

201313010B (1/5)

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22年度～25年度 総合研究報告書

I. 総合研究報告

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

(1 / 5 冊)

研究代表者 武藤 倫弘

平成26 (2014) 年3月

目 次

I. 総合研究報告

がん化学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究 ----- 1

武藤 倫弘

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----41

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 70

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）
平成22年度～平成25年度 総合研究報告書

がん化学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究

研究代表者 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

研究要旨 本研究は、各種がんのハイリスクグループを対象とし、食品素材及び医薬品によるがん予防剤の開発とその臨床応用を目的として、H22～H25 年度に施行した。各項において特記すべき研究成果として以下のものがあげられる：

< 予防剤開発 > 【NOX 阻害剤】NADPH oxidase 阻害作用を持つ apocynin の、肥満関連発がんへの抑制作用を検討した。肥満 KK-A^y マウス及び Apc 遺伝子変異のある Min マウスでは apocynin 飲水投与で、AOM 誘発 ACF 数や腸ポリープ生成数が減少した。EHEN 誘発ラット腎発がん実験系においても活性酸素種産生が低下し、腎発がんが抑制された。更に TRAP ラットでも前立腺発がんが抑制できることを明らかにした。【コーヒー成分】コーヒーのインスリン抵抗性改善作用が示唆されている。そこで、がん検診受診者を対象にコーヒー摂取量と大腸腺腫の関連を検討したところ、コーヒー摂取量が多い群には結腸腺腫が少ないことを見出した。DSS 誘発大腸炎に対するコーヒー及びその成分 (chlorogenic acid, cafestol) の抗炎症効果を検討した結果、Th17 経路の抑制を介した炎症抑制効果があり、大腸腫瘍生成も抑制することを明らかにした。【BCAA】分岐鎖アミノ酸製剤 (BCAA)、インスリン抵抗性改善薬であるメホルミン、さらに非環式レチノイドによって、マウスの脂肪肝とそこから促進される肥満関連肝腫瘍形成がともに抑制されることを見出した。作用機序として、IGF/IGF-1 受容体の過剰活性や PI3K/Akt/mTOR/p70S6 経路の抑制が示唆された。また脂肪肝の発生に深く関わるインスリンの受容体と結合する IRS-1 を欠損したマウスでは、肝腫瘍の増大低下と炎症・細胞増殖能の抑制が認められた。DMBA 誘発乳腺発がんにおいても、高脂肪食に BCAA を併用することにより、高分化腺がんの発生頻度及び数の減少を認めた。更に BCAA 摂取量を評価するためのアミノ酸成分表データベースの構築を行い、BCAA の有用性を多目的コホート研究等のデータでの検討を可能とする基盤整備を行なった。

< 臨床試験 > 【肝がん】アディポサイトカインの異常と肝発がんの関連性検索として、根治的治療後の肝細胞がん患者 (Stage I) を対象に臨床試験を行った。その結果、血清ビスファテン値の上昇が、肝細胞がんの臨床病期進行および腫瘍径の増大と相関することがわかった。早期治療後の再発の予測因子として、術前のインスリン抵抗性 (HOMA-IR 2.3以上)、高レプチン血症/肝酸化ストレスの指標である血清 d-ROM 高値 (570 Carr U 以上) が有用であることが示唆された。【膵臓がん】膵脂肪浸潤の程度を面積比としてヒト膵組織切片を用いて算出する手法を考案し、膵がん症例と対照例とを比較した。この結果、膵がん症例では膵脂肪浸潤の程度がより高いことが明らかとなり、膵脂肪浸潤が膵がんリスク要因となることを示唆するデータを得た。【大腸がん】低用量アスピリン腸溶錠 (100 mg/日) による家族性大腸腺腫症患者に対する RCT を行い、2 mm 以下の大腸ポリープが有意に縮小することを見出した。また非遺伝性多発性大腸腺腫症患者に対する2年間の低用量アスピリン腸溶錠 (100 mg/日) への介入試験においても、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でより効果が高いことも示された (OR=0.37)。

