

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告

試験デザインおよび統計解析

-大腸腺腫の内視鏡的徹底的摘除のパイロット研究-

研究開発分担者 鈴木 貞夫 名古屋市立大学教授

研究要旨 頻回の大腸内視鏡検査により大腸ポリープの徹底摘除を行った家族性大腸腺腫症（FAP）患者のデータを日本ポリポーシスセンターに登録されているデータと比較することにより、大腸がん罹患抑制効果を評価した。2001年9月から2012年1月までに内視鏡的ポリープ摘除を希望した患者は90人であった。内視鏡検査回数は8.7回、ポリープ摘除数は平均618.9個、累積総ポリープ摘除数は55,701個であった。総追跡人年は484.9人年であった。経過観察中に2例が密生型になったため大腸全摘・回腸直腸吻合術を受けた。内視鏡経過観察1年以内に5例8病変の粘膜内がんを認め、すべて内視鏡的に根治的摘除した。経過観察中に大腸がんを認めなかった。以上のことより、大腸内視鏡によるポリープ摘除により、FAP患者の大腸がん発生を予防できる可能性が示された。

A. 研究目的

家族性大腸腺腫症（familial adenomatous polyposis：FAP）は大腸にきわめて多数の腺腫が発生する稀な遺伝性疾患であり、40歳ぐらいまでに患者の約半数が大腸がんを罹患する大腸がん超高危険度群である。本疾患と診断された患者は、20歳前後で大腸全摘・回腸囊肛門吻合術か結腸全摘・回腸直腸吻合術を行うことが唯一大腸がんを予防する方法である。しかし、近年大腸内視鏡による大腸ポリープ摘除技術が進歩し、極めて安全にポリープを内視鏡的に摘除することが可能になってきた。また、結腸全摘・回腸直腸吻合術を行った患者に対して、残存直腸を大腸内視鏡検査にて厳重に経過観

察することにより、直腸がんの発生を抑制できることが報告されている。

今研究では、手術を拒否しているFAP患者に対して大腸内視鏡検査により大腸ポリープの徹底摘除を行い、蓄積したデータを用いて大腸がん罹患抑制効果を評価した。

B. 研究方法

<内視鏡治療方法>

大腸内視鏡検査では回腸まで挿入し、全大腸を観察した。ほとんどの大腸領域でインジコカルミンによる色素散布を行った。ポリープ摘除は形態と大きさに応じてポリペクトミーまたはEMRを行い、まれにESDを用いる。モノポ

ーラスネアまたはバイポーラスネアを用いて高周波電流を通じて摘除した。ホットパイオプシーやコールドポリペクトミーは使用しなかった。

<統計処理>

追跡期間は手術拒否後の初回の大腸内視鏡検査日から最近の大腸内視鏡検査日までの日数とした。

対象者の総追跡人年を算出し、ポアソン分布を前提とした「R」のスク립トで信頼区間を計算した。

C. 研究結果

2001年9月から2012年1月までに担当医師を受診して、手術を拒否し、内視鏡的ポリープ摘除を希望した患者は90人であった。来院時の年齢は18歳から68歳、平均30.9歳（標準偏差11.5）、男性46人である。

内視鏡検査回数は最少2回、最多19回、平均8.7回（標準偏差3.5）であった。ポリープ摘除数は最少10個、最多2,155個、平均618.9個（標準偏差489.1）であった。累積総ポリープ摘除数は55,701個であった。追跡期間は最短286日、最長4,145日（11.4年）、平均1968日（5.4年、標準偏差985）、総追跡人年は484.9人年であった。

手術を拒否後、大腸内視鏡検査にて大腸がんが発見されたのは5例8病変であった。すべて粘膜内がんであり、その後の大腸内視鏡検査で局所再発は認めなかった。追跡中に大腸ポリープが密生型になったため大腸全摘・回腸直腸吻合術を行った例が2例あった。経過観察中にリンパ節転移や肝転移、デスモイドの発生は1例も認めていない。

対象者の総追跡人年484.9人年より、岩間ら

の報告（Iwama T. et al. Int J Clin Oncol. 2004 Aug;9:308-16）を用いてポアソン分布を前提とした「R」のスク립トで信頼区間を計算した。99%信頼区間は0.000～0.109となり、岩間らの報告の「10年で12%」の発がん率をまたいでいないため、1%有意で岩間らのデータより低値と判断した。

D. 考察

FAPは大腸がん高危険度疾患であるが、FAPに多発する大腸腺腫から大腸がんが発生すると考えられるため、理論的には、内視鏡的に腺腫を摘除することにより大腸がんを予防できる可能性は考えられるが、これまでにこのような多数の患者を集計した報告はない。

本治療法は大腸を摘除していないため、患者の排便などに影響がなく、また、デスモイドの発生も認めておらず、患者のQOLは極めて良好であると言える。さらに、ほとんどの患者は外来治療のため、仕事などへの支障も軽度である。

大腸内視鏡検査にて腺腫を摘除して経過をみることのリスクとしては、内視鏡的治療による出血や穿孔、大腸がんの見落とし、急激な腺腫の増大による発がん、腺腫を経ないde novoがん発生の可能性などが考えられるが、現在までにそのような症例は認めていない。しかしながら、このデータは多施設の多くの医師に認知された方法ではないため一般化のためには、多施設の共同研究が必要である。

そのため、2013年より全国31施設によるFAP患者に対するポリープ徹底的摘除試験（J-FAPP StudyIII）を行っており、多施設、多数の内視鏡医で同様の結果が得られるかを検討しているとともに、本研究の成果をまとめている。

E. 結論

頻回の大腸内視鏡検査により大腸ポリープの徹底摘除を行った FAP 患者のデータを用いて、大腸がん罹患抑制効果を評価したところ、経過観察中に大腸がんの発生を認めなかった。このことより、大腸内視鏡によるポリープ摘除により、FAP 患者の大腸がん発生を予防できる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表（関連する業績を含む）

1. 論文発表

- 1) 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. The preventive effects of low-dose enteric-coated aspirin tablets on the development of colorectal tumours in Asian patients: a randomised trial. *GUT* 2014;63:1755-9.
- 2) Yamada H, Kawado M, Aoyama N, Hashimoto S, Suzuki K, Wakai K, Suzuki S, Watanabe Y, Tamakoshi A; JACC Study Group. Coffee consumption and risk of colorectal cancer: the Japan Collaborative Cohort Study. *J Epidemiol.* 2014;24:370-8.
- 3) Hishida A, Wakai K, Naito M, Suma S, Sasakabe T, Hamajima N, Hosono S, Horita M, Turin TC, Suzuki S, Kairupan TS, Mikami

H, Ohnaka K, Watanabe I, Uemura H, Kubo M, Tanaka H; J-MICC Study Group. Polymorphisms of genes involved in lipid metabolism and risk of chronic kidney disease in Japanese - cross-sectional data from the J-MICC study. *Lipids Health Dis.* 2014; 14:13:162.

