

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）

大腸腫瘍患者へのアスピリン(100mg/day)による発がん予防大規模臨床試験

- J-CAPP StudyII に関する研究 -

担当責任者 石川秀樹 所属名 京都府立医科大学分子標的癌予防医学
役職名 特任教授

研究要旨

研究者自主研究として、アスピリン腸溶錠（1錠 100mg/day）による大腸腫瘍予防効果を historical control を用いた大規模単一投与臨床試験により評価し、アスピリンによる大腸腫瘍抑制効果を検証するとともに、大腸がん予防のためにアスピリンを用いるべき集団の特定を目的とする臨床試験を、2015年5月に開始するべく企画、立案した。対象条件は、大腸に大腸腫瘍を1個以上持ちそれらをすべて内視鏡的に摘除できた40歳以上、70歳未満の患者である。試験薬は低用量アスピリン（100mg/day）を1日1錠4年間服用する。主評価は、1年目までを除く4年間の全大腸内視鏡検査における新たな Index Lesion(10mm以上の腺腫、高度異型腺腫、がん)の発生の割合とする。遺伝子多型（CYP2A6（喫煙）、ALDH2、ADH1B（飲酒）など、大腸発癌やアスピリン代謝に関係する酵素の遺伝子多型を測定し、アスピリンの大腸癌予防効果についてコホート解析を行う。予定参加者数は7,000人である。

A. 研究目的

低用量アスピリン腸溶錠（1錠 100mg/day）による比較的進んだ大腸腫瘍の発生予防に対する有効性を評価し、かつ、大腸がんを予防するために低用量アスピリンを投与する対象者の絞り込み条件を把握することを目的とする。

B. 研究方法

詳細は、貼付のプロトコルを参照のこと。
本試験のデザインは、多施設による単一介入試験である。

対象条件は、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、それらをすべてを内視鏡的に摘除できた、40-69歳の男女である。

腫瘍の摘除時期は問わない。ただし、エントリー前のすべての大腸内視鏡検査においてポリープを認めて摘除した場合には、すべての組織的検索が行われてその結果が把握できている者が望ましいが、摘除標本の組織結果が不明なポリープがあった症例もエントリーは可とする。

参加呼びかけの3ヶ月以内に全大腸内視鏡

検査を実施し、認められた大腸腫瘍をすべて摘除している。このエントリー直前の大腸内視鏡検査においては、摘除したポリープの組織診断がすべて把握できている者に限定する。

上記条件に加えて、インフォームド・コンセントを得た者である。

除外基準は、粘膜下浸潤(SM)以深の大腸がんの既往者、家族性大腸腺腫症、Lynch 症候群患者、抗凝固剤、抗血栓剤を服用中の者、バイアスピリン投与禁忌者(アスピリンアレルギー既往者を含む)、大腸切除者(虫垂切除は参加可能)、妊娠中及び試験期間中に妊娠予定のある者、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の治療既往者(ヘリコバクターピロリの除菌成功者でその後、潰瘍のS2 治癒が確認できている者は参加可能)、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)、出血性憩室炎、高度の出血性胃炎などの易出血性疾患を合併している者、出血傾向のある者、血小板数 10 万以下、PT の異常値者、参加時点で活動性の悪性腫瘍に罹患している者、抗がん剤を投与中の者、処方箋薬、OTC 薬を問わず、痛み止めなどのため非ステロイド系抗炎症剤(NSAIDs)を週 3 回以上服用している者である。

試験方法を簡単に述べる。大腸のポリープをすべて摘除した患者をエントリー後、低用量アスピリン 1 日 100mg を 4 年間投与する。1 年目と 4 年目、7 年目に全大腸内視鏡検査を実施し、認めたポリープをすべて摘除し、組織学的検索を行う。

エントリー時に飲酒、喫煙や食事・運動習慣などの生活習慣を把握する。また、参加者は全員、乾燥濾紙法による遺伝子多型を測定する。

主エンドポイントは、1 年目までを除く 4 年間の全大腸内視鏡検査における新たな Index Lesion(IL10mm 以上の腺腫、高度異型腺腫、がん)の発生の割合とする。副エンドポイントは、大腸腫瘍(腺腫、がん)の発生の有無、個数、