分担研究者

武藤倫弘	国立がん研究センター研究所 ユニット長	清水雅仁	岐阜大学	講師
		高橋 智	名古屋市立大学	教授
		窪田直人	東京大学	特任准教授
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 動物実験支援施設長			
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 部長			
鰐潤英機	大阪市立大学			

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うとともに、発がんの高危険度群と考えられる人々を対象とした臨床研究を行うことにより、

安全性の高い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

(1) 大腸・肝・膵臓発がん抑制物質の検索

【ARBの大腸前がん病変に与える影響の検討】6週齢メス KK-*A*^v 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最終投与の2日後よりアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB;カンデサルタン)を10、20、50 ppmの濃度で飲水投与し、13週齢時にマウスの大腸 aberrant crypt foci (ACF)数及びACs数を測定した。さらに異型 ACF 生成数の測定を行うことにより、より進行した ACF 数を評価した。大腸粘膜の細胞増殖活性は PCNA 免疫染色により評価した。

【短期脂肪肝炎モデルの作成とその評価】6週齢雌 KK-*A*^v マウスに、基礎食(4.5% fat)、15% EtOH + 基礎食、高脂肪食(Quick Fat; 13.7% fat)または15% EtOH + 高脂肪食を24日間与えた。更に15% EtOH + 高脂肪食群に3%分岐鎖アミノ酸(BCAA)、40 ppm pitavastatin または1,000 ppm metformin を投与した。脂肪肝の評価として、凍結切片の Oil red-O で染色、肝臓内トリグリセリド量測定、及び各種炎症マーカーを realtime-PCR にて評価した。

【膵脂肪浸潤と膵がんリスクとの関連】ヒト膵組織切片を用いて、膵脂肪浸潤の程度を面積比として算出するために、膵頭十二指腸切除術の施行症例サンプルを集めた(367症例)。対照は膵頭十二指腸切除術を施行された胆道がん症例とした(85例)。組織切片を用いて、組織切片画像をコンピュータに取り込み、組織切片画像上の膵組織全体に対する脂肪細胞の面積の割合を画像解析ソフトを用いて計測した。

【NADPH oxidase 阻害剤の肥満 KK-*A*^v 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*^v マウスに、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の用量で飲水投与し、13週齢時に全マウスの大腸 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 oxLDL 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】

7週齢雄 Min マウスに apocynin を500 mg/Lの用量で6週間飲水投与した。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 oxLDL 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 real-time 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。

【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、carbonic anhydrase の阻害剤である acetazolamide を200、400 ppmの用量で基礎食 AIN-76A に混ぜ与えた。13週齢にて屠殺した。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。

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- κ B、NRF2、p53、STAT3)を各々遺伝子導入した。その後、Caco-2 細胞に500 μ M acetazolamide 処理を行い、24時間後に、各々の転写活性を測定した。更に NRF2 下流の分子の mRNA 発現レベルを検討した。

(2) 大腸・舌発がん抑制物質の検索

【肥満細胞欠損マウスにおける炎症関連大腸発がん】肥満細胞を欠損した4週齢オス WBB6F1-W/W^v マウス (C57BL/6 バックグラウンド) を31匹、コントロールとして WBB6F1-+/+ を34匹使用し、それぞれ AOM + dextran sulfate sodium (DSS) 投与群、AOM 群、DSS 群、無処置群に分けた。AOM は10 mg/kg 体重を単回、腹腔内投与し、DSS は AOM 投与1週後より1週間2%の用量で飲水投与した。実験は20週で終了し、大腸を中心に病理学的解析を行った。なお、実験開始後12週時に各群2匹について大腸病変の発生状況の評価した。