- 4) Hara M, Nakamura K, Nanri H, Nishida Y, Hishida A, Kawai S, Hamajima N, Kita Y, Suzuki S, Mantjoro EM, Ohnaka K, Uemura H, Matsui D, Oze I, Mikami H, Kubo M, Tanaka H; Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. Associations between hOGG1 Ser326Cys polymorphism and increased body mass index and fasting glucose level in the Japanese general population. *J Epidemiol.* 2014;24:379-84.
- 5) Katsuura-Kamano S, Uemura H, Arisawa K, Yamaguchi M, Hamajima N, Wakai K, Okada R, Suzuki S, Taguchi N, Kita Y, Ohnaka K, Kairupan TS, Matsui D, Oze I, Mikami H, Kubo M, Tanaka H. A polymorphism near MC4R gene (rs17782313) is associated with serum triglyceride levels in the general Japanese population: the J-MICC Study. *Endocrine.* 2014;47:81-9.
- 6) Suzuki S, Kojima M, Tokudome S, Mori M, Sakauchi F, Wakai K, Fujino Y, Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi K, Tamakoshi A. Obesity/weight gain and breast cancer risk: findings from the Japan collaborative cohort study for the evaluation of cancer risk. *J Epidemiol.* 2013;23:139-45.

2. 学会発表

- 1) Suzuki S, Hosono A, Shibata K, Arai K, Tsujimura S, Oka K, Fujita H, Okamoto N, Kamiya M, Kondo F, Katagiri T, Wakabayashi R, Kojima M. The impact of serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations on bone density 第25回日本疫学会学術総会, 2015年1月21-23日, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

臨床試験実施及びデータ解析

－ J-FAPP Study IV に関するパイロット研究 －

担当責任者 中島 健 所属名 独立行政法人 国立がん研究センター
中央病院
役職名 医員

研究要旨

J-FAPP Study IV では、多施設研究において FAP 患者における 5 mm 以下の腸ポリープに対する内視鏡的徹底的摘除を実施し、そのエントリー後に、アスピリン/5-aminosalicylic acid 製剤といったがん化学予防剤候補物質を組み合わせる二重盲検無作為割付臨床試験を行うことに成っている。そのパイロット試験として、5-aminosalicylic acid 製剤の FAP 患者の大腸ポリープに対する無作為割り付け試験の実施可能性の検討を行った。これまでの潰瘍性大腸炎合併 FAP 症例の経過の成果を加えて検討すると、J-FAPP Study IV においては用量 2 g/日ならば FAP 患者においてもペンタサは安全に使えることが示唆された。

A. 研究目的

家族性大腸腺腫症（familial adenomatous polyposis: FAP）は大腸に多数の腺腫、更にはがんが生じる大腸がん超高危険度遺伝性疾患であるが、潰瘍性大腸炎（Ulcerative colitis: UC）との合併例はほとんど報告がない。最近、UC 合併 FAP 患者に対し、UC 治療薬である 5-aminosalicylic acid 製剤（5-ASA 製剤、ペンタサ）を 2 g/日投与したところ、大腸腺腫のサイズが縮小安定化した例を経験したため、FAP 患者における時間依存性放出 5-ASA 製剤の安全性試験（第 I 相試験＋第 II 相前期試験）として、ペンタサの FAP 患者の大腸ポリープに対する無作為割り付け試験の実施可能性の検討を行うこととした。

B. 研究方法

<試験概要>

参加者：6名（男性：女性＝1：1）

投与期間：6ヶ月間

投与量：ペンタサ錠（4 g/day）

エンドポイント：有害事象の有無、（投与前後の腸ポリープ変化）

<写真判定の方法>

無作為にモニター 2 台に薬剤前後の写真を映し出し、大腸内視鏡熟練者 3 名のうち 2 名以上の所見が一致したものを最終判定とした。3 名の判定が異なるものは「不変」に分類した。

（倫理面への配慮）

本研究は、厚生労働省や関連学会等が示す指針に従って実施する。倫理委員会の承認を得てから試験を開始する。参加呼びかけは面接により行い、インフォームドコンセントを得た場合、書面により記録を残す。参加を拒否しても一切の不利益を受けないこと、いつでも参加同意を取り消す権利を持つことなどを説明する。すべての個人情報や研究データは厳重な管理のもとに置き、守秘を徹底する。

C. 研究結果

明らかにペンタサに起因する重篤事象はなかったが、下記の事例を経験した

<事例1>

男性（40才台）

服用後、高熱（WBC低下無し）。

投薬中止し、解熱後投与再会したが、発熱なく試験完遂。

<事例2>

女性（30才台）

服用1ヶ月後、WBC低下（3,000台）。

減量（2 g/day）後、WBC数不変のまま試験完遂。

写真判定の結果、ペンタサの投与によって内視鏡的評価部位の9/24において大腸ポリープ数の減少が認められた。しかし、内視鏡的評価部位の10/24において大腸ポリープ数の増加が認められた。また、ポリープのサイズにおいては、内視鏡的評価部位の16/24において不変であった。

D. 考察

ペンタサの体内吸収率は低く、ほとんどは腸管に直接働く（剤形はpH7以上になることで崩壊）が知られており、一般的にその安全性は高いと考えられている。ペンタサの添付文章における副作用発生頻度を見ると、用法・用量追加承認時の臨床試験及び製造販売後調査における安全性解析対象症例2,531例中、白血球上昇

は18例（0.71%）であり、発熱や白血球減少は0.1%～1%未満であるとされている。本試験で経験した2例とペンタサとの因果関係は明らかではないが、これまでのFAP+UC症例の経過を加味すると本試験の半量（2g/日）ならばFAP患者においてもペンタサは安全に使える可能性が考えられた。

ペンタサの大腸ポリープに対する効果は十分に確認することは出来なかったが、それは、内視鏡的大腸腺腫の摘除が十分に行われている患者が対象であったため、ポリープの数が少なく勝つサイズが小さいためと考えられ、今後ある程度の大きさのポリープのあるFAP患者を対象にペンタサの効果を確かめる必要があると考えられた。

E. 結論

多施設研究において5 mm以下の腸ポリープに対する内視鏡的徹底的摘除を実施（J-FAPP Study III）し、そのエントリー後に、アスピリン/5-aminosalicylic acid製剤といったがん化学予防剤候補物質を組み合わせる二重盲検無作為割付臨床試験を開始する計画の立案に際し、本研究は、投与の用量を決定するパイロット試験の価値があったと考えられた。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表（関連する業績を含む）

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

臨床試験実施および新規がん化学予防剤の抽出に関する研究

担当責任者 高山哲治 所属名 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部
役職名 教授

研究要旨 同意の得られた家族性大腸腺腫症(Familial adenomatous polyposis; FAP)患者を対象に、小腸カプセル内視鏡検査を施行し、小腸の腺腫やがんの発生頻度を解析した。FAP 患者 25 例中 16 例(64%)にポリープ(腺腫)を認めた。腺腫数は2~120個(平均 40.3±14.6 個)、大きさは1~30mmであった。病理組織学的にはいずれも腺腫であったが、1例に高度異形腺腫を認めた。以上より、FAP においては、今回の症例ではがんを認めなかったものの、発がんポテンシャルを有する病変が多数認められた。一方、散发性腺腫症例を対象に、大腸拡大内視鏡下に aberrant crypt foci (ACF) を生検採取し、in vitro でクルクミン、クウオセチンなどの化合物を添加してアポトーシス誘導効果を検討した。その結果、クルクミン 0 μ M, 100 μ M, 300 μ M 添加群では、それぞれ 5.3±1.2, 18.6±2.7%, 35.7±4.1%と容量依存的にアポトーシスを認めた。しかし、クウオセチン添加群では軽度のアポトーシスを認めるのみであった。これらの結果より、クルクミンには有意なアポトーシス誘導効果が認められ、大腸がん予防試験の候補薬に成り得ると考えられた。

