

- 1) Oka S, Tanaka S, Nakadoi K, Asayama N, Chayama K. Endoscopic features and management of diminutive colorectal submucosal invasive carcinoma. *Dig Endosc* 26 (Suppl 2): 78-83, 2014
 - 2) Nakadoi K, Oka S, Tanaka S, Hayashi N, Terasaki M, Arihiro K, Shimamoto F, Chayama K. Condition of muscularis mucosae is a risk factor for lymph node metastasis in T1 colorectal carcinoma. *Surg Endosc* 28: 1269-76, 2014
 - 3) Hayashi N, Tanaka S, Nishiyama S, Terasaki M, Nakadoi K, Oka S, Yoshihara M, Chayama K. Predictors of incomplete resection and perforation associated with endoscopic submucosal dissection for colorectal tumors. *Gastrointest Endosc* 79: 427-35, 2014
 - 4) Oka S, Tanaka S, Chayama K. Detection of Nonpolypoid Colorectal Neoplasia Using Magnifying Endoscopy in Colonic Inflammatory Bowel Disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 24: 405-417, 2014 (Review)
 - 5) Takeuchi Y, Iishi H, Tanaka S, Saito Y, Ikematsu H, Kudo SE, 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. Factors associated with technical difficulties and adverse events of colorectal endoscopic submucosal dissection: retrospective exploratory factor analysis of a multicenter prospective cohort. *Int J Colorectal Dis* 29:1275-84, 2014
- 茶山一彰. 大腸 SM 癌に対する完全摘除生検としての ESD の意義【シンポジウム】. 福島市 (第 10 回日本消化管学会総会学術集会), 2014.2.14-2.15
 - 2) 田中信治. Progress of diagnostic and therapeutic colonoscopy 大腸内視鏡診断と治療の進歩【シンポジウム】. 横浜市 (第 73 回日本癌学会学術総会). 2014.9.26
 - 3) Asayama N, Tanaka S, Oka S, Shigita K, Nishiyama S, Hayashi N, Nakadoi K, Chayama K. Long-term outcomes after treatment for T1 colorectal carcinoma. Chicago (American Society for Gastrointestinal Endoscopy (ASGE) 2014 (DDW)). 2014.5.3-5.6
 - 4) 嶋田賢次郎, 田中信治, 岡 志郎, 林奈那, 茶山一彰. 治療成績と予後からみた高齢者に対する大腸 ESD の適応. 名古屋市 (第 81 回大腸癌研究会). 2014.7.4
 - 5) 田中信治. 早期大腸癌の診断と治療【教育講演】. 東京都 (第 111 回日本内科学会). 2014.4.11
- 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。

2. 学会発表

- 1) 朝山直樹, 田中信治, 岡 志郎, 中土井鋼一,

日本医療研究開発機構研究費(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)

「Historical controlとしての Japan Polyp Study のデータ整備および
大腸 NET 治療後前向き追跡研究に関する研究」

担当責任者 松田 尚久

所属名 国立がん研究センター中央病院 内視鏡科医長

<研究要旨>

革新的がん医療実用化研究事業(がん化学予防薬の実用化をめざした大規模臨床研究 J-CAPP Study II)における historical control 群(アスピリン非投与群)として選定した Japan Polyp Study (JPS) のデータ整備(クリーニング)を行った。その中から、J-CAPP Study II の比較対照群として 2,166 名(JPS 初回検査にて大腸腺腫性ポリープを有した患者)を抽出した。

また、J-CAPP Study II のエントリーグループをサポートするワーキンググループでの大腸 NET (Neuroendocrine tumor: 神経内分泌腫瘍) の前向きコホート研究実施に向けた体制作りを行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、革新的がん医療実用化研究事業(がん化学予防薬の実用化をめざした大規模臨床研究 J-CAPP Study II: 研究代表者 石川秀樹)において、historical control (アスピリン非投与群)として設定した Japan Polyp Study 対象者のデータ・クリーニングを行うことである。併せて、J-CAPP Study II のエントリーグループをサポートするワーキンググループによる、大腸 NET (Neuroendocrine tumor: 神経内分泌腫瘍) の多施設共同前向きコホート研究実施に向けた体制作りを目的とした。

B. 研究方法

<Japan Polyp Study: JPS>

JPS は、“ポリープ切除の大腸がん予防に及ぼす効果の評価と内視鏡検査間隔の適正化に関する

前向き臨床試験”であり、我が国が誇る内視鏡を基盤とした初めての大规模 RCT として平成 15 年より登録を開始した。以下に JPS の概略を示す。

【対象】 40 歳～69 歳の健常者

【目的】 大腸がん罹患の超高危険群(家族性大腸腺腫症・遺伝性非ポリポージス性大腸がん)を除く、全ての腫瘍性ポリープを摘除した対象者に対する全大腸内視鏡(TCS)の至適検査間隔期間について、1・3 年後に行う 2 回検査群と 3 年後のみに行う 1 回検査群とのランダム化比較試験によって評価する。尚、3 年後のランダム化比較試験評価後は、浸潤がんの発生頻度、予後に関する長期経過観察から探索的検討を行う。