【炎症関連大腸発がんに対する crocin の影響】雄性 ICR マウス(4週齢)96匹を使用し、AOM + DSS、AOM + DSS + 50 ppm

crocin(アカネ科クチナシ果実に含まれている水溶性カロテノイド)、AOM + DSS + 100 ppm crocin、AOM + DSS + 200 ppm crocin、200 ppm crocin、無処置の6群に分け、処置した。AOM (10 mg/kg 体重) を1回腹腔内投与後、DSS (1.5%) を1週間飲水投与し、その後 crocin を混餌投与した。実験期間は18週とした。別に、雄性 ICR マウス (5週齢) 25匹を使用して、1.5% DSS 飲水投与 (1週間) で誘発される大腸炎粘膜における cyclooxygenase (COX)-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, の mRNA 発現に対する crocin の影響を検討した。

【炎症関連大腸発がんに対する GOFAL-NAME の影響】雄性 ICR マウス (5週齢) 56匹を、AOM + DSS 群、AOM + DSS + 100 ppm 抗腫瘍作用のある 3-(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-trans propenoic acid (GOFAL)-L-NAME 群、AOM + DSS + 500 ppm GOFAL-NAME 群、500 ppm GOFAL-NAME 群、AOM 群、DSS 群、無処置群の7群に分けて実験を行った。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、GOFAL-NAME は DSS 投与1週後より15週間混餌投与した。実験開始後18週で病理学的解析を行った。別に、4週間の短期実験にて、1.5% DSS (1週間飲水投与) 誘導マウス大腸粘膜炎症性サイトカインの mRNA 発現に対する GOFAL-NAME 混餌投与の影響を解析した。

【ヒスタミン受容体と炎症関連大腸発がん】112匹の雄性 ICR マウスを用いた。実験群は AOM (10 mg/kg 体重、単回腹腔内投与) + 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週後より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

【炎症関連大腸発がんに対するソマトスタチンアナログの影響】6週齢オス ICR マウスに AOM (10 mg/kg, ip) を投与し、1週間後から1週間2% DSS を飲水投与し、その後は自由飲水投与した。エサは CE-7 を用いた。実験第2、6、10週に、B群、C群にソマトスタチンアナログ

octoreotide をそれぞれマウス1匹当たり1回、0.01 mg (ヒト投与量相当)、あるいは0.2 mg を筋注した。A群には、溶媒である生理食塩水を同様に投与した。実験第8、11、14週にそれぞれ、5、10、25匹ずつ屠殺し、大腸腫瘍の発生率、発生数、体積を計測した。腫瘍は病理組織学的に解析した。実験第14週における各群の血清脂質値 (トリグリセリド、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール) を測定した。下垂体、肝臓、大腸粘膜の一部を採取し、total RNA を抽出し、下垂体成長ホルモン (Growth hormone, GH)、肝 insulin like growth factor-1 (IGF-1, somatomedin)、大腸 growth hormone receptor (Ghr)、IGF-1、IGF-1 receptor (IGF-1R)、IGF binding protein 2 (IGFBP2)、IGFBP3、IGFBP5、AKT、mammalian target of rapamycin (mTOR)、TNF α 、COX2、iNOS の発現量を相対的定量的 RT-PCR 法により解析した。

【潰瘍性大腸炎モデルに対するコーヒー成分の影響】

C57BL/6J、BALB/c、ICR マウスに大腸炎誘発物質である2% DSS を1週間飲水投与した後、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4週間自由飲水投与した。また、コーヒー中の抗酸化物質の主成分と考えられる chlorogenic acid (D群、2500 ppm) あるい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、実験第5週で屠殺した。

【炎症関連大腸発がんに対するコーヒー成分の影響】

5週齢オス C57BL/6J マウスに10 mg/kg 体重の AOM および2% 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) 大腸 ACF を用いた大腸がん予防薬の評価