A. 研究目的

大腸がん超高危険群である家族性大腸腺腫症 (Familial adenomatous polyposis; FAP) 患者では、大腸腺腫のみならず多数の小腸腺腫を発生することから、小腸がんの発生も少なからず報告されている。そこで、本研究では FAP 患者を対象に小腸カプセル内視鏡検査を施行し、小腸腺腫及びがんの発生頻度を評価する。一方、これまで FAP 患者を対象に、種々の発がん予防候補薬の有効性を調べる臨床試験が行われてきたが、未だにコンセンサスの得られた予防薬は開発されていない。われわれはこれまで、拡

大内視鏡を用いて大腸微小病変である aberrant crypt foci (ACF) を観察し、ACF が大腸腺腫の前病である可能性を指摘した。そこで本研究では、散发性腺腫患者より生検採取した ACF 組織を in vitro で培養し、ポリフェノール的一种であるクルクミン、クウオセチンなどの ACF に対する抑制効果を検討し、大腸がんの予防に有効な薬剤となり得るかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) FAP 患者における小腸腺腫及びがんの発生頻度の検討

FAP 患者を対象にカプセル内視鏡検査 (PillCam, SB3, ギブニイメージング) を施行し、小腸におけるポリープ (腺腫) やがんの数、大きさ及び病理組織学的評価を行った。また、1cm 以上のポリープに関しては、ダブルバルーン小腸内視鏡検査を行い、内視鏡治療を行うとともに病理組織学的評価を行った。さらに、FAP 患者における APC 遺伝子を解析し、小腸病変との関係性を評価した。

2) ACF 組織を用いたアポトーシス誘導効果の検討

同意の得られた散発性大腸腺腫症例を対象に、拡大内視鏡下に ACF を生検採取し、*in vitro* でクルクミン、クウオセチンなどの化合物を添加してアポトーシス誘導効果を検討した。アポトーシスの評価は、TUNEL 染色を行い、陽性細胞の割合を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号) を遵守して行われ、予め徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行われた (2013-03-25)。また、APC 遺伝子解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守して行われ、当院のヒトゲノム委員会の承認を得て行われた (H25-49)。

C. 研究結果

1) FAP 患者における小腸腺腫及びがんの発生頻度の検討

FAP 患者 25 例を対象に小腸カプセル内視鏡検査を行ったところ、16 例 (64%) にポリープ (腺腫) を認めた。腺腫数は 2~120 個であり、平均 40.3 ± 14.6 個であった。大きさは、1~30mm であった。いずれも腺腫であり、このうち高度異形腺腫を 1 例 (大きさ 30mm) 認めた。がんは認

められなかった。APC 変異は 15 例で調べており、このうち 9 例 (60%) に変異を認めた。

2) ACF 組織を用いたアポトーシス誘導効果の検討

生検採取した ACF 組織 9 個にクルクミンを $0 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ (triplicate) 添加して 4 時間培養し、アポトーシスを評価した。TUNEL 陽性細胞は、それぞれ $5.3 \pm 1.2\%$, $18.6 \pm 2.7\%$, $35.7 \pm 4.1\%$ に認められた。同様に、ACF 組織 9 個にクウオセチンを $0 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$ 添加して培養し TUNEL 染色を行ったところ、TUNEL 陽性細胞はそれぞれ $5.0 \pm 0.7\%$, $9.6 \pm 2.2\%$, $10.5 \pm 3.4\%$ に認められた。

D. 考察

FAP 患者の約 64% に小腸腺腫を認め、多い症例では 120 個以上の小腸腺腫を認めた。がんは認められなかったものの、高度異形腺腫が認められ発がんポテンシャルを有すると考えられた。APC と小腸病変との関係については、今後症例数を蓄積して検討するべきである。一方、クルクミンは濃度依存的に ACF に対するアポトーシス誘導効果を認め、発がん予防薬に成りうると考えられた。クウオセチンはアポトーシス誘導効果を認めたが、クルクミンに比べて弱く、予防薬には適さない可能性がある。

E. 結論

FAP 患者では、大腸外病変として小腸腺腫を高率に有することが明らかとなった。一部に高度異形腺腫も認められることから、発がんポテンシャルを有すると考えられた。クルクミンにはアポトーシス誘導効果を認め、発がん予防の臨床試験を行うことが可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

とくに無し。

G. 研究発表（関連する業績を含む）

1. 論文発表

1) Inoue A, Okamoto K, Takayama T, et al. B-RAF mutation and accumulated gene methylation in aberrant crypt foci (ACF), sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) and cancer in SSA/P. Br J Cancer 2015; 112 (2):403-12.

2) Ohmoto T, Yoshitani N, Nishitsuji K, Takayama T, Yanagisawa Y, Takeya M, Sakashita N. CD44-expressing undifferentiated carcinoma with rhabdoid features of the pancreas: Molecular analysis of aggressive invasion and metastasis. Pathol Int 2015, in press.

3) Okada Y, Miyamoto H, Takayama T, et al. Biomarkers for predicting the efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody in the treatment of colorectal cancer. Digestion. 2014;89(1):18-23.

2. 学会発表

1) 田中久美子、六車直樹、高山哲治. 家族性大腸腺腫症における小腸内視鏡検査の有用性の検討. 第 56 回日本消化器病学会大会「ワークショップ」. 2014 年 10 月 26 日, 兵庫県神戸市.

2) 田中久美子, 六車直樹, 高山哲治, 佐藤康史, 加藤淳二. 家族性大腸腺腫症における小腸病変の検討. 第 2 回日本家族性大腸腺腫症研究会学術集会「シンポジウム」. 2014 年 11 月 6 日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

3. その他

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「大腸がん超高危険度群におけるがんリスク低減手法の最適化に関する研究」

機関名 独立行政法人 国立がん研究センター がん予防・検診研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所(学会等名)	発表した時期	国内・外の別
ラット若齢期乳腺に対する高脂肪食の影響と発がん促進(ポスター)	今井俊夫、打屋尚章、藤井元、武藤倫弘、高橋真美	第61回日本実験動物学会	2014年5月15-17日	国内
大腸がん幹細胞におけるビタミンD受容体の機能解析(ポスター)	寺崎将、三上唯、濱崎祐輔、前田紗菜恵、加藤雄也、武藤倫弘、増田園子	日本ビタミン学会第66回大会	2014年6月13-14日	国内
がん化学予防剤を用いた予防介入試験の集団への適用(口頭)	武藤倫弘	がん予防学術大会2014東京	2014年6月13-14日	国内
腸前がん病変由来細胞の長期培養方法の確立(ポスター)	尾沼若奈、中西るり、藤井元、清水聡美、石ヶ守里加子、武藤倫弘、高橋真美、今井俊夫、深井文雄	がん予防学術大会2014東京	2014年6月13-14日	国内
ゴマ由来成分 sesamol によるアラキドン酸カスケード及びPGE2関連分子の抑制(ポスター)	清水聡美、石ヶ守里加子、藤井元、小宮雅美、中西るり、尾沼若奈、矢野友啓、武藤倫弘	がん予防学術大会2014東京	2014年6月13-14日	国内
ポンカン果皮粉末によるazoxymethane誘発F344ラット大腸aberrant crypt foci生成の抑制(ポスター)	浅井大智、小林亜里子、中西るり、藤井元、清水聡美、尾沼若奈、石ヶ守里加子、武藤倫弘、高橋智、若林敬二	がん予防学術大会2014東京	2014年6月13-14日	国内
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(ポスター)	今井俊夫、打屋尚章、高橋真美、藤井元、武藤倫弘	がん予防学術大会2014東京	2014年6月13-14日	国内
Effect of cytokines on human primary hepatic stellate cell.(ポスター)	Inoue A, Obayashi K, Ogasawara F, Nakamura A, Ueno T, Fujii G, Mutoh M, Kuhara S, Tashiro K.	the FEBS-EMBO 2014 congress	30 August - 4 September 2014	国外
マウス膵臓発がんモデルにおけるA ⁺ アレルによる発がん促進とそのメカニズム(ポスター)	高橋真美、石ヶ守里加子、藤井元、武藤倫弘、今井俊夫	第1回NCGM-NCC研究所合同リトリート	2014年9月1-3日	国内
乳腺組織に対する高レプチン血症の影響(ポスター)	今井俊夫、打屋尚章、武藤倫弘、藤井元、高橋真美	第29回発癌病理研究会	2014年9月1-3日	国内
炭酸脱水素酵素による腸発がん抑制(ポスター)	武藤倫弘、中西るり、尾沼若奈、清水聡美、藤井元	第29回発癌病理研究会	2014年9月1-3日	国内
Inhibition of intestinal polyp formation in Min mice by acetazolamide.(口頭)	Mutoh M, Takahashi M, Ishigamori R, Shimizu S, Onuma W, Imai T, Fujii G.	第73回日本癌学会総会	2014年9月25-27日	国内