直径、異型度、部位、試験期間内の有害事象発生率、他臓器がんの発生の割合、エントリー時点の性、年齢、飲酒、喫煙、身長、体重、運動習慣調査、服薬歴、生化学的血液検査、大腸腫瘍既往、乾燥血液濾紙法による遺伝子多型(CYP2A6(喫煙)、ALDH2、ADH1B(飲酒)など、大腸発癌やアスピリン代謝に関係する酵素の遺伝子多型を測定し、コホート解析を行う。

予定参加者数は 7,000 人である。

登録期間は倫理審査委員会承認後から 2017 年 3 月 31 日とする。試験実施期間は 2024 年 3 月 31 日までの予定である。

C. 研究結果

大腸内視鏡部会を設置し、試験参加者をエントリーするエントリーグループ 21 施設、そのエントリーグループをサポートする 70 施設程度の大腸内視鏡専門医グループを構築した。それ以外に、運営委員会、安全効果評価委員会、モニタリング委員会を組織した。プロトコルを作成し、ドイツのバイエル社に、利益相反の発生しない形での試験薬提供を依頼、輸入手続き、裸錠の PTP 包装手続き、データセンターのシステム構築、タブレット端末によるアンケート情報の収集システムの構築、タブレット端末によるインフォームド・コンセント補助機器の作成、各施設からの患者情報システムの構築を行い、プロトコルを京都府立医科大学倫理審査委員会に申請手続きを行うなど、ほぼ予定通りの作業を進めることができた。

D. 考察

本試験はアスピリンによる大腸腫瘍抑制効果を進行した大腸腺腫や早期癌を指標として、抑制効果を確認する検証試験であるとともに、大腸がん予防のためにアスピリンを投与すべき集団の絞り込みをする知見を得るための探索的研究も兼ねている。本試験により、アスピ

リンによる大腸がん予防効果が確定し、さらに投与すべき人の絞り込みが可能になれば、アスピリンによる大腸がん予防は臨床応用に大きく近づくと考える。

7,000人を対象とした大腸がん予防を目的とした大規模臨床試験は、これまで日本では初めての試みである。本試験が完遂できたならば、大腸がん予防研究の進歩のみならず、予防研究にける大規模臨床試験の環境整備にも繋がると考えられる。

E. 結論

7,000人を対象とした大腸がん予防のための大規模臨床試験のプロトコールを作成し、試験開始のための準備を行った。現在、試験開始に向けて準備は順調に進んでおり、まもなく試験は開始される予定である。

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) 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. 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* 2014;29(10):1275-84.
- 2) Nakamura F, Saito Y, Sakamoto T, Otake

Y, Nakajima T, Yamamoto S, Murakami Y, Ishikawa H, Matsuda T. Potential perioperative advantage of colorectal endoscopic submucosal dissection versus laparoscopy-assisted colectomy. *Surgical Endoscopy* 2015;29(3):596-606.

- 3) Gotoda T, Ishikawa H, Ohnishi H, Sugano K, Kusano C, Yokoi C, Matsuyama Y, Moriyasu F. Randomized controlled trial comparing gastric cancer screening by gastrointestinal X-ray with serology for *Helicobacter pylori* and pepsinogens followed by gastrointestinal endoscopy. *Gastric Cancer* 2014 Epub ahead of print
- 4) 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.
- 5) Yao K, Doyama H, Gotoda T, Ishikawa H, Nagahama T, Yokoi C, Oda I, Machida H, Uchita K, Tabuchi M. Diagnostic performance and limitations of magnifying narrow-band imaging in screening endoscopy of early gastric cancer: a prospective multicenter feasibility study. *Gastric Cancer* 2014;17(4):669-79.
- 6) Yamada S, Doyama H, Yao K, Uedo N, Ezoe Y, Oda I, Kaneko K, Kawahara Y, Yokoi C, Sugiura Y, Ishikawa H, Takeuchi Y, Saito Y, Muto M. An efficient diagnostic strategy for small, depressed early gastric cancer with magnifying

narrow-band imaging: a post-hoc analysis of a prospective randomized controlled trial. *Gastrointest Endosc.* 2014;79(1):55-63.