【SSAP 患者における ACF の観察】

Sessile serrated polyp (SSAP) 患者35例を対象に、拡大内視鏡を用いて大腸内視鏡検査を行い、右側大腸 (上行結腸及び盲腸) 全体にメチレンブルーを散布し、拡大観察することにより ACF を観察した。その後、ACF を生検して病理学的及び遺伝子学的解析を行った。また、対照群として、健常人の右側大腸の ACF を観察した。

【ACF 及び SSAP の細胞生物学的解析】

生検採取した ACF 及び SSAP 組織のフォルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、Ki67 の免疫染色、TUNEL 染色等を行い、細胞増殖活性やアポトーシスの程度を検討した。

【ACF 及び SSAP の遺伝子解析】

凍結保存した ACF 及び SSAP 組織より DNA を抽出し、*B-RAF* や *K-RAS* 遺伝子を 2-step PCR RFLP 法により、p53 は免疫染色により、MSI は PCR SSCP 法より、P16 や HIC1 のメチル化は Bisulfite 法により検討した。

【RAS 特異的阻害剤の AOM 誘発ラット大腸腫瘍生成への影響】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 ACF 数を調べ、24 週後に腸ポリープ(がん)の数を検討した。

【炎症関連大腸発がんに対する TP 特異的阻害剤の影響】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ニにした 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

【Zucker (+/fa) ラットにおける DMBA 誘発乳がんの基礎的解析】

Zucker (+/fa) 及び野生型 (+/+) メスラットにおける DMBA 誘発性乳がん組織 (高分化型 5 試料、中・低分化型 3 試料) を用いて、各種タンパクのリン酸化修飾 (phospho-ERK1 (T202/Y204) /ERK2 (T185/Y187)、phospho-Stat3 (Tyr705)) について検討した。

【コーン油及び BCAA の血清レプチン値に及ぼす影響】

Zucker (+/fa) メスラット 32 匹及び野生型 (+/+) ラット 16 匹を各々 2 群及び 3 群に分け、5 週齢～7 週齢時の 2 週間において 10% コーン油添加食 (CE-2)、10% コーン油 + 1.5% BCAA 添加食あるいは 10% コーン油 + 3.0% BCAA 添加食を与えた。また、血清レプチン値を測定した。

【コーン油及び BCAA の DMBA 誘発乳腺発がん実験に及ぼす影響 (Zucker (+/fa) ラット)】Zucker (+/fa) メスラット 33 匹及び野生型 (+/+) ラット 15 匹を各々 3 群に分け、5 週齢～7 週齢時の 2 週間において基礎食、10% コーン油添加食あるいは 10% コーン油 + 3.0% BCAA 添加食を与える実験を開始した。現在、実験開始 1 週目であり、3 週目の 7 週齢時に DMBA を 50 mg/kg 体重の用量で強制経口投与する。実験終了時に、乳腺腫瘍、乳腺組織を採取して病理組織学的に検索した。

【コーン油及び BCAA の DMBA 誘発乳腺発

がん実験に及ぼす影響 (F344 ラット)】F344 雌ラットに対しても、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 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

【多目的コホート研究における緑茶摂取と乳がんリスクとの関連】1990 年開始のコホート I 及び 1993 年開始のコホート II の 10 保健所管内に研究開始時点に在住していた女性地域住民 (40~69 歳) のうち、67, 422 人が対象である。ベースラインの質問票調査の回答者からがんの既往者を除いた 53, 793 人を 2006 年 12 月末まで追跡したところ、581 人の新規乳がん罹患を同定した。また同追跡期間中にベースライン調査と 5 年後調査の両方に回答した 43, 639 人から 350 人の新規乳がん罹患を同定した。ベースライン調査の質問票を用いた解析では、緑茶の摂取量が週 1 杯未満の群を基準に、週 1-2 杯、週 3-4 杯、1 日 1-2 杯、1 日 3-4 杯、および 1 日 5 杯以上の群のハザード比を算出した。また 5 年後調査の質問票を用いた解析では、煎茶または番茶・玄米茶の摂取量が週 1 杯未満の群を基準に、週 1-6 杯、1 日 1 杯、1 日 2-3 杯、1 日 4-6 杯、1 日 7-9 杯、および 1 日 10 杯以上の群のハザード比を算出した。ハザード比は、Cox 比例ハザードモデルを用いて、年齢、地域、初経年齢、閉経状況、閉経年齢、初産年齢、出産数、身長、body mass index (BMI)、飲酒、喫煙、身体活動、外因性ホルモン剤使用、家族歴、紅茶、ウーロン茶、コーヒー摂取で調整した。