Sesamol suppresses COX-2 transcriptional activity via inhibition of NADPH oxidases in colon cancer cells. (ポスター)	Shimizu S, Ishigamori R, Fujii G, Takahashi M, Onuma W, Yano T, Mutoh M.	第73回日本癌学会総会	2014年9月25-27日	国内
Long-term culture method for precancerous lesion-derived cells. (ポスター)	Onuma W, Fujii G, Shimizu S, Ishigamori R, Takahashi M, Imai T, Fukai F, Mutoh M.	第73回日本癌学会総会	2014年9月25-27日	国内
Agoutiによるマウス膵臓がん促進メカニズム(口頭)	高橋真美、石ヶ守里加子、藤井元、武藤倫弘、今井俊夫	第73回日本癌学会総会	2014年9月25-27日	国内
高脂肪食によるラット乳腺がんの促進に対する細胞接着分子の関与(ポスター)	今井俊夫、藤井元、武藤倫弘、高橋真美	第73回日本癌学会総会	2014年9月25-27日	国内
ビタミンD受容体ノックダウンは大腸がん幹細胞様細胞の成長を阻害する(ポスター)	寺崎将、武藤倫弘、増田園子	第73回日本癌学会総会	2014年9月25-27日	国内
ドラッグリポジショニングによる大腸がん予防(口頭)	武藤倫弘	第42回日本潰瘍学会	2014年10月31日-11月1日	国内
低線量放射線の長期暴露がマウス大腸科学発がんに及ぼす影響(口頭)	谷中昭典、武藤倫弘	第42回日本潰瘍学会	2014年10月31日-11月1日	国内
Acetazolamideによる腸がん抑制(ポスター)	武藤倫弘、藤井元、高橋真美、中西るり、尾沼若奈、清水聡美	第8回国際消化器癌発生会議	2014年11月13,14日	国内
ゴマ由来成分セサモールによる腸がん抑制機構(第2報)(ポスター)	清水聡美、石ヶ守里加子、藤井元、高橋真美、中西るり、尾沼若奈、矢野友啓、武藤倫弘	第8回国際消化器癌発生会議	2014年11月13,14日	国内
Irsogladine maleateによるマウス腸がん抑制効果(ポスター)	尾沼若奈、藤井元、高橋真美、中西るり、石ヶ守里加子、清水聡美、深井文雄、武藤倫弘	第8回国際消化器癌発生会議	2014年11月13,14日	国内
Suppression of intestinal carcinogenesis in Apc-mutant mice by the citrus limonid (ポスター)limonin.	Shimizu S, Fujii G, Nakanishi R, Onuma W, Mutoh M, Yano T.	The 38 th Annual Scientific Meeting, Nutrition Society of Australia.	Nov.26-28,2014	国外
The impact of serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations on bone density	Suzuki S, Hosono A, Shibata K, Arai K, Tsujimura S, Oka K, Fujita H, Okamoto N, Kamiya M, Kondo F, Katagiri T, Wakabayashi R, Kojima M.	第25回日本疫学会学術総会	2015年1月21-23日	国内
家族性大腸腺腫症における小腸内視鏡検査の有用性の検討	田中久美子、六車直樹、高山哲治	第56回日本消化器病学会大会	2014年10月26日	国内
家族性大腸腺腫症における小腸病変の検討	田中久美子、六車直樹、高山哲治、佐藤康史、加藤淳二	第2回日本家族性大腸腺腫症研究会学術集会	2014年11月6日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Intestinal Peyer's patches prevent tumorigenesis in <i>Apc^{Min/+}</i> mice.	Fujimoto K, Fujii G, Sakurai H, Yoshitome H, <u>Mutoh M</u> , Wada M.	J Clin Biochem Nutr 56:43-8	2015	国外
Involvement of NADPH oxidases in suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activities by sesamol.	Shimizu S, Ishigamori R, Fujii G, Takahashi M, Onuma W, Terasaki M, Yano T, <u>Mutoh M</u> .	J Clin Biochem Nutr.	in press	国外
Candesartan suppresses intestinal carcinogenesis partly through inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 expression.	Takasu S, Fujii G, Takahashi M, Onuma K, Yamamoto M, <u>Mutoh M</u> .	J Cancer Sci and Clin Res.	in press	国外
Colorectal cancer prevention by the way of drug repositioning	<u>Mutoh M</u> , Fujii G, Miyamoto S, Nakanishi R, Miura A, Sasazuki S.	Ulcer Res.	in press	国外
Sesamol suppresses cyclooxygenase-2 transcriptional activity in colon cancer cells and modifies intestinal polyp development in <i>ApcMin/+</i> mice.	Shimizu S, Fujii G, Takahashi M, Nakanishi R, Komiya M, Shimura M, Noma N, Onuma W, Terasaki M, Yano T, <u>Mutoh M</u> .	J Clin Biochem Nutr 54:95-101	2014	国外
Bi-directional regulation between adiponectin and plasminogen activator-inhibitor-1 in 3T3-L1 cells.	Komiya M, Fujii G, Takahashi M, Shimura M, Noma N, Shimizu S, Onuma W, <u>Mutoh M</u> .	IN VIVO 28:13-19	2014	国外
Pancreatic fatty infiltration serves as a risk factor for pancreatic cancer, independently of obesity and diabetes.	Hori M, Takahashi M, Hiraoka N, Yamaji T, <u>Mutoh M</u> , Ishigamori R, Furuta K, Okusaka T, Shimada K, Kosuge T, Kanai Y and Nakagama H.	Clin Transl Gastroenterol. 5:e53	2014	国外
Potential of drug repositioning for colorectal cancer prevention: Inhibition of colorectal polyp recurrence by aspirin.	<u>Mutoh M</u> , Fujii G.	BioIndustry 31:29-34	2014	国内
Potential ability of xanthophylls to prevent obesity-associated cancer.	Terasaki M, <u>Mutoh M</u> , Fujii G, Takahashi M, Ishigamori R, Masuda S.	World J Pharmacol 3:140-52	2014	国外