- 7) 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. 学会発表

- 1) Hideki Ishikawa, J-FAPP Study II group, J-CAPP Study Group: Relationship between aspirin and smoking in colorectal polyp prevention studies, 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, Barcelona/ Spain
- 2) 石川秀樹 :九州発・消化器内視鏡学のエビデンス、基調講演第 103 回日本消化器病学会九州支部例会、2014 年 7 月 4 日、福岡県福岡市
- 3) 石川秀樹、酒井敏行 :腸内細菌叢の改変によるがん予防臨床試験、第 34 回日本分子腫瘍マーカー研究会、2014 年 9 月 24 日、神奈川県横浜市
- 4) 石川秀樹 :ポリポース患者の管理のコツ、第 36 回日本消化器内視鏡学会重点卒後教育セミナー、2014 年 10 月 5 日、東京都江東区
- 5) Hideki Ishikawa : Gut Microbiota, Dietary carcinogens and colorectal cancer, ILSI

SEA Region Conference on The Gut, Its Macrobes and Health, 2014/10/9, Singapore

- 6) Hideki Ishikawa : Preventing exacerbation of ulcerative colitis with oral bifidobacterium Therapy, 5 t h Asian-Pacific Topic Conference, 2014/ 10/ 22, Kobe/ Hyogo
- 7) 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 : 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、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、東京都中央区
- 8) 石川秀樹 : 家族性大腸腺腫症患者の診療のコツ、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、東京都中央区

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。

動物実験や培養細胞を用いたアスピリンによる
がん予防メカニズム解析に関する研究

武藤倫弘

独立行政法人 国立がんセンター
がん予防・検診研究センター 室長

研究要旨

我々の研究グループは、アスピリンおよび抗炎症剤に関して、動物実験や培養細胞を用いた実験を通じて解析し、薬理/生理的機序の分子メカニズムを明らかにすることで大規模臨床試験における PROOF OF CONCEPT の確立を行うことを目的としている。今回はアスピリンの副作用を軽減させる方策確立のために、併用すべき既承認医薬品等の選出を行うことを試み、H₂ blocker や proton pump inhibitor 以外の胃粘膜保護薬のうち、irsogladine が候補と成る可能性を見いだした。アスピリンとの併用で本当に副作用減弱と腫瘍抑制能があるかどうかは今後検討していきたいと考えている。

A. 研究目的

アスピリンおよび抗炎症剤に関して、動物実験や培養細胞を用いた実験を通じて解析し、薬理/生理的機序の分子メカニズムを明らかにすることで大規模臨床試験における PROOF OF CONCEPT の確立を行うことを目的とした。

具体的に「大規模臨床試験における POC の確立」に関しては、がん予防研究に適した新たなモデルを作成し、更にアスピリンまたは抗炎症剤によるがん予防効果を実証する。また、「薬理/生理的機序の分子メカニズム」に関しては、喫煙等の生活習慣因子とアスピリンの交互作用の機序を明らかにする動物実験や培養細胞を用いた実験系の確立を行い、実際の臨床試験における

問題の克服を目指すとともにアスピリンの副作用を軽減させる方策確立のために、併用すべき既承認医薬品等の選出を行う。

B. 研究方法

「薬理/生理的機序の分子メカニズム」（アスピリンの副作用を軽減させる方策確立のために、併用すべき既承認医薬品等の選出を行う）に関して：

< *in vitro* > H₂ blocker や proton pump inhibitor 以外の胃粘膜保護薬として ecabet sodium hydrate、irsogladine maleate、rebamipide、sofalcone、teprenone および troxipide の 6 剤を候補薬とした。これらの薬剤を 200 μM の用量で大腸がん細胞に 24 時間暴露し、細胞における酸化ストレス関連転写活性 (AP-1,