【多目的コホート研究におけるコホート内症例対照研究による血中緑茶ポリフェノール濃度と乳がんリスクとの関連】コホート I 及び II のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった者から、24, 226 人を研究対象者とした。本研究の症例は、ベースライン調査後から 2002 年 12 月 31 日までの追跡期間中に組織学的に診断された初発の乳がん患者のうち、質問票への回答かつ血液検体の提供のあった 144 人である。対

照は、研究対象者のうち症例の乳がん発症日 (診断日) の時点で乳がんに罹っていない者とした。ベースライン調査時の血漿検体より、緑茶ポリフェノール類 ((-)-epigallocatechin (EGC) 、 (-)-epicatechin (EC) 、 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 、 (-)-epicatechin-3-gallate (ECG)) を HPLC にて分析した。血中濃度により、検出下限値以下の群、検出下限値を超えた場合はその中央値により 2 群に分け、検出下限値以下の群を基準にオッズ比を条件付ロジスティック回帰分析により算出した。オッズ比は、初経年齢、閉経状況および閉経年齢、出産数、初産年齢、身長、BMI、飲酒で調整した。

【乳がんの症例対照研究における緑茶摂取と乳がんリスクとの関連】長野県内において多施設症例対照研究 (4 病院) を行った。初発の乳がんを診断され、入院した 20 歳以上 75 歳未満の女性患者を症例とし、400 症例を目標に収集し、最終的に症例 405 例と同数の対照を収集した。質問票は、生理・生殖関連、既往歴、職業、居住地、飲酒、喫煙などに関する質問票と食物摂取頻度調査票の 2 つを用いた。がんの部位、進行度、ホルモンレセプターなどの臨床情報を収集した。また、生体試料として血液検体を収集し、遺伝子多型のタイピングを行った。統計解析は、オッズ比を条件付ロジスティック回帰分析により算出した。オッズ比は閉経状況、出産数、乳がん家族歴、喫煙状況、身体活動、ビタミンサプリメント使用、ウーロン茶、紅茶、コーヒーおよび缶コーヒー摂取で調整した。

【BCAA 摂取量の妥当性の検討 (がん予防・検診研究センターの検診受診者を対象とした食物摂取頻度調査票の妥当性研究)】BCAA 摂取量の妥当性は、がん予防・検診研究センターの検診受診者 (2004 年 1 月から 2006 年 7 月; 40~69 歳) を対象とした食物摂取頻度調査票の妥当性研究 (144 人) の 4 日間の食事記録調査、食物摂取頻度調査票、血漿検体を用いて検討した。

【血漿中 BCAA 濃度と肥満関連バイオマーカーとの関連】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。また肥満関連バイオマーカーは免疫測定法により分析した。血漿中バリン、イソロイシン、ロイシンの値の分布に基づき四分位点で 4 群に分けたグループごとに肥満関連バイオマーカーの幾何平均値を算出した。

【BCAA 摂取と大腸腺腫との関連】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。

【コーヒー摂取と大腸腺腫との関連】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行った。

(9) 腎及び肝発がん抑制物質の検索

【水素水による DEN 誘発肝発がんの抑制】8 週齢オス Wistar ラット 25 匹を用い、thioacetamide (TAA) 誘発肝硬変モデルの作成を試みた。TAA または生理食塩水を 6 回腹腔内投与した。水素水または水道水は実験開始時より飲水投与した。Diethyl-nitrosamine (DEN) 誘発肝発がんモデルでは、6 週齢の雄性 F344 ラット 40 匹を用い、実験開始時に DEN または生理食塩水を単回腹腔内投与し、開始 2 週目水素水または水道水の飲水投与、開始 3 週目で肝部分切除を施行し 8 週で全匹の剖検を行った。