<p>The preventive effects of low-dose enteric-coated aspirin tablets on the development of colorectal tumours in Asian patients: a randomised trial.</p>	<p>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.</p>	<p>GUT 63:1755-9</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>Factors associated with technical difficulties and adverse events of colorectal endoscopic submucosal dissection: retrospective exploratory factor analysis of a multicenter prospective cohort</p>	<p>Takeuchi Y, Iishi H, Tanaka S, Saito Y, Ikematsu H, Kudo S, Sano Y, Hisabe T, Yahagi N, Saitoh Y, Igarashi M, Kobayashi K, Yamano H, Shimizu S, Tsuruta O, Inoue Y, Watanabe T, Nakamura H, Fujii T, Uedo N, Shimokawa T, Ishikawa H, Sugihara K</p>	<p>Int J Colorectal Dis 29: 1275-84</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>Potential perioperative advantage of colorectal endoscopic submucosal dissection versus laparoscopy-assisted colectomy.</p>	<p>Nakamura F, Saito Y, Sakamoto T, Otake Y, Nakajima I, Yamamoto S, Murakami Y, Ishikawa H, Matsuda T</p>	<p>Surgical Endoscopy 29: 596-606</p>	<p>2015</p>	<p>国外</p>
<p>Randomized controlled trial comparing gastric cancer screening by gastrointestinal X-ray with serology for Helicobacter pylori and pepsinogens followed by gastrointestinal endoscopy.</p>	<p>Gotoda T, Ishikawa H, Ohnishi H, Sugano K, Kusano C, Yokoi C, Matsuyama Y, Moriyasu F</p>	<p>Gastric Cancer</p>	<p>in press</p>	<p>国外</p>
<p>Study design and patient recruitment of the Japan polyp study.</p>	<p>Sano Y, Fujii T, Matsuda T, Oda Y, Kudo S, Igarashi M, Iishi H, Kaneko K, Hotta K, Kobayashi N, Yamaguchi Y, Kobayashi K, Ishikawa H, Murakami Y, Shimoda T, Fujimori T, Ajioka Y, Taniguchi H, Ikematsu H, Konishi K, Saito Y, Yoshida S</p>	<p>J Clin Trials 6:37-44</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>

Diagnostic performance and limitations of magnifying narrow-band imaging in screening endoscopy of early gastric cancer: a prospective multicenter feasibility study.	Yao K, Doyama H, Gotoda T, <u>Ishikawa H</u> , Nagahama T, Yokoi C, Oda I, Machida H, Uchita K, Tabuchi M	Gastric Cancer 17(4):669-79	2014	国外
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.	Yamada S, Doyama H, Yao K, Uedo N, Ezoe Y, Oda I, Kaneko K, Kawahara Y, Yokoi C, Sugiura Y, <u>Ishikawa H</u> , Takeuchi Y, Saito Y, Muto M.	Gastrointest Endosc 79(1):55-63	2014	国外
Coffee consumption and risk of colorectal cancer: the Japan Collaborative Cohort Study	Yamada H, Kawado M, Aoyama N, Hashimoto S, Suzuki K, Wakai K, <u>Suzuki S</u> , Watanabe Y, Tamakoshi A; JACC Study Group	J Epidemiol 24:370-8	2014	国外
Polymorphisms of genes involved in lipid metabolism and risk of chronic kidney disease in Japanese - cross-sectional data from the J-MICC study	Hishida A, Wakai K, Naito M, Suma S, Sasakabe T, Hamajima N, Hosono S, Horita M, Turin TC, <u>Suzuki S</u> , Kairupan TS, Mikami H, Ohnaka K, Watanabe I, Uemura H, Kubo M, Tanaka H; J-MICC Study Group	Lipids Health Dis. 14:13:162	2014	国外
Associations between hOGG1 Ser326Cys polymorphism and increased body mass index and fasting glucose level in the Japanese general population.	Hara M, Nakamura K, Nanri H, Nishida Y, Hishida A, Kawai S, Hamajima N, Kita Y, <u>Suzuki S</u> , Mantjoro EM, Ohnaka K, Uemura H, Matsui D, Oze I, Mikami H, Kubo M, Tanaka H; Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group	J Epidemiol. 24:379-84	2014	国外

A polymorphism near MC4R gene (rs17782313) is associated with serum triglyceride levels in the general Japanese population: the J-MICC Study.	Katsuura-Kamano S, Uemura H, Arisawa K, Yamaguchi M, Hamajima N, Wakai K, Okada R, Suzuki S, Taguchi N, Kita Y, Ohnaka K, Kairupan TS, Matsui D, Oze I, Mikami H, Kubo M, Tanaka H.	Endocrine 47:81-9	2014	国外
Obesity/weight gain and breast cancer risk: findings from the Japan collaborative cohort study for the evaluation of cancer risk.	Suzuki S, Kojima M, Tokudome S, Mori M, Sakauchi F, Wakai K, Fujino Y, Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi K, Tamakoshi A.	J Epidemiol. 23:139-45	2014	国外
B-RAF mutation and accumulated gene methylation in aberrant crypt foci (ACF), sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) and cancer in SSA/P.	Inoue A, Okamoto K, Fujino Y, Nakagawa T, Muguruma N, Sannomiya K, Mitsui Y, Takaoka T, Kitamura S, Miyamoto H, Okahisa T, Fujimori T, Imoto I, Takayama T,	Br J Cancer 112 (2):403-12	2015	国外
CD44-expressing undifferentiated carcinoma with rhabdoid features of the pancreas: Molecular analysis of aggressive invasion and metastasis.	Ohmoto T, Yoshitani N, Nishitsuji K, Takayama T, Yanagisawa Y, Takeya M, Sakashita N.	Pathol Int	in press	国外
Biomarkers for predicting the efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody in the treatment of colorectal cancer.	Okada Y, Miyamoto H, Goji T, Takayama T.	Digestion 89(1):18-23	2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

Intestinal Peyer's patches prevent tumorigenesis in *Apc*^{Min/+} mice

Kyoko Fujimoto,¹ Gen Fujii,² Hitomi Sakurai,¹ Hiroko Yoshitome,¹ Michihiro Mutoh² and Morimasa Wada^{1,*}

¹Division of Molecular Biology, Nagasaki International University, 2825-7 Huis Ten Bosch, Sasebo-shi, Nagasaki 859-3298, Japan

²Division of Cancer Prevention Research, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

(Received 5 September, 2014; Accepted 16 September, 2014; Published online 28 November, 2014)

Peyer's patches are nodules that play a central role in intestinal immunity. Few studies demonstrate the relationship between the number of Peyer's patches and intestinal polyps. Here we identify a statistically significant inverse correlation between the quantity of Peyer's patches and of the development of intestinal polyps in *Apc*^{Min/+} mice, which are a useful model to clarify the role of Peyer's patches in intestinal tumorigenesis. Using this model, we increased the number of Peyer's patches using 0.1% and 1% corn husk arabinoxylan through feed. Intestinal polyp formation significantly decreased, concomitant with an increase in Peyer's patches development ($n = 12/\text{group}$). In *Aly*^{-/-}*Apc*^{Min/+} mice (negative control; no Peyer's patches) there was no change in the amount of intestinal polyps ($n = 10/\text{group}$). Immune reaction following corn husk arabinoxylan treatment was measured by cytokine array. Increasing the number of Peyer's patches decreased interleukin-17 production, which showed a dose dependent correlation with transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor. This study identified a relationship between levels of Peyer's patches and intestinal polyp formation, partly explained by the involvement of interleukin-17 production and β -catenin signaling in *Apc*^{Min/+} mice.

Key Words: Peyer's patch, corn husk arabinoxylan, intestinal polyp, cancer prevention, *Apc*^{Min/+} mouse

Colorectal cancer is the third most common malignant neoplasm worldwide and the first leading cause of cancer deaths (irrespective of gender) in Japan.⁽¹⁾ According to the Ministry of Health, Labour and Welfare, the colorectal cancer mortality rate has increased from 1955 to the present.⁽²⁻⁴⁾ Thus, relationship between food and intestinal tumors has generated attention because it is proposed that this disease is not only caused by hereditary factors but also environmental factors like change in diet.