【参加施設】: 全国 11 施設(国立がん研究センター中央病院・国立がん研究センター東病院・藤井隆広クリニック・昭和大学横浜市北部病院・昭和大学

病院・佐久総合病院・服部胃腸科・栃木県立がんセンター・静岡がんセンター・北里大学東病院・大阪成人病センター)

【方法】 1) 文書による同意取得、2) 1次 TCS により腫瘍性ポリープ全てを内視鏡摘除、データセンターに登録、3) 全例 1 年後に再検査(2 次 TCS)を行い、初回検査での見逃しを含めた全ての腺腫性ポリープの摘除を行いクリーンコロンとする。その後、データセンターから 2 回検査群(1・3 年後の検査)と、1 回検査群(3 年後に検査)の割り付け情報を入手、4) 経過観察中にみられる Index lesion: IL(10 mm 以上の上皮性腫瘍、高度異型腺腫、がん腫)の発見割合を 1 回検査群と 2 回検査群間で比較し、クリーンコロン施行後 3 年間で 2 回検査が必要か、3 年後の 1 回検査で十分かどうかを検証する。本研究の Primary endpoint は、IL の発見割合とし、1 回検査群の 3 年後に発見される IL 発生割合と、1 年と 3 年後の合計した IL 発生割合の両群間の比較試験を行ない、2%以内を許容範囲とした非劣性試験である。

平成 18 年 12 月をもって登録が完了し(最終登録者数:3,926 名)、すでに RCT 後の最終フォローアップ全大腸内視鏡検査(TCS)が全て完了している。現在、RCT 前後のデータ・クリーニングと集計・解析作業が進行中である。

<大腸 NET 多施設共同前向きコホート研究>

J-CAPP Study II のエントリーグループをサポートするワーキンググループにおいて、付置研究として実施する。大腸 NET (Neuroendocrine tumor: 神経内分泌腫瘍)は、一般的な大腸腫瘍(腺腫性ポリープやがん)と比べた場合、比較的稀な疾患と考えられてきたが、近年の内視鏡機器の開発と腸管前処置の改善等により、より早期の段階で発見される頻度が増え、内視鏡治療対象となる症例数が増加している。しかし、単施設データで集積可能な症例数は限られていること、内視鏡治療後の長期成績に関する十分な検討が行われて

いないことから、本ワーキンググループでの多施設共同前向きコホート研究を立案するに至った。

本年度は、大腸 NET に関する報告を収集し(論文検索の実施)、班会議を通じてワーキンググループ内での情報共有を図った。

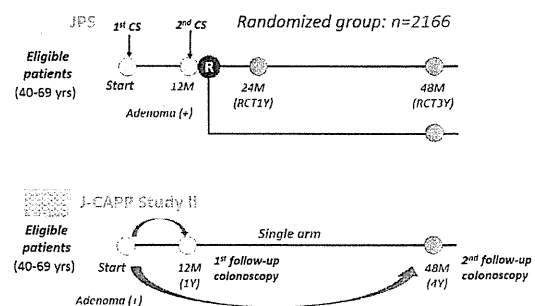
(倫理面への配慮)

JPS 研究の実施に際しては、各参加施設(全国 11 施設)における倫理審査委員会での承認取得を前提条件とした。データ管理体制については、本研究に関する全ての試験データおよび参加患者プロフィールを匿名化し、データセンター(メディカル・リサーチ・サポート)による委託管理としている。外部からのデータ参照および抽出の防止には細心の注意を払っている。尚、本研究への参加については、十分な口頭での説明の上、文書による参加の同意を得ることを前提とした。また、患者側から試験中止の希望があった際には、患者意思を尊重し速やかに中止措置をとり、その後の診療においても患者不利益が生じないよう配慮している。

C. 研究結果

平成 18 年末までに 3,926 名の登録が、また平成 21 年末までに 2,757 名の割り付け作業が完了した。割り付け状況は、2 回検査群(1.3 年後検査群):1,087 名、1 回検査群(3 年後検査群):1,079 名、腫瘍性ポリープ(-)群:591 名であり、J-CAPP Study II における historical control 群(アスピリン非投与群)となる対象は、初回 TCS にて腫瘍性ポリープを有した計 2,166 名となる。