【Apocynin による EHEN 誘発腎発がんの抑制】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、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 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 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。更に、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を行った。

(10) 非アルコール性肝炎と肝発がんの抑制

【BCAA 及び ACR による肥満関連肝腫瘍形成の抑制】肥満関連肝化学発がんモデルに、肥満を伴った肝硬変患者の肝発がんを抑制した BCAA や、肝がん化学予防薬として期待されている非環式レチノイド (ACR) を投与し、その発がん抑制機序を検討した。作用機序については *in vitro* において確認を行った。

【肝細胞がん患者における早期治療後の再発の予測因子の同定】臨床検体を用いて肥満関連肝発がんに関与する

biomarker の検索も同時に行い、新規標的分子や予後予測因子の同定を行った。

【EGCG による肥満関連肝腫瘍形成の抑制】高血圧・糖尿病を呈する SHRSP. Z-Lep^{fa}/IzmDmcr (SHRSP-ZF) ラットに、高脂肪食と CCl₄ 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。

【メトホルミンによる肥満関連肝腫瘍形成の抑制】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 (300 mg/kg/day) を飲水投与し、その腫瘍形成抑制効果を検討した。

(11) 前立腺・肝発がん抑制物質の検索

【PCC 及び PSPC のヒト前立腺がん細胞株への影響】ヒト前立腺がん細胞株としてアンドロゲン依存性増殖を示す LNCaP (変異型アンドロゲン受容体 (AR))、アンドロゲン非依存性である VCaP (野生型 AR) および LNCaP から樹立したアンドロゲン非依存性亜株である AI-8 を用いた。これらの細胞に紫トウモロコシ色素 (Purple corn color, PCC) および紫イモ色素 (Purple sweet potato color, PSPC) を暴露し、細胞増殖、細胞周期、AR シグナル伝達経路に対する影響を検討した。

【PCC による TRAP ラット前立腺発がんの抑制】6 週齢の TRAP 雄ラットに PCC (アントシアニン含有量 20.9%) を 0.1%, 1% 濃度で混餌投与し、PCC を投与しない対照群を設けた。実験期間 8 週間で全動物を屠殺剖検し、前立腺を中心に病理組織学的検索を行った。前立腺標本を用いて Ki67, TUNEL 免疫染色を行い、細胞増殖、アポトーシスを評価した。また、腹葉前立腺を用いてウェスタンブロッティングを行い、発がん抑制効果の機序の解析を行った。

【Apocynin による TRAP ラット前立腺発がんの抑制】雄性 6 週齢の TRAP ラットに apocynin を 100, 500 mg/L 濃度で飲料水投与した。apocynin を投与しない対照群も設けた。実験期間 8 週間で全動物を屠殺剖検し、前立腺を中心に病理組織学的検索を行った。前立腺標本を用いて Ki67, TUNEL 免疫染色を行い、細胞増殖、アポトーシスを評価した。また、腹葉前立腺を用いてウェスタンブロッティング、マイクロアレイ解析を行い、発がん抑制効果の機序の解析を行った。

【Luteolin による NASH 関連肝発がんの抑制】10 週齢雄 Cx32 ドミナントネガティブトランスジェニック (Cx32 ΔTg) ラッ

ト、野生型ラットに DEN (200 mg/kg) を単回腹腔内投与、MCD 飼料を 12 週間投与し、各々に luteolin (100 ppm) 混餌投与群を設けた。

【Luteolin による TRAP ラット前立腺発がんの抑制】6 週齢 TRAP 雄ラットに luteolin を 20, 100 ppm 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

【アディポネクチンの創傷治癒における役割】レプチン作用欠損マウスである *ob/ob* マウスを用いた検討から、アディポサイトカインの 1 つであるレプチンが創傷治癒を促進することが報告されている。本研究では 2 型糖尿病や肥満でその分泌が低下しているインスリン感受性ホルモン、アディポネクチンの創傷治癒における役割について検討するため、ケラチノサイトを用いた *in vitro* 実験ならびに、糖尿病・肥満モデル動物として *db/db* マウスを用いた解析を行った。

【肝がん発症におけるインスリンシグナルの寄与】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 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・膵臓発がん抑制物質の検索

【ARB の大腸前がん病変に与える影響の検討】

大腸 ACF 生成数は、対照群に比較して、50 ppm ARB 投与群で約 20%減少する傾向が認められ、2 個以上の異常腺窩からな

る ACF の生成数は有意に減少した。更に、異型 ACF 生成数も ARB 投与により減少した。50 ppm ARB 投与群において、大腸粘膜における PCNA 陽性細胞の割合は有意に低下した。また、50 ppm ARB 投与群において c-Myc の発現抑制が認められた。一方、腹部脂肪におけるアディポサイトカイン発現の変化を検討したところ、調べたアディポサイトカインの内、plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1) の mRNA 発現が抑制されていることがわかった。

【短期脂肪肝炎モデルの作成とその評価】基礎食群、15% EtOH + 基礎食群、高脂肪食群または 15% EtOH + 高脂肪食群の肝臓内トリグリセリド量は約 200 mg/g liver に増加していた(他の群は 40-60 mg/g liver)。3% BCAA、40 ppm pitavastatin または 1,000 ppm metformin の投与によって、Oil red-O 染色が弱まる像が観察され、肝臓内トリグリセリド量は 100 mg/g liver 以下に減少した。また、pitavastatin 投与群と metformin 投与群において、基礎食群と比べ IGF-1 値の有意な低下を認めた。

【膵脂肪浸潤と膵がんリスクとの関連】解析した膵がん症例のほとんどが早期の膵臓がんであった。膵脂肪浸潤の面積の割合を組織切片内で計測したところ、膵がん症例では膵脂肪浸潤の面積割合が対照例に比較して有意に高いことがわかった。(中央値; 26% vs 15%, $p < 0.001$)。そこで脂肪浸潤のリスクファクターである BMI、HbA1C との相関を検討してみると、BMI や HbA1C の値が低くても膵がん症例においては、脂肪浸潤の高い症例が多いことが明らかになった。以上のことから、ヒトにおいて膵脂肪浸潤は膵がんに関連していると考えられた。

また、糖尿病、肥満のような交絡要因を除外して解析をしても膵脂肪浸潤は膵がんと関連していることがわかった。

【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】Apocynin を投与した 13 週齢の KK-A^y マウスの血清における oxLDL 量を測定したところ、減少傾向が認められた。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。

【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 マウスの腸ポリープ上皮における NADPH oxidase の構成因子 (NOX1, NOX2, p22^{phox})

の発現量を real-time PCR にて測定したところ、NOX1 は非ポリープ部位の約 5 倍、p22^{phox} は約 10 倍にその発現量が上昇していた。13 週齢における雄 Min マウスの腸ポリープ数は平均 50.4 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 個となった ($p < 0.05$)。次に腸ポリープ数減少のメカニズムを検討すると、apocynin 投与によって inducible nitric oxide synthase (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。

【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、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。また、PCNA 陽性細胞数の減少と、c-Myc、CyclinD1 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。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。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 γ GCS の mRNA 発現レベルが上昇、MCP-1 の発現レベルが低下した。