Nutritive and foreign substances, such as germs, simultaneously enter the intestinal tract. The gut immune system normally protects against foreign invasion.⁽⁵⁾ Peyer's patches (PP) are a central lymphoid organs of this immune response mechanism in the intestines, and several important reports demonstrate an association between PP and allergy, intestinal bacteria, etc.⁽⁶⁻⁹⁾ However, few studies address whether or not PPs are linked to intestinal tumorigenesis and an underlying mechanism has not been elucidated.

The *adenomatous polyposis coli* (*Apc*) Min heterozygous knockout (*Apc*^{Min/+}) mouse, lacking a functional *Apc* gene product, is a model of human familial adenomatous polyposis, which spontaneously generates numerous intestinal polyps.⁽¹⁰⁻¹²⁾

In this study, we observed an inverse relationship between the number of PP and intestinal polyps in *Apc*^{Min/+} mice. Therefore, we artificially increased the amount of PP in murine intestines using corn husk arabinoxylan (CHAX) as an adjuvant. We examined the

effects of PP development on intestinal polyps following ingestion of CHAX in *Apc*^{Min/+} and *Aly*^{-/-}*Apc*^{Min/+} mice, which have no PP in the intestine.⁽¹³⁾ Furthermore, we tried to clarify the molecular mechanism for the prevention of polyp formation in the mice.

Materials and Methods

Mice and feed. Wild type (WT; C57B1/6J) mice and *alymphoplasia* knockout (*Aly*^{-/-}, C57B1/6J) mice, were obtained from Clea Japan, Inc. (Tokyo, Japan). The *Apc*^{Min/+} (C57B1/6J) mice were supplied by Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, State). The mice were maintained under specific pathogen-free conditions at the Animal Center of Nagasaki International University. (Nagasaki, Japan) Female *Apc*^{Min/+} and male *Aly*^{-/-} mice were mated to obtain *Aly*^{+/-}*Apc*^{Min/+} mice. The mouse feed was compounded with two different doses of CHAX (NIHON SHOKUJIN KAKO CO., LTD, Tokyo, Japan): 0.1 and 1% mixed (i.e., 0.2 and 2 g/kg (body weight)/day each). Preparation of CHAX is described elsewhere.⁽¹⁴⁾ According to standard dietary intake guidelines provided by The Ministry of Health, Labour and Welfare, we calculated the appropriate dose for mice. We analyzed 10–12 mice in each feeding group: CHAX-free, 0.1, and 1% CHAX for each genotype (WT, *Apc*^{Min/+}, and *Aly*^{-/-}*Apc*^{Min/+}). Approximately 100 mice were used in the ingestion experiment. Mice were sacrificed at 12, 24, and 32 weeks of age for the analysis of intestinal polyps and PP. All animal experiments were conducted according to the Guidelines for Animal Experiments in the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University.

Genotyping. Mouse tails were genotyped using a Genomic DNA Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacture's protocol. Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) primers for the *Apc* gene were produced according to previously published methods.⁽¹⁵⁾ Forward and reverse primers for *Aly*^{-/-} mice had complimentary annealing temperatures and a product length of 302 base pairs. Genomic DNA was used as a template for PCR to amplify fragments containing forward *Aly*_Wild 5'-CTGACATCCCGAGCTACTTCAACG, forward *Aly*_Mutant 5'-CTGACATCCCGAGCTACTTCAACA, and reverse 5'-GCCTAGGATCGGCCATTTTCTTCC primers using the AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, California, CA). Touchdown PCR consisted of one cycle of 94°C for 9 min for the initial denaturation step. This was followed by 10 cycles each of denaturation at 94°C for 1 min, varying annealing conditions for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. Annealing temperatures for the touchdown portion were as follows: starting annealing temperatures of 72°C decreasing by 0.5°C decrements

*To whom correspondence should be addressed.
E-mail: wadam@niu.ac.jp

per PCR cycle down to 67°C. Further 25 cycles consisted of the following: 94°C for 1 min, 68°C for 1 min, and 72°C for 1 min.

Counts of intestinal polyps and statistical analysis. Intestinal polyps and statistical analysis were examined according to previously published methods.⁽¹⁶⁾ All statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism 5 program. (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) The correlation coefficient of the number of PP and intestinal polyps were analyzed using Pearson's correlation coefficient. We analyzed of two-group by using Mann–Whitney *t* test, and three or more groups were analyzed simultaneously by using Dunnett Comparison test.

Cytokine array. Serum was collected from the heart when mice were dissected. We pooled serum samples from four WT mice fed with or without CHAX, respectively. Similarly, we pooled serum samples from *Apc*^{Min/+} or *Aly*^{+/+}*Apc*^{Min/+} mice and we analyzed using Multiplex Suspension Array (Genetic Lab Corp., Hokkaido, Japan) The total number of samples was six, and the experiment was repeated two times using new samples.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All serum samples were stored in a –80°C deep freezer until use. The levels of interleukin (IL)-17 were measured by IL-17 Mouse ELISA Kit (Abcam, Cambridge, UK), according to the manufacturer's protocol. We measured fluorescence using a Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA).

Quantitative real-time PCR analysis. All tissue samples from intestinal polyps of mice fed with or without CHAX were rapidly soaked in RNA later solution (Qiagen). Total RNA was isolated from tissue using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Complementary DNA (from reverse transcribed total RNA) and real-time PCR were examined according to previously published methods.⁽¹⁷⁾ Primers for mouse cyclin D1 (5'primer-CCATGG-AACACCAGCTCTG and 3'primer-CGGTCCAGGTAGTTC-ATGGC) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 5'primer-TGTCAGCAATGCCTGCA and 3'primer-TTACTCCTTGGAGGCCATGT) were employed. The expression levels of cyclin D1 were normalized based on GAPDH levels.

Histology and immunohistochemistry. Small intestines were fixed, embedded, and sectioned as Swiss rolls for further immunohistochemical examination with the avidin–biotin complex immunoperoxidase technique and monoclonal mouse anti-β-catenin antibody (Ab; BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ) at 100× dilution. The secondary Ab, biotinylated anti-mouse immunoglobulin G (Vector Laboratories, California, CA), was used at a 200× dilution. Staining was performed using avidin–biotin reagents (Vectastain ABC reagents; Vector Laboratories), 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide, and the sections were counterstained with hematoxylin to facilitate orientation. As a negative control, consecutive sections were immunostained without exposure to the primary Ab.

Reporter assays. Caco-2 cells were plated at a concentration of 5×10^5 cells/well in 12-well plates and cultivated for 24 h. Furthermore, cells were transfected with pTOP or pFOP-Flash (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) luciferase reporter plasmids (1.0 μg each) and Simian virus 40 (SV40)–RenillaLuc (pRL-SV40; 15:1 ratio) for 24 h. All samples were normalized for transfection efficiency using the SV40–RenillaLuc expression plasmid (Promega, Madison, WI) as a transfection control. Cells were harvested and lysed in 200 μl of lysis buffer 48 h after transfection. We measured four points using 20 μl of sample, and luciferase and Renilla luciferase activity were assayed using the Bright-Glo Luciferase Assay System and Renilla-Glo Luciferase Assay System respectively (Promega) using a GENios Microplate Reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Transfections were repeated three times.

After correction of measurements, we calculated the average of four measurements, and transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) activity was calculated by TOP divided by FOP. The relative transcriptional activity was calculated for

the aforementioned value was divided by the measurement of the control cell.