JPS と J-CAPP Study II



<大腸 NET 多施設共同前向きコホート研究>

班会議での議論を通じて、大腸 NET に対する内視鏡治療後の前向き登録追跡研究を実施することが決定し、ワーキンググループで行う「アンケート調査」の作成が完了した。アンケートを回収後、研究実施計画書(プロトコル)の作成に入り、本年度前半での倫理審査完了を目指す。

D. 考察

近年の内視鏡機器および診断・治療技術の向上にも関わらず、平均寿命の延長も相まって、大腸がん罹患患者数・死亡者数は年々増加傾向にあり、その予防対策についての施策を講ずべき段階にある。J-CAPP Study II は、我が国初の大腸がん化学予防薬の実用化を目的とし、第 3 次対がん 10 年総合戦略における「がん化学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究」の二重盲検無作為割付臨床試験で実証されたエビデンスに基づき、大腸がん予防に対するアスピリン投与を実用化する最終段階として立案された大規模臨床研究である。J-CAPP Study II の historical control (アスピリン非投与群)として設定された Japan Polyp Study (JPS) のデータは、極めて質の高い比較対照群として期待されており、JPS データの整備は非常に重要となる。データ管理を委託しているデータセンター(メディカル・リサーチ・サポート)を中心に、引き続き JPS データ・クリーニングと解析を進めていく。

また、J-CAPP Study II のエントリーグループをサポートするワーキンググループにて付置研究として実施する「大腸 NET 多施設共同前向きコホート研究」については、本年度内でのプロトコル作成と倫理審査手続き完了後、エントリー開始を目標とする。

E. 結論

国を挙げて実施する「がん化学予防薬の実用化をめざした大規模臨床研究: J-CAPP Study

II」における historical control としての Japan Polyp Study データの整備は極めて重要であり、より質の高い比較対照群としてデータ活用出来るよう努めたい。また、大腸 NET 前向きコホート研究についても、過去に類を見ない大規模な症例集積が可能であり、個人情報の管理に細心の注意を払いながら進めていきたい。

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) 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. Study design and patient recruitment of the Japan polyp study. J Clin Trials 2014; 6: 37-44.
- 2) Matsuda T, Kawano H, Hisabe T, Ikematsu H, Kobayashi N, Mizuno K, Oka S, Takeuchi Y, Tamai N, Uraoka T, Hewett D, Chiu HM. Current status and future perspectives of endoscopic diagnosis and treatment of diminutive colorectal polyps. Dig Endosc 2014; 26: 104-8.
- 3) Uraoka T, Ramberan H, Matsuda T, Fujii T, Yahagi N. Cold polypectomy techniques for diminutive polyps in the colorectum. Dig Endosc 2014; 26: 98-103.
- 4) Tanaka S, Saitoh Y, Matsuda T, Igarashi M, Matsumoto T, Iwao Y, Suzuki Y, Nishida H, Watanabe T, Sugai T, Sugihara K, Tsuruta O, Hirata I,

Hiwatashi N, Saito H, Watanabe M, Sugano K, Shimosegawa T. Evidence-based clinical practice guidelines for management of colorectal polyps. J Gastroenterol 2015; 50: 252-60.

- 5) Sung JJ, Ng SC, Chan FK, Chiu HM, Kim HS, Matsuda T, Ng SS, Lau JY, Zheng S, Adler S, Reddy N, Yeoh KG, Tsoi KK, Ching JY, Kuipers EJ, Rabeneck L, Young GP, Steele RJ, Lieberman D, Goh KL. An updated Asia Pacific Consensus Recommendations on colorectal cancer screening. Gut 2015 ; 64: 121-32.

2. 学会発表

- 1) Takahisa M, Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of adenomatous polyps: The Japan Polyp Study. UEGW 2014, Vienna.

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(がん化学予防薬の実用化をめざした大規模臨床試験)
委託業務成果報告(業務項目)

ALDH2,ADH1B,CYP2A6 遺伝子多型の乾燥濾紙法による測定系確立に関する研究

担当責任者 竹下 達也 和歌山県立医科大学医学部公衆衛生学教室教授

研究要旨

日本各地の多施設において採取されたサンプル測定に対応できる方法の確立を目的として、血液ろ紙カード、ろ紙サンプルをくり抜く器具、Sample-to-SNP Kit、TaqMan GTXpress Master Mix、StepOnePlus リアルタイム PCR システムの使用などについて検討を行い、今後の本研究における血液試料の遺伝子解析の方法を確立した。

A. 研究目的

本研究では、日本各地の多施設において採取されたサンプル測定に対応できる方法の確立を目的として行った。解析する遺伝子は、アルコール代謝関連のアルコール脱水素酵素(ADH1B)およびアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)とした。

B. 研究方法

当研究室に保存している血液サンプルを用いた。これらは、全血から DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、TaqMan SNP Genotyping Assays を用いてリアルタイム PCR により解析して ADH1B および ALDH2 ともに結果を得ているものである。