NF- κ B、NRF2、p53 そして STAT3)を測定した。

< *in vivo* >

5 週齢の雄 Min マウスに、上記検討にて有効薬剤と抽出された irsogladine を 5、50 ppm の用量で基礎食 AIN-76A に混ぜ与えた。13 週齢にて屠殺し、肝臓、腎臓、脾臓、腸管を摘出した。腸管は実体顕微鏡を用いて腸ポリープの数及び腸ポリープの長径を計測した。細胞周期関連因子である c-Myc、cyclin D1 の mRNA 発現レベルを realtime RT-PCR 法にて測定すると同時に腸ポリープ組織における NF- κ B 依存性の炎症性サイトカイン発現レベルを今後測定評価する。

(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。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

検討した 6 つの胃粘膜保護剤のうち、irsogladine が有意に NF- κ B 転写活性を Caco-2 細胞にて抑制した。同様な結果は HCT-15 細胞においても認められた。Irsogladine の NF- κ B 転写活性抑制は、NF- κ B 阻害剤である 5HP P-33 or SM-7368 の阻害能よりも弱かった。次に、Min マウスに生成する腸ポリープに対する irsogladine の影響を検討したところ、5、50 ppm の投与量で、非投与群の腸ポリープ総数の 69%、66% にその総数を抑制することがわかった。現在その詳細なメカニズムに関して検討中である。

D. 考察

アスピリンの服用対象者は、がんの観点

のみならず、総合的な利点が総合的な欠点に勝っている必要があるが、現時点では、健常人ではなく大腸がん中～超高危険度群の患者がまずはその対象になると考えられる。加えて、アスピリンの有効性および副作用の軽減を指標に投与対象者の絞り込みが必要であり、i) 他疾患における投与条件(除外項目やリスクを含む) ii) 他剤の服用履歴 iii) 一塩基多型(single nucleotide polymorphisms; SNPs) などの遺伝的背景が参考になると考えられる。

本分担試験では、アスピリンの副作用を軽減させる方策確立のために、併用すべき既承認医薬品等の選出を目指し、胃粘膜保護剤より薬剤の抽出を試みた。その結果、irsogladine が抽出されたが、アスピリンとの併用で本当に副作用減弱と腫瘍抑制能があるかどうかはこれからの検討課題である。

その他、他剤服用との関連を検索すると、低用量アスピリン服用者において、サルタン系薬剤(angiotensin type 1 receptor (AT1R) blockers (ARBs)) や スタチン系薬剤(HMG-Co A reductase inhibitors) が併用されている患者において、上部消化管潰瘍・出血のリスクが減少することが報告されている。ARB、スタチンともに大腸がん化学予防剤の候補であるため、将来的に低用量アスピリン腸溶解錠との併用による大腸ポリープ抑制の増大効果を検証することもできると考えられる。

E. 結論

本研究の中心である臨床介入試験では長期かつ大規模なアスピリンの臨床試験を行うことにより大腸がんおよびその他のがんの発生に対するアスピリンの効果をより精度高く検証し、そしてその検証の中で、ア

スピリンを服用すべき対象者を絞り込めれば、アスピリンを大腸がんの予防の選択肢の一つとして確立することが出来ると思われる。そのためには更に、薬理/生理的機序の分子メカニズムを明らかにし、大規模臨床試験における PROOF OF CONCEPT の確立を行うことが必要と考えられる。

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

- 1) 今井俊夫、打屋尚章、藤井 元、武藤倫弘、高橋真美。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 第61回日本実験動物学会、札幌 (2014年5月15-17日)
- 2) 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。大腸がん幹細胞におけるビタミンD受容体の機能解析 日本ビタミン学会第66回大会、姫路 (2014年6月13-14)