Results

The number of PP correlates significantly with the number of intestinal polyps in *Apc*^{Min/+} mice over 24 weeks in age.

We counted the number of intestinal polyps and PP in *Apc*^{Min/+} mice >24 weeks in age. Mice that developed many intestinal polyps tended to have been fewer PP in the intestine. A statistically significant inverse relationship existed between the number of intestinal polyps and PP ($r = -0.62$, $n = 20$, $p = 0.0035$; Fig. 1). In addition, the amount of PP in the intestines decreased in older mice groups (Fig. 2). The quantity of PP in the intestines was significantly reduced in *Apc*^{Min/+} mice >21 weeks of age compared with 12-week-old *Apc*^{Min/+} mice. Moreover, the number of polyps significantly increased in older mice groups.

CHAX increases the number of PP in *Apc*^{Min/+} mice. It remains unclear whether or not PP suppresses polyp formation, and what factors affect the development of each condition. However,

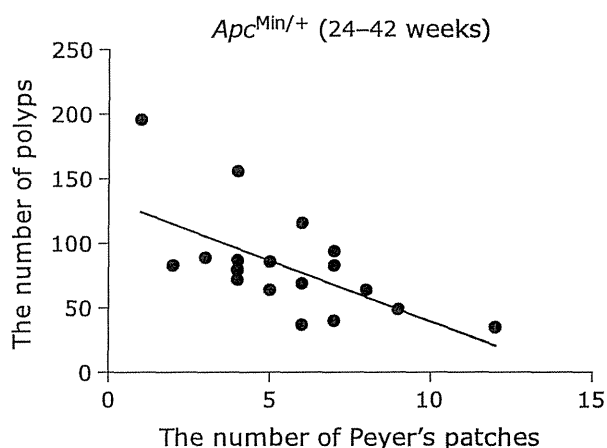


Fig. 1. The correlation between the number of intestinal polyps and Peyer's Patches ($r = -0.62$, $n = 20$, $p = 0.0035$).

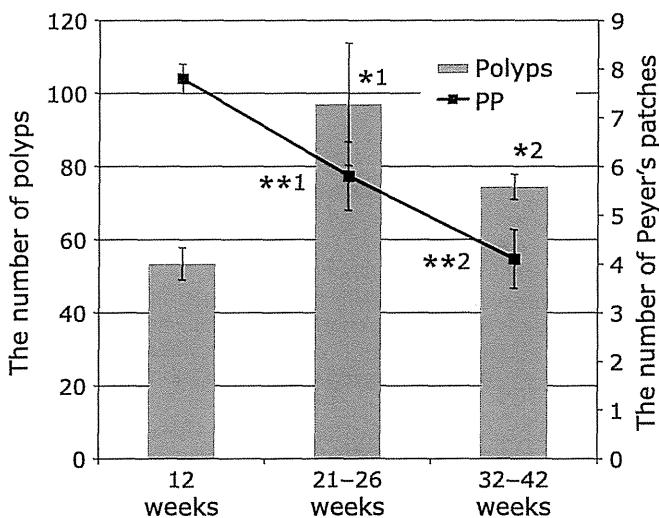


Fig. 2. The number of intestinal polyps and Peyer's Patches according to age. The *p* values are *1 = 0.0385 and *2 = 0.0046 for the number of polyps. The *p* values are **1 = 0.0099 and **2 = 0.0004 for the number of PP (Mann–Whitney *t* test). $n = 12$ per group.

Table 1. The number of PP in *Apc^{Min/+}* mice fed CHAX

CHAX dosage (%)	Small intestine			
	Proximal	Middle	Distal	Total
0	2.8 ± 0.3	1.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2	7.8 ± 0.3
0.1	3.0 ± 0.2	2.3 ± 0.2*	3.9 ± 0.3	9.3 ± 0.3**
1	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.3**	3.8 ± 0.3	9.5 ± 0.2***

Values are mean ± SEM ($n = 12/\text{group}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Mann–Whitney t test.

Table 2. The number of intestinal polyps in 12-week-old *Apc^{Min/+}* mice

CHAX dosage (%)	Small intestine				Large intestine	Total
	Proximal	Middle	Distal	Total		
0	3.9 ± 0.7	22.3 ± 2.2	27.2 ± 2.7	53.4 ± 4.4	0.5 ± 0.2	53.8 ± 4.3
0.1	2.1 ± 0.5	11.0 ± 1.6**	16.2 ± 2.3*	29.3 ± 3.8**	0.3 ± 0.2	29.6 ± 3.9**
1	3.0 ± 0.4	10.0 ± 1.7**	17.9 ± 2.5*	30.9 ± 3.3**	0.4 ± 0.2	31.3 ± 3.4**

Values are mean ± SEM ($n = 12/\text{group}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Mann–Whitney t test.

Table 3. The number of intestinal polyps in 12-week-old *Aly^{-/-}Apc^{Min/+}* mice (negative control group)

CHAX dosage (%)	Small Intestine				Large intestine	Total
	Proximal	Middle	Distal	Total		
0	4.3 ± 2.9	13.7 ± 1.6	11.3 ± 1.4	29.3 ± 2.9	0.2 ± 0.1	29.6 ± 3.0
0.1	2.0 ± 0.3	8.4 ± 1.6	10.6 ± 2.8	21.1 ± 3.7	0.1 ± 0.1	21.1 ± 3.7
1	3.4 ± 0.9	11.1 ± 3.2	11.3 ± 2.7	25.8 ± 5.9	0	25.8 ± 5.9

Values are mean ± SEM ($n = 10/\text{group}$).

Table 4. Serum cytokine levels in WT, *Apc^{Min/+}* and *Aly^{-/-}Apc^{Min/+}* mice fed with or without CHAX

	WT mice		Rate of change	<i>Apc^{Min/+}</i> mice		Rate of change	<i>Aly^{-/-}Apc^{Min/+}</i> mice		Rate of change
	– (without CHAX)	+ (with CHAX)		–	+		–	+	
IL-1 β (pg/ml)	<0.64	<0.64	—	4.38	<0.64	6.84	<0.64	<0.64	–
IL-5 (pg/ml)	10.68	4.37	2.44	8.58	7.11	1.21	22.64	129.94	5.74
IL-10 (pg/ml)	3.47	7.55	2.18	4.87	4.87	1	4.18	17.56	4.2
IL-17 (pg/ml)	3.86	1.05	3.68	3.24	0.93	3.48	<0.64	<0.64	—

The values are averages of extracted cytokines from double experiments of the cytokine array.

CHAX has been reported to increase the number of PP; therefore, we used this adjuvant to elucidate the effects of PP on polyp formation.

Mice were fed a diet of 0.1, 0.5, 1, or 4% CHAX to determine the optimal concentration that leads to the greatest volume of PP in WT mice. There were 7.7 ± 0.5 ($n = 14$) PP in 12-week-old WT mice administered 0.1% CHAX. The number significantly increased to 8.9 ± 0.5 when the mice were fed 0.5% CHAX and higher. ($p = 0.0246$, Mann–Whitney test) We chose the 0.1% and 1% concentrations of CHAX as optimal doses for PP formation. Furthermore, we fed 0.1% and 1% CHAX to *Apc^{Min/+}* and WT mice for 4 weeks. The number of PP significantly increased in the *Apc^{Min/+}* and WT groups (Table 1). Moreover, the number of intestinal polyps was significantly decreased in *Apc^{Min/+}* mice fed both 0.1% and 1% CHAX (Table 2). There were no significant differences between *Aly^{-/-}Apc^{Min/+}* mice fed or not fed CHAX (Table 3). *Aly^{-/-}Apc^{Min/+}* mice have no PP in the intestine.