(2) 大腸・舌発がん抑制物質の検索

【肥満細胞欠損マウスにおける炎症関連大腸発がん】12 週齢における大腸病変は、WBB6F1-W/W^v マウスの AOM/DSS 投与群 2 匹で粘膜潰瘍が 8 個、異形成が 2 個、腺腫が 4 個、腺がんが 1 個、DSS 群 2 匹では粘膜潰瘍が 8 個観察された。一方、WBB6F1-+/+マウスでは、AOM/DSS 投与群 2 匹で粘膜潰瘍が 16 個、異形成が 8 個、腺腫が 2 個、腺がんが 7 個観察され、DSS 群 2 匹では粘膜潰瘍が 34 個観察された。WBB6F1-W/W^v マウス、WBB6F1-+/+マウスとも他群の大腸に病変は観察されなかった。

両マウスにおける大腸腫瘍の発生頻度に有意差はなかったが、WBB6F1-W/W^v マウスの大腸腺がんおよび大腸腫瘍の発生個数は WBB6F1-+/+マウスに比較して、WBB6F1-W/W^v マウスで有意に少なかった。また、WBB6F1-W/W^v マウス (0.799 mm^3) に発生した大腸腫瘍の体積も WBB6F1-+/+マウス (3.454 mm^3) に比較して、有意に低かった。

【炎症関連大腸発がんに対する crocin の

影響】大腸腺腫発生率は AOM + DSS 群 (81%)、AOM + DSS + 50 ppm crocin 群 (70%)、AOM + DSS + 100 ppm crocin 群 (60%)、AOM + DSS + 200 ppm crocin 群 (45%、 $p < 0.05$)、大腸腺がん発生率は AOM + DSS 群 (90%)、AOM + DSS + 50 ppm crocin 群 (60%、 $p < 0.05$)、AOM + DSS + 100 ppm crocin 群 (50%、 $p < 0.01$)、AOM + DSS + 200 ppm crocin 群 (35%、 $p < 0.001$) であった。一方、大腸当たりの腺腫発生個数 (平均) は AOM + DSS 群 (2.35)、AOM + DSS + 50 ppm crocin 群 (1.65)、AOM + DSS + 100 ppm crocin 群 (1.00、 $p < 0.05$)、AOM + DSS + 200 ppm crocin 群 (0.75、 $p < 0.01$)、大腸当たりの腺がん発生個数 (平均) は AOM + DSS 群 (3.15)、AOM + DSS + 50 ppm crocin 群 (1.45、 $p < 0.01$)、AOM + DSS + 100 ppm crocin 群 (0.70、 $p < 0.001$)、AOM + DSS + 200 ppm crocin 群 (0.50、 $p < 0.001$) であった。この結果から、crocin の混餌投与、特に 100 ppm 及び 200 ppm の用量で有意な腫瘍発生抑制効果が観察された。また、A さらに、200 ppm crocin の混餌投与により、大腸粘膜の COX-2、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 の発現が顕著に低下した。

【炎症関連大腸発がんに対する GOFA-L-NAME の影響】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、AOM + DSS + 100 ppm GOFA-L-NAME 群 : 0.50 ($p < 0.01$ 、93%抑制率)、AOM + DSS + 500 ppm GOFA-L-NAME 群 : 0.17 ($p < 0.001$ 、95%抑制率) であった。短期実験では、GOFA-L-NAME の 500 ppm 混餌投与で大腸粘膜の COX-2、iNOS、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、Mip-2 の mRNA 発現が有意 ($p < 0.05 \sim p < 0.001$) に低下し、100 ppm 混餌投与では Mip-2 発現が有意 ($p < 0.05$) に低下した。

【ヒスタミン受容体と炎症関連大腸発がん】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 ± 3.45)、AOM + DSS + terenadine 群 : 93% (2.50 ± 1.34)、AOM + DSS + cimetidine 群 : 33%、 $p < 0.05$ 、(0.60 ± 1.12 、 $p < 0.05$)、AOM + DSS + clobenpropit 群 : 40% (0.60 ± 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。