1. 血液を染み込ませて乾燥させる濾紙として、FTA card (Whatman 社) と NucleoCard (Macherey-Nagel 社) について比較した。
2. 血液を染み込ませて乾燥させた Card をくり抜く器具について、FTA card 販売元が推奨しているマイクロパンチ (Harris Uni-Core Punches, Harris 社) および皮膚科等で用いられている生検トレパン (Kai Medical 社) について検討した。また、プラ

ンジャー付きとプランジャーなしとを比較した。

3. Card から直接 PCR 反応までそのまま進める TaqMan Sample-to-SNP Kit (Lifetechnologies 社) について、全血から DNA 抽出 Kit を用いて行う従来法との比較を行った。Genotyping は、TaqMan GTXpress Master Mix (Lifetechnologies 社) を用いて、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Lifetechnologies 社) により行った。

C. 研究結果

1. FTA card は1サンプルあたりの添加面積が小さく、40 μ L の血液が必要なのに比し、NucleoCard は添加面積が広く、200 μ L の血液が必要で、乾燥に時間もかかるため、FTA card を本研究に用いることとした。
2. Card をくり抜く器具については、推奨されているマイクロパンチは高価な上、入手しにくいのに比し、生検トレパンは入手しやすく安価なため、本研究では生検トレパンを用いることとした。また、より安価なプランジャーなしを試したところ、打ち抜いた card がつまってとれなかったため、プランジャー付きが

必要であることがわかった。

3. Sample-to-SNP Kit で Card から DNA を溶出するには、Kit に含まれる DNA Extract All Lysis Reagents を添加して 95°C で 3 分間インキュベートするのみであった。全血から DNA を抽出する従来法では、40 分間かかっていたため、非常に簡便であり、大量サンプルの解析に有用であることがわかった。また、TaqMan GTXpress Master Mix を使用することで、エラーなしに 50 分以下で genotyping まで行えた。また、得られた遺伝子型は、従来法で得られた結果と 100% 一致していた。

D. 考察

今回の検討により、FTA card のろ紙に染み込ませた血液試料を生検トレパンによりくり抜き、TaqMan Sample-to-SNP Kit により DNA 抽出を行い、TaqMan GTXpress Master Mix を用いて、StepOnePlus リアルタイム PCR システムにより解析することにより、迅速に高い精度で正確に結果が得られることが確認できた。

E. 結論

FTA card、生検トレパン、TaqMan Sample-to-SNP Kit、TaqMan GTXpress Master Mix、Step One Plus リアルタイム PCR システムの有用性が明らかになり、本研究における遺伝子解析の方法が確立できた。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Maeda S, Mure K, Mugitani K, Watanabe Y, Iwane M, Mohara O,

Takeshita T. Roles of the ALDH2 and ADH1B genotypes on the association between alcohol intake and serum adiponectin levels among Japanese male workers. *Alcohol Clin Exp Res* 38: 1559-1566, 2014.

2) Takemura S, Yoshimasu K, Fukumoto J, Mure K, Nishio N, Kishida K, Yano F, Mitani T, Takeshita T, Miyashita K. Safety and adherence of Umezu polyphenols in the Japanese plum (*Prunus mume*) in a 12-week double-blind randomized placebo-controlled pilot trial to evaluate antihypertensive effects. *Environ Health Prev Med* 19: 444-451, 2014.

3) Yoshimasu K, Mure K, Hashimoto M, Takemura S, Tsuno K, Hayashida M, Kinoshita K, Takeshita T, and Miyashita K. Genetic Alcohol Sensitivity regulated by ALDH2 and ADH1B Polymorphisms as Indicator of Mental Disorders in Japanese Employees. *Alcohol Alcohol* 50:39-45, 2015.

4) Yoshimasu K, Mure K, Hashimoto M, Takemura S, Tsuno K, Hayashida M, Kinoshita K, Takeshita T, and Miyashita K. Genetic alcohol sensitivity regulated by ALDH2 and ADH1B polymorphisms is strongly associated with depression and anxiety in Japanese employees *Drug Alcohol Depend* 147:130-136, 2015.

2. 学会発表

1) 牟礼佳苗、有田幹雄、竹下達也. 地域コホートにおける Nutrigenetics 研究— eNOS 遺伝子多型と不飽和脂肪酸—. 第 14 回日本分子予防環境医学研究会. 2015

年 2 月 14 日. 大阪市.

2) 牟礼佳苗、橋本麿和、渡部益隆、岡檀、服部園美、宮井信行、内海みよ子、有田幹雄、竹下達也. eNOS 遺伝子多型が摂取塩分量と血圧・動脈硬化指標との関連に与える影響. 第 85 回日本衛生学会学術総会. 2015 年 3 月 27 日. 和歌山市.

3) 渡部益隆、牟礼佳苗、橋本麿和、服部園美、宮井信行、内海みよ子、上松右二、有田幹雄、竹下達也. PPARG 遺伝子多型が加齢に伴う疾患に関する指標に与える影響. 第 85 回日本衛生学会学術総会. 2015 年 3 月 27 日. 和歌山市.

4) 橋本麿和、渡部益隆、服部園美、上松右二、有田幹雄、竹下達也. 日本人高齢者における AD1B、ALDH2 遺伝子型と飲酒行動との関連. 第 85 回日本衛生学会学術総会. 2015 年 3 月 28 日. 和歌山市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

サリチル酸固定化ナノ磁性ビーズを用いた
新規サリチル酸結合タンパク質に関する研究

研究分担者 酒井敏行 京都府立医科大学 分子標的癌予防医学 教授

研究要旨

アスピリンは長年臨床で使用されてきた抗炎症薬であり、様々な有用な薬理作用が見出されてきた。しかし、それぞれの薬理作用を説明しうる詳細な分子メカニズムに関しては、未だ不明な点が多い。そこで、本分担研究では、この詳細な分子メカニズムを解明するために、アスピリンの体内活性代謝物であるサリチル酸の直接の結合タンパク質を精製し、同定することにした。平成 26 年度では、ケミカルバイオロジー分野で用いられているナノ磁性ビーズに、安定的にサリチル酸を固定化できる反応系を構築し、サリチル酸結合タンパク質の優れた精製担体を作製することに成功した。

研究協力者

飯泉陽介、青野裕一
京都府立医科大学
分子標的癌予防医学

A. 研究目的

アスピリンは、長年臨床で用いられてきた抗炎症薬で、様々な有用な薬理作用を有していることが知られているが、それぞれの薬理作用を説明しうる詳細な分子メカニズムはまだ明らかではない。本分担研究では、最先端技術ケミカルバイオロジーを用いて、アスピリンの体内活性代謝物であるサリチル酸の、新規結合タンパク質を網羅的に同定し、アスピリンによる大腸癌予防機序の全貌解明に貢献することを目的としている。

B. 研究方法

ナノ磁性ビーズは、COOH 基を表面に有したナノ磁性ビーズを選択した。そして、固定化する化合物としては、サリチル酸の 5 位のアミノ化誘導体である 5-アミノサリチル酸を選択した。その理由は、5-アミノサリチル酸の 5 位のアミノ基を COOH 型ナノ磁性ビーズとのアミド化による固定化に用いることで、ビーズ表面にサリチル酸に特徴的な COOH 基とフェノール性 OH 基が修飾されることなく露出させることを想定した固定化反応である。また、固定化反応を最適化するために、反応系に投入する触媒の量などを検討した。本研究は、ヒトや動物を対象としていないため、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

固定化反応に用いる触媒や 5-アミノサリチル酸の量などを変化させて、様々なサリチル酸固定化ビーズを作製した。そして、これらのサリチル酸固定化ビーズを用いて、大腸癌細胞株 HT-29 の細胞抽出液から結合タンパク質の精製を行った。その結果、サリチル酸結合タンパク質の候補が確認され、サリチル酸結合タンパク質の候補を効率よく精製できるビーズが得られ、COOH 型ナノ磁性ビーズへの 5-アミノサリチル酸の最適な固定化条件が明らかになった。

D. 考察

5-アミノサリチル酸の COOH 型ナノ磁性ビーズへの固定化には、最適な条件が存在した。また、大腸癌細胞株 HT-29 細胞内には、サリチル酸結合タンパク質の候補が存在した。

E. 結論

5-アミノサリチル酸の COOH 型ナノ磁性ビーズへの固定化の最適な条件が明らかになった。平成 27 年度からは、この最適な条件により作製したサリチル酸固定化ナノ磁性ビーズを用いて、サリチル酸結合タンパク質を精製し、質量分析計を用いて同定していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) M. Horinaka, *et al.*, Myeloid zinc finger 1 mediates sulindac sulfide-induced upregulation of death receptor 5 of human colon cancer cells. *Sci Rep.*, 4:6000, 2014

(2) H. Ishikawa, *et al.*, The preventive effects of low-dose enteric-coated aspirin tablets on the development of colorectal tumours in Asian patients: a randomised trial. *Gut*, 63(11):1755-1759, 2014

2. 学会発表

(1) 飯泉陽介、酒井敏行：ポリフェノール結合タンパク質同定法の開発と細胞周期制御機構の解析（口頭発表）、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 26 日

(2) 藤堂桃子、他：イブプロフェンによる DR5 の発現誘導と TRAIL 誘導性アポトーシスの増強（ポスター発表）、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

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）

大腸がん化学予防剤アスピリンの
作用機作の解析

若林敬二

静岡県立大学 食品栄養環境科学研究所

食品環境研究センター長

研究要旨

アスピリン等の大腸がん化学予防剤による活性カルボニル化合物生成抑制作用について検討するため、今回は、活性カルボニル化合物の分析方法の確認を行うとともに加齢による活性カルボニル化合物の体内蓄積を解析した。老化促進モデルマウスである SAMP8 雄マウスを用いて、8 週齢及び 44 週齢における肝臓および大脳における活性カルボニル化合物量と種類を比較した。その結果、SAMP8 マウス肝臓及び大脳の活性カルボニル化合物は加齢により数及び含量ともに顕著に増加することがわかった。現在、Min マウスに大腸がん化学予防物質であるアスピリン及び胃粘膜保護薬である irsogladine を投与したサンプルについて、活性カルボニル化合物を分析している。

A. 研究目的

大腸がんの発生には、脂質代謝異常、インスリン抵抗性、アディポサイトカイン産成バランスの破綻等が関与していることが指摘されており、いわゆる慢性炎症が大きな役割をしてもと考えられている。抗炎症剤として広く用いられているアスピリンは、基礎研究、疫学研究、介入研究に於いて、明らかに大腸がんの発生を予防することが示されている。アスピリンの作用機作としては、COX 阻害及び COX 阻害以外の作用が示唆されているが、未だ十分には明らかにされていない。

脂質の酸化反応は脂質過酸化反応と言われ、酸化ストレスにおける代表的な化学反

応である。脂質過酸化反応によって生成される活性カルボニル化合物は、強い細胞障害性を持つものが多く、タンパク質や DNA 等の生体分子と非酵素的に反応するという特徴があることが報告されている。従って、活性カルボニル化合物の生体内における蓄積は、がん等の生活習慣病発生要因の一つと考えられている。

本研究では、アスピリン及びその関連化合物の作用メカニズムを究明することを目的として、大腸がん化学予防剤による活性カルボニル化合物生成抑制作用について検討する。今回は、活性カルボニル化合物の分析方法の確認及び加齢による活性カルボニル化合物の体内蓄積を検討するために、老

化促進モデルマウスである SAMP8 マウスを用いて、8 週齢及び 44 週齢における肝臓および大脳における活性カルボニル化合物量と種類を比較した。

B. 研究方法

活性カルボニル化合物のダンシルヒドラジン (DH) 誘導体化

・8 週齢及び 44 週齢の雄 SAMP8 マウスより摘出した肝臓または大脳組織をホモジナイズ後、20 mg wet tissue/200 μ L になるように 0.5 mM EDTA, 20 μ M ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を含む 50 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で懸濁した。

・肝臓または大脳ホモジナイズ液 200 μ L に、アルデヒドの内部標準化合物としてパラベンジルオキシベンズアルデヒド

(*p*-BOBA) を 20 pmol 添加後、クロロホルム：メタノール (2:1) 400 μ L を加え、1 分間激しく攪拌後、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した。

・有機相を回収後、水相にさらにクロロホルム：メタノール (2:1) 400 μ L を加え、1 分間激しく攪拌後、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、有機相を回収した。

・得られた有機相を milliQ 水 100 μ L で 2 回洗浄した後、50 μ g ダンシルヒドラジン、10 μ g *p*-トルエンスルホン酸 (TsOH) を含むアセトニトリル 100 μ L を加え、室温、暗所で 4 時間、誘導体化を行った。誘導体化後、反応溶液を減圧留去し、アセトニトリル 200 μ L に再溶解し、被験試料とした。

LC/ESI-MS/MS 条件

調製した試料は LC/ESI-MS/MS [HPLC: Agilent 1200 (Agilent Technologies), MS: G6410B Triple Quadrupole (Agilent

Technologies)] により測定した。

検出条件

[被験試料の注入量] 5 μ L

[カラム] TSKgel Super-Octyl 2.3 μ m (東ソー(株)、100 \times 内径 2.0 mm)

[流速] 200 μ L /min

[流出] A 液 : H₂O (0.1%ギ酸) B 液 : アセトニトリル (0.1%ギ酸) によるグラジエント方式

[グラジエント条件] 0 分で A 液 80%、B 液 20%、10 分で A 液 0%、B 液 100%、20 分で A 液 0%、B 液 100%、20.01 分で A 液 80%、B 液 20%、30 分で A 液 80%、B 液 20%とした。

[測定モード] SRM モードで m/z 275~949/236.1 をモニターした。

(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した。また、動物実験は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

8週齢雄SAMP8マウスと44週齢雄SAMP8マウスを比較すると、マウスの老化の特徴である外観の悪化と明らかな認知機能の低下が認められた。老化による外観の悪化や認知機能の低下等の原因の一つとして、体内での酸化障害が関与していると考えられている。そこで、体内での酸化生成物の一つである脂質の活性カルボニル化合物に注目し、SAMP8 マウスの肝臓における活性カルボニル化合物の含量を調べた。

8週齢と44週齢マウスの肝臓中の活性カルボニル化合物を分析した結果、肝臓中の活性カルボニル化合物が8週齢では260ピー

ク、44週齢では394ピーク検出され、そのうちの252ピークが8週齢と比較して、44週齢で増加し、154ピークが減少することがわかった。更に、活性カルボニル化合物のうち、Pentanal、2-Hexenal、2,4-Heptadienal (2,4-HpDE)、2-Heptenal、4-Hydroxy-2-nonenal (HNE)、及びHexadecanalの6化合物について標品を元に定量した結果、8週齢に比べ44週齢対照群で、6化合物全ての含量が、顕著に増加していることがわかった。これらの実験の結果から、SAMP8マウス肝臓では、加齢により、活性カルボニル化合物の数及び含量が増加することがわかった。

次に、大脳における活性カルボニル化合物を分析した。8週齢マウスの大脳において、活性カルボニル化合物は158ピーク、44週齢マウスで216ピークが検出され、そのうち142のピークが8週齢と比較し44週齢で増加した。一方、減少したのは105ピークであった。活性カルボニル化合物のうち、2,4-Heptadienal (2,4-HpDE)、2-Hexenal、4-Hydroxy-2-hexenal (HHE)、2,4-Nonadienal (2,4-NDE)、4-Hydroxy-2-nonenal (HNE)、Hexadecanal、Heptadecanal、及びOctadecanalの8化合物について標品を元に定量した。その結果、8週齢に比べ44週齢で、8化合物全ての含量が2~40倍に増加していることがわかった。これらの結果より、SAMP8マウス大脳の活性カルボニル化合物は加齢により数及び含量ともに有意に増加することがわかった。

D. 考察

SAMP8マウス肝臓及び大脳中の活性カルボニル化合物は8週齢から44週齢の加齢により数及び含量ともに有意に増加することがわかった。

脂質過酸化反応によって生成される、活

性カルボニル化合物であるアルデヒド化合物としては、コレステロールやリン脂質(グリセロール)などの母核を保持したままのコアアルデヒドや短鎖アルデヒドがある。代表的な短鎖アルデヒドはアルカナール、2-アルケナール、4-ヒドロキシ-2-アルケナール及びケトアルデヒドなどである。これらはタンパク質やDNA等の生体分子と非酵素的に反応し、細胞障害を引き起こすことが知られており、活性カルボニル化合物の生体内における蓄積は、大腸がんの発生に関与する可能性が考えられる。今後、Minマウス等の大腸がん発生モデル動物を用いて、生体内中の活性カルボニル化合物をLC-MSを用いて網羅的に分析し、大腸がんの発生と活性カルボニル化合物の蓄積との関連性を解析することが重要と思われる。更に、アスピリン及びその関連化合物による、大腸がん予防効果と活性カルボニル化合物の量及び種類との関連性を検討するが肝要と考えられる。現在、Minマウスにアスピリン及び胃粘膜保護薬であるirsogladineを投与したサンプルについて、活性カルボニル化合物を分析している。

E. 結論

本研究では、アスピリン及びその関連化合物の作用メカニズムを究明することを目的として、大腸がん化学予防剤による活性カルボニル化合物生成抑制作用について検討する。今回は、活性カルボニル化合物の分析方法の確認及び加齢による活性カルボニル化合物の体内蓄積を検討するために、老化促進モデルマウスであるSAMP8マウスを用いて、8週齢及び44週齢における肝臓および大脳における活性カルボニル化合物量と種類を比較した。その結果、SAMP8マウス肝臓及び大脳の活性カルボニル化合物は

加齢により数及び含量ともに顕著に増加することがわかった。現在、Min マウスに大腸がん予防物質であるアスピリン及び胃粘膜保護薬である irsogladine を投与したサンプルについて、活性カルボニル化合物を分析している。

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) Kochi T, Shimizu M, Totsuka Y, Shirakami Y, Nakanishi T, Watanabe T, Tanaka T, Nakagama H, Wakabayashi K, Moriwaki H. A novel aromatic mutagen, 5-amino-6-hydroxy-8H-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABAQ), induces colonic preneoplastic lesions in mice. *Toxicology Reports* 2014;1:69-73.
- 2) 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 tumors in Asian patients: a randomised trial. *Gut* 2014;63:1755-9.
- 3) Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H. In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and L-tryptophan. *Mutation Research* 2014;760:48-55.
- 4) Mutoh M, Takahashi M, Wakabayashi K. "Cancer and Inflammation Mechanisms. Chemical, Biological, and Clinical Aspects", First edition. Chapter 20 "Chemoprevention of colorectal cancer by

anti-inflammatory agents". Edited by Shosuke Kawanishi and Hiroshi Ohshima. Published 2014 by John Wiley & Sons, Inc.

2. 学会発表

- 1) 若林敬二. 大腸がんの化学予防、生活習慣が消化器がん発生に与える影響:最新の知見 消化器癌の化学予防. 第52回日本癌治療学会学術集会、横浜 (2014年8月29-30日)
- 2) 若林敬二. がんの発生と抑制に影響を及ぼす食事性因子. 日本農芸化学会中部支部第170回例会、静岡 (2014年7月5日)
- 3) Wakabayashi K, Totsuka Y, Watanabe T, Kochi T, Shimizu M, Tanaka T. A Novel Maillard Reaction Product, Aminobenzoazepinoquinolinone-Derivative, Induces Genotoxicity and Preneoplastic Lesions in Mice. The Environmental Mutagenesis and Genomics Society 45th Annual Meeting, Orlando, Florida, U.S. (13-17 September 2014).
- 4) 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. 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。がん予防学術大会 2014 東京、築地 (2014年6月13-14日)

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。

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「がん化学予防薬の実用化をめざした大規模臨床研究」

機関名 京都府立医科大学 分子標的癌予防医学 石川秀樹

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
Relationship between aspirin and smoking in colorectal polyp prevention studies	Hideki Ishikawa, J-FAPP Study II group, J-CAPP Study Group	Prevention 2014 with a Consensus Conference on Chemoprevention of Colorectal Cancer with a Consensus Conference on Chemoprevention of Colorectal Cancer preceding the 16th ESMO World Congress on GI-Cancers	2014/6/24	国外
九州発・消化器内視鏡学のエビデンス	石川秀樹	基調講演第103回日本消化器病学会九州支部例会	2014/7/4	国内
腸内細菌叢の改変によるがん予防臨床試験	石川秀樹、酒井敏行	第34回日本分子腫瘍マーカー研究会	2014/9/24	国内
ポリポース患者の管理のコツ	石川秀樹	第36回日本消化器内視鏡学会重点卒後教育セミナー	2014/10/5	国内
Gut Microbiota, Dietary carcinogens and colorectal cancer	Hideki Ishikawa	ILSI SEA Region Conference on The Gut, Its Macrobes and Health	2014/10/9	国外
Preventing exacerbation of ulcerative colitis with oral bifidobacterium therapy	Hideki Ishikawa	5 t h Asian-Pacific Topic Conference	2014/10/22	国内
家族性大腸腺腫症に随伴する Spigelman stageIV十二指腸ポリポースに対する治療戦略	渡辺雄一郎、馬場裕之、松澤岳晃、福地稔、熊谷洋一、石橋敬一郎、持木彫人、岩間毅夫、石田秀行、石川秀樹	第2回日本家族性大腸腺腫症研究会学術集会	2014/11/6	国内
家族性大腸腺腫症患者の診療のコツ	石川秀樹	第2回日本家族性大腸腺腫症研究会学術集会	2014/11/6	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
Factors associated with technical difficulties and adverse events of colorectal endoscopic submucosal dissection: retrospective exploratory factor analysis of a multicenter prospective cohort	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.	Int J Colorectal Dis	2014	国外
Potential perioperative advantage of colorectal endoscopic submucosal dissection versus laparoscopy-assisted colectomy.	Nakamura F, Saito Y, Sakamoto T, Otake Y, Nakajima T, Yamamoto S, Murakami Y, Ishikawa H, Matsuda T.	Surgical Endoscopy	2015	国外
Randomized controlled trial comparing gastric cancer screening by gastrointestinal X-ray with serology for Helicobacter pylori and pepsinogens followed by gastrointestinal endoscopy.	Gotoda T, Ishikawa H, Ohnishi H, Sugano K, Kusano C, Yokoi C, Matsuyama Y, Moriyasu F.	Gastric Cancer	2014	国内
Study design and patient recruitment of the Japan polyp study.	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.	J Clin Trials	2014	国外

<p>Diagnostic performance and limitations of magnifying narrow-band imaging in screening endoscopy of early gastric cancer: a prospective multicenter feasibility study.</p>	<p>Yao K, Doyama H, Gotoda T, Ishikawa H, Nagahama T, Yokoi C, Oda I, Machida H, Uchita K, Tabuchi M.</p>	<p>Gastric Cancer</p>	<p>2014</p>	<p>国内</p>
<p>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.</p>	<p>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.</p>	<p>Gastrointest Endosc.</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<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, Jimuro 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</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>

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 ^Y 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によるマウス膵臓発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発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による腸発がん抑制（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発がん抑制機構（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によるマウス腸発がん抑制効果（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