Increasing the number of PP caused a decrease in IL-17 production. PP plays a central role in immunity; therefore, we examined the changes in cytokine levels in serum. We identified four cytokines, IL-1 β , IL-5, IL-10, and IL-17, in which concentration levels were increased or decreased more than three-fold (Table 4). IL-1 β and IL-17 levels in serum diminished when

Apc^{Min/+} mice were fed CHAX.

Using ELISA, we measured IL-17 concentration in the serum of *Apc^{Min/+}* mice fed or not fed CHAX based on the number of PP in the small intestine. IL-17 levels gradually decreased with increasing number of PP (Fig. 3).

CHAX leads to a decrease in polyp development through the β -catenin pathway. Furthermore, we examined immunohistochemical staining of paraffin-embedded intestinal polyps for β -catenin and proliferation cell nuclear antigen (PCNA). Although β -catenin is well known for accumulating in the nucleus of intestinal polyps in *Apc^{Min/+}* mice, this accrual was not observed in mice fed a 1% CHAX diet (Fig. 4a and b). In addition, the staining intensity of PCNA was weaker in mice fed 1% CHAX (Fig. 4c and d). Furthermore, we measured the messenger RNA expression level of cyclin D1, which is downstream of Wnt signaling, in intestinal polyps by quantitative real-time PCR. We found that the expression of cyclin D1 tended to decrease as CHAX concentration increased (Fig. 5).

IL-17 promotes TCF/LEF transcriptional activation *in vitro*. We examined TCF/LEF-dependent transcriptional activity after 24-h treatment with IL-17 in Caco-2 cell transfected with pTOP-Flash or pFOP-Flash and SV40-RenillaLuc, and differentiated with 5 mM sodium butyrate (Fig. 6). Caco-2 cells are an estab-

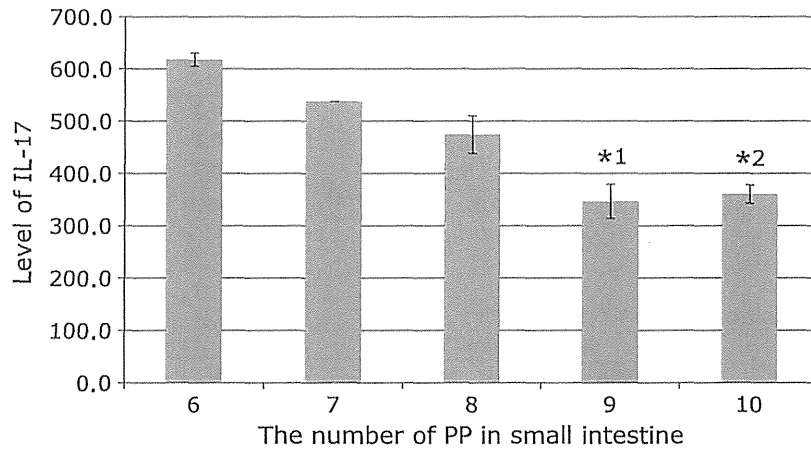


Fig. 3. The level of IL-17 in serum and the number of Peyer's Patches in 12-week-old *Apc*^{Min/+} mice. The *p* values are *1 = 0.0058 and *2 = 0.0294 for IL-17 levels compared in mice which have six Peyer's Patches (Mann-Whitney *t* test). *n* = 2, 2, 6, 8, and 5 from the left.

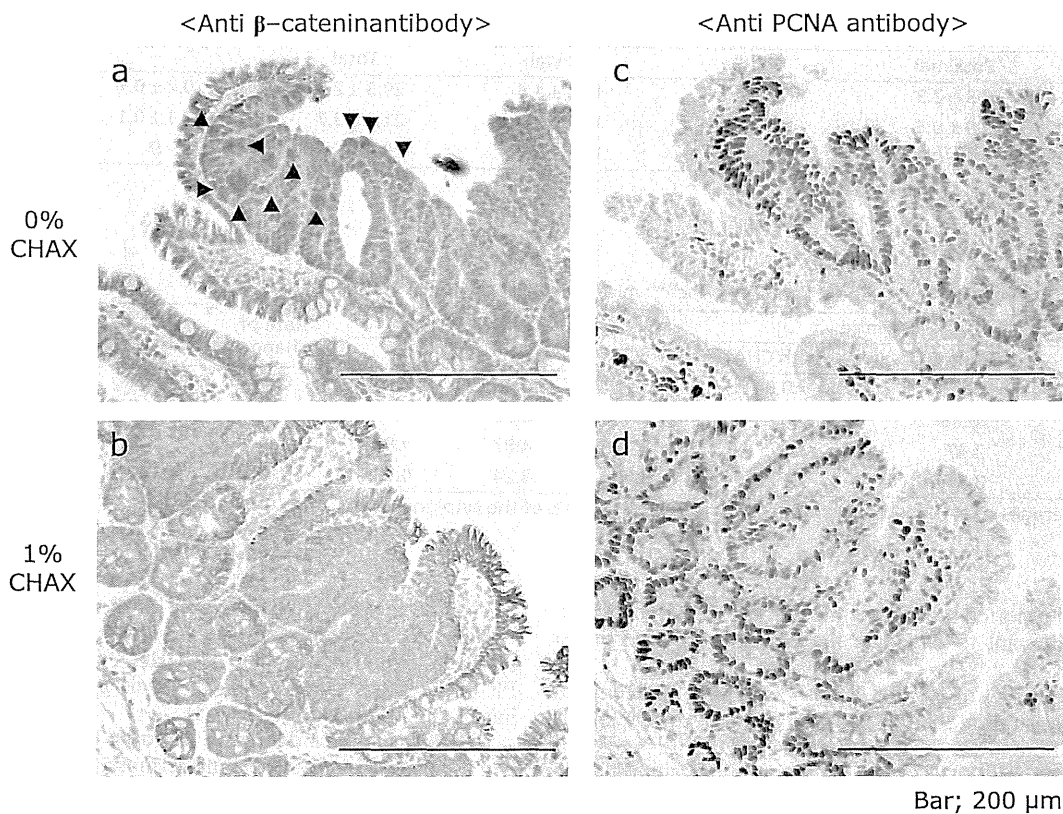


Fig. 4. Immunostaining of formalin-fixed paraffin-embedded polyps of the small intestine of *Apc*^{Min/+} mice fed with (b and d) or without (a and c) CHAX. ▼ shows β-catenin aggregation in the nucleus.

lished cell line derived from colorectal tumors with loss of *APC* gene function.

There was no significant increase in TCF/LEF-dependent transcriptional activity with 0.2 ng/ml of IL-17, but this was observed at 0.5 ng/ml ($p < 0.001$, Dunnett's multiple comparison test). TCF/LEF activity was activated by IL-17 in a dose-dependent manner. The control, 0.2, and 0.5 ng/ml IL-17 values for TOP/FOP were 1 ± 0.15 , 1.13 ± 0.03 , and 1.40 ± 0.12 , respectively.

Discussion

With continuing observation, we noticed that the number of intestinal polyps in *Apc*^{Min/+} mice varied. Usually, it is assumed that intestinal polyps appear in *Apc*^{Min/+} mice at 8 weeks of age, and we confirmed several polyps at this age. Furthermore, it is known that the number of polyps will increase with age; the life span of *Apc*^{Min/+} mouse is approximately 24 weeks because of bleeding caused anemia from intestinal polyps and other factors.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ We