine tumors. *Cancer Biomark*, 13, 171-180, 2013.
- 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.
- 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.
- Tago Y, Yamano S, Wei M, Kakehashi A, Kitano M, Fujioka M, Ishii N, Wanibuchi H. Novel medium-term carcinogenesis model for lung squamous cell carcinoma induced by N-nitroso-tris-chloroethylurea in mice. *Cancer Sci*, 104, 1560-1566, 2013.
- Hanada S, Kakehashi A, Nishiyama N, Wei M, Yamano S, Chung K, Komatsu H, Inoue H, Suehiro S, Wanibuchi H. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate as a prognostic biomarker in human primary lung squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*, 13, 289-298, 2013.
- Takahashi K, Tanaka M, Inagaki A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Nagayama K, Shiota M, Iwao H. Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. *Int J Oncol*, 43, 1985-1991, 2013.
- Kakehashi A, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens. *Cancers*, 5, 1332-1354, 2013.
- Kato M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Evaluation of the modifying effect of inhalation of mainstream cigarette smoke on mouse bladder carcinogenesis. *J Toxicol Pathol*, 26, 447-451, 2013.
- Takada J, Hoshi M, Oebisu N, Ieguchi M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Nakamura H. A Comparative Study of Clinicopathological Features Between Simple Bone Cysts of the Calcaneus and the Long Bone. *Foot Ankle*

Int, 35, 374-382, 2014.
Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Tanaka M, Shiota M, Osada-Oka M, Nakamura Y, Wei M, Wanibuchi H, Iwao H, Yoshiyama M. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. Biochem Biophys Res Commun. 445, 327-333, 2014.
藤岡正喜、山野荘太郎、魏 民、鰐淵英機. 免疫組織染色の定量法. 細胞工学, 学研メディカル秀潤社, 33(3), 316-322, 2014.

2. 学会発表

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)

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 (2013 年 5 月)

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)

鰐淵英機、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、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)

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)

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 (2013 年 9~10 月)

魏 民、山野荘太郎、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)

藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、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)

梯アンナ、桑江優子、加藤 実、山野荘太郎、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)

山野荘太郎、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は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)

奥村真衣、藤岡正喜、山野荘太郎、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)

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)

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)

魏 民、山野荘太郎、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)

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)

山野荘太郎、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)

藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、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ポ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)
奥村真衣、藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、

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)

三島胡桃、山野荘太郎、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)

下村衣里、藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、梯アンナ、串田昌彦、鰐淵英機:DMA^VおよびiAs^{III}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)

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)

三島胡桃、山野荘太郎、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)

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)

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)

2. 実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

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

分担研究課題名:非アルコール性肝炎と肝発がんの抑制

分担研究者 清水 雅仁 岐阜大学医学部附属病院 講師

研究要旨:肥満や糖尿病は肝発癌の危険因子である。また、これらの病態に合併する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、肝硬変や肝癌に進展することが知られている。本研究は、肥満やNASH関連肝発癌のメカニズムを解明し、それらの分子異常を標的とする新規肝発癌予防法(薬)を開発することを目的とする。我々は本研究において、メタボリック症候群のモデル動物であるSHRSP.Z-Lep^{fl}/IzmDmcrラットを用いて、新規NASH関連肝発癌モデルを作成し、肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常、adipokineの不均衡に加え、レニン-アンギオテンシン系(RAS)の活性化に伴う炎症および酸化ストレスの亢進が、NASH関連肝発癌において重要な役割を果たしていること、また緑茶カテキンEGCGが、これらの分子異常を改善・制御することで、肝前癌病変の発生を抑制することを明らかにした。また糖尿病治療薬の一つであるmetforminが、血清インスリンを低下させ、PI3K/Akt/mTOR pathwayを抑制し、adipokineの不均衡を改善することで、マウスの肥満・糖尿病関連肝腫瘍形成を抑制することを明らかにした。これらの研究結果は、RASの抑制を介した炎症および酸化ストレスの軽減と、PI3K/Akt/mTOR pathwayの抑制が、肥満・糖尿病患者やNASH患者の肝発癌抑制に繋がる可能性を強く示唆するものである。

A. 研究目的

高インスリン血症やadipokineの不均衡をはじめとする、肥満や糖尿病に関連する様々な分子異常は、肝発癌に深く関与している。また、肥満や糖尿病に合併する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、肝硬変・肝癌に進展することが知られているが、その詳細な機序については十分に解明されておらず、確立された治療法もない。本研究は、新規NASH関連肝発癌モデルを作成するとともに、抗炎症・抗酸化ストレス・発癌抑制効

果を有する緑茶カテキンEGCGと、biguanide系糖尿病治療薬であるmetforminによる、肥満・NASH関連肝腫瘍形成の抑制効果を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

実験①:メタボリック症候群のモデル動物で、高血圧・肥満・糖尿病を呈するSHRSP.Z-Lep^{fl}/IzmDmcr(SHRSP-ZF)ラットと、非肥満・正常血圧対照群であるWKY/Izm(WKY)ラット(7週齢雄)に高脂肪

食と四塩化炭素を投与し、肝線維化と肝前癌病変 GST-P⁺ foci を誘発するとともに、0.1%EGCG 含有水を投与し、その抑制効果を検討した。

実験②: 肥満・2 型糖尿病を呈する *db/db* マウスに、肝化学発癌物質 DEN を飲水投与し、肝癌前癌病変 (Foci of cellular alteration: FCA) と肝腫瘍を誘発するとともに、metformin (300mg/kg/day) を飲水投与し、肝発癌に対する抑制効果を検討した。(倫理面への配慮)

動物を用いた研究は、岐阜大学大学院医学系研究科動物実験審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

実験①: 体重と肝および脂肪重量は、EGCG 投与の有無に関わらず、WKY ラット (第 1、2 群) と比較し SHRSP-ZF ラット (第 3、4 群) で増加していた。WKY ラットと比較し SHRSP-ZF ラットで、血清 AST、ALT、インスリン、グルコース、レプチン、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸値の上昇と、アディポネクチン値の低下を認めた。肝組織では、SHRSP-ZF ラットにおいて肝脂肪化、小葉内炎症、肝細胞の風船様変化、マロリー体を認めた。NASH activity score は、第 3 群では第 1 群に比して有意に高く、第 4 群では第 3 群に比して有意に低下していた。GST-P⁺ foci は、第 3 群では第 1 群に比して有意に増加しており、第 4 群では第 3 群に比して有意に減少していた。肝線維化は、第 3 群では第 1 群に比して有意に亢進し、第 4

群では第 3 群に比して有意に抑制されていた。また血清アンジオテンシン II 濃度、肝 ACE、AT-1R mRNA の発現量、肝 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 mRNA の発現量、血清 d-ROM 値、肝組織中 MDA 量、肝 CYP2E1 および p-JNK 蛋白の発現量についても同様の変化を認めた。

実験②: 剖検時 (24 週齢)、DEN 単独投与群と比較し metformin 投与群において、FCA の発生数と肝腫瘍の発生率は有意に減少していた。また 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。

D. 考察

実験①: 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誘導と肝線維化の促進が、SHRSP-ZF ラットにおける肝前癌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。また EGCG が、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 RAS の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癌病変形成を抑制した可能性が示唆された。

実験②: metformin は、血清 adipokine の不均衡の改善と、肝 PI3K/Akt/mTOR シグナルの制御を介して、肥満・糖尿病に関連したマウスの肝発癌を抑制した。

E. 結論

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 が、肥満・糖尿病関連肝発癌抑制において有効な化合物である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 2014; 58: 124-135
2. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y. Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell* 2014; 156: 663-677
3. 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 Lett 2014; 342: 60-69

4. Hanai T, Shiraki M, Nishimura K, Imai K, Suetsugu A, Takai K, Shimizu M, Naiki T, Moriwaki H. Free fatty acid as a marker of energy malnutrition in liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2014; 44: 218-228
5. Tanaka T, Shimizu M, Moriwaki H. Chemical-induced Carcinogenesis. *J Exp Clin Med* 2013; 5: 203-209
6. Suzuki Y, Imai K, Takai K, Hanai T, Hayashi H, Naiki T, Nishigaki Y, Tomita E, Shimizu M, Moriwaki H. Hepatocellular carcinoma patients with increased oxidative stress levels are prone to recurrence after curative treatment: a prospective case series study using the d-ROM test. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 845-852
7. 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* 2013; 2: 690
8. 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 2013; 8: e82860

9. Kochi T, Shimizu M, Ohno T, Baba A, Sumi T, Kubota M, Shirakami Y, Tsurumi T, Tanaka T, Moriwaki H. Enhanced development of azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in hypertensive rats. Int J Mol Sci 2013; 14: 14700-14711

10. 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 2013; 8: e73404

11. 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 2013; 13: 465

2. 学会発表

1) 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)

2) Shimizu, M., Moriwaki, H. Targeting obesity-related metabolic abnormalities for chemoprevention of hepatocellular carcinoma. The 3rd

Asian-Pacific Topic Conference, Tokyo (November 2013)

3) 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. 104th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting Washington, DC, USA (April 2013)

4) Shimizu, M., Moriwaki, H. Chemoprevention of obesity- and diabetes-related liver carcinogenesis by branched-chain amino acids and acyclic retinoid. The 3rd AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research, National Harbor, MD, USA (September 2013)

5) 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)

6) 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)
- 7) 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と予防」：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)
- 8) 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)
- 9) 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)

G. 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

NASH関連肝発がん和前立腺発がん抑制物質の検索

分担研究者 高橋 智 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨 フラボノイドの1つである Luteolin のラット NASH 関連肝発がんおよび前立腺発がんに対する抑制効果について検討した。Luteolin は(i) NASH の病理組織学的進展、炎症性サイトカインの mRNA 発現、肝前がん病変 GST-P 陽性細胞巢の発生数を有意に抑制した。(ii) 側葉前立腺におけるがんの発生頻度、発生個数、腹葉前立腺におけるがんの発生個数を有意に減少させた。前立腺腫瘍性病変におけるアポトーシスの亢進、増殖活性の抑制と酸化ストレス応答遺伝子 Gpx2 発現の関与が示唆された。両者における共通の発がん抑制メカニズムとして、酸化ストレスの抑制が明らかとなり、Luteolin は酸化ストレスが病態の進展に関与していると言われる NASH 関連肝発がん和前立腺がんの化学予防剤として有望であると考えられた。

A. 研究目的

食生活やライフスタイルの欧米化による肥満の増加に伴い、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) の発症率が近年増加の一途をたどっており、検診受診者の約 30%に見られる。肝への脂肪蓄積を生じる NAFLD の約 2~3 割は、肝細胞の壊死、炎症および線維化を生じる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に進展するといわれており、肝硬変や肝がんの発症母地となりうる危険性が明らかになりつつある。NASH の病態進行には酸化ストレス上昇、加齢すなわちホメオスタシス低下の関与が指摘されており、抗酸化物質の食事や投薬による摂取は NASH および NASH に関連した肝発がんの予防や治療に

有効である可能性が示唆される。

一方、細胞間結合装置の一つであるギャップ結合は、Connexin (Cx)タンパクから構成され、隣接細胞間のコミュニケーションを介し組織や生体のホメオスタシスを担っている。我々は肝で発現している Cx32 のドミナントネガティブトランスジェニック (Cx32 Δ Tg) ラットを作製し、Cx32 Δ Tg ラットでは同腹の野生型 (Wt) ラットと比較して肝前がん病変の形成が促進されることを明らかにした。Cx32 Δ Tg ラットで認めたこの現象は、加齢 Wt ラットで生理的に起こる Cx32 発現の低下と肝発がん性の亢進と酷似している。従って、Cx32 Δ Tg ラットモデルは、加齢動物の形質を示す点で、NASH の病態進行のリスクを表現して

おり、NASH および NASH 関連肝発がんの病態や化学予防効果の解析に有用なモデルであると考えられる。

前立腺がん罹患数は全世界で男性の悪性腫瘍中4番目に多く、年間約40万人発症しており、日本においても近年増加傾向が著しい悪性腫瘍である。これまでの研究成果から前立腺がんは高齢者がんであること、食事などの環境要因に強く影響されること、臨床的に顕在化するまでに長期間を要すること、および酸化ストレスが腫瘍発生や進展に関与することなどが明らかになっており、前立腺がんは発症予防が極めて重要、かつ実践可能な腫瘍であることを示している。

前立腺がん化学予防の研究においてその予防効果を解析する方法が重要であるが、我々の教室では前立腺がん好発トランスジェニックラット (Transgenic Rat for Adenocarcinoma of Prostate, TRAP) を樹立して研究を行っている。TRAP モデルは、前立腺特異的に発現する probasin プロモーター下に SV40 T antigen を組み込んだ構築遺伝子を導入したラットで、前立腺腹葉および側葉に前がん病変および腺がんが短期間に発症し、前立腺発がん過程を詳細に検討するのに適したモデルであると考えられる。

Luteolin は、エゴマ種子やピーマンなどの食品中に多く含まれているフラボノイドの一種で、抗酸化作用や抗炎症作用を有している。これまでに大腸や乳腺などの複数のがんに対する予防効果が知られているが、NASH 関連肝発がんや前立腺発がんに対する検証はなされていない。そこで我々は Luteolin の NASH 関連肝がんおよび前立腺

がんに対する効果について、Cx32 Δ Tg モデルおよび TRAP モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

(i) NASH 関連肝発がんに対する予防効果の検討

10週齢雄Cx32 Δ TgおよびWtラットに Diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg) を単回腹腔内投与し、DEN投与2日後から、メチオニン・コリン欠乏(MCD)飼料を投与した(1群19匹)。各々にLuteolin (100ppm) 混餌投与群を設け、実験開始2週(各群4匹)および12週後(各群15匹)に肝組織を採取した。

肝組織における脂肪変性、炎症、肝細胞障害および線維化の程度と肝前がん病変の評価を行った。NASHの病態は、脂肪変性と炎症細胞浸潤の指標となるNAFLD activity score (NAS)および線維化の程度を組織学的に定量した。肝前がん病変は、GST-P免疫染色による陽性細胞巢の数(/cm²)および大きさ(mm²/cm²)を計測した。肝における炎症性サイトカインのmRNA発現量を定量 RT-PCRにより確認した。肝凍結組織を用いて、活性酸素に反応して蛍光発色する dihydroethidium (DHE) による染色を行い、核における蛍光シグナルを数値化し、NASH 肝組織における酸化ストレスの定量を行った。MCD飼料投与後2,12週後のWtラット肝凍結組織を用いてCx32蛍光免疫組織染色を行い、NASHに伴うCx32タンパクの発現および局在の変化を観察した。

(ii) 前立腺発がんに対する予防効果の検討