- 日)
- 3) 武藤倫弘。がん化学予防剤を用いた予防介入試験の集団への適用。がん予防学術大会 2014 東京、築地 (2014 年 6 月 13-14 日)
 - 4) 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。腸前がん病変由来細胞の長期培養方法の確立。がん予防学術大会 2014 東京、築地 (2014 年 6 月 13-14 日)
 - 5) 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。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。がん予防学術大会 2014 東京、築地 (2014 年 6 月 13-14 日)
 - 6) 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)
 - 7) 今井俊夫、打屋尚章、高橋真美、藤井 元、武藤倫弘。高脂肪食による乳腺発がん促進に關与する発現遺伝子の探索。がん予防学術大会 2014 東京、築地 (2014 年 6 月 13-14 日)
 - 8) Inoue A, Obayashi K, Ogasawara F, Nakamura A, Ueno T, Fujii G, Mutoh M, Kuhara S, Tashiro K. Effect of cytokines on human primary hepatic stellate cell. the FEBS-EMBO 2014 congress, Paris, France (30 August - 4 September 2014).
 - 9) 高橋真美、石ヶ守里加子、藤井 元、武藤倫弘、今井俊夫。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。第 1 回 NCGM-NCC 研究所合同リトリート、つくばみらい市 (2014 年 9 月 1-3 日)
 - 10) 今井俊夫、打屋尚章、武藤倫弘、藤井 元、高橋真美。乳腺組織に対する高レプチン血症の影響。第 29 回発癌病理研究会、いわき市 (2014 年 9 月 1-3 日)
 - 11) 武藤倫弘、中西るり、尾沼若奈、清水聡美、藤井 元。炭酸脱水素酵素による腸発がん抑制。第 29 回発癌病理研究会、いわき市 (2014 年 9 月 1-3 日)
 - 12) Mutoh M, Takahashi M, Ishigamori R, Shimizu S, Onuma W, Imai T, Fujii G. Inhibition of intestinal polyp formation in Min mice by acetazolamide. 第 73 回日本癌学会総会、横浜 (2014 年 9 月 25-27 日)
 - 13) Shimizu S, Ishigamori R, Fujii G, Takahashi M, Onuma W, Yano T, Mutoh M. Sesamol suppresses COX-2 transcriptional activity via inhibition of NADPH oxidases in colon cancer cells. 第 73 回日本癌学会総会、横浜 (2014 年 9 月 25-27 日)
 - 14) Onuma W, Fujii G, Shimizu S, Ishigamori R, Takahashi M, Imai T, Fukai F, Mutoh M. Long-term culture method for precancerous lesion-derived cells. 第 73 回日本癌学会総会、横浜 (2014 年 9 月 25-27 日)
 - 15) 高橋真美、石ヶ守里加子、藤井 元、武藤倫弘、今井俊夫。Agouti によるマウス膵臓発がん促進メカニズム。第 73 回日本癌学会総会、横浜 (2014 年 9 月 25-27 日)
 - 16) 今井俊夫、藤井元、武藤倫弘、高橋真美。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。第 73 回日本癌学会総会、横浜 (2014 年 9 月 25-27 日)
 - 17) 寺崎 将、武藤倫弘、増田園子。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。第 73 回日本癌学会総会、横浜 (2014 年 9 月 25-27 日)
 - 18) 武藤倫弘。ドラッグリポジショニングによる大腸がん予防。第 42 回日本潰瘍学会、東京 (2014 年 10 月 31 日-11 月 1 日)
 - 19) 谷中昭典、武藤倫弘。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。第 42 回
日本潰瘍学会、東京 (2014 年 10 月 31 日-11 月 1
日)

20) 武藤倫弘、藤井 元、高橋真美、中西るり、尾
沼若奈、清水聡美。Acetazolamide による腸発が
ん抑制。第 8 回国際消化器病発生会議 (2014 年
11 月 13,14 日)

21) 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。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)、第 8 回国際消化器病発生会議 (2014
年 11 月 13,14 日)

22) 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。
Irsogladine maleate によるマウス腸発がん抑制
効果。第 8 回国際消化器病発生会議 (2014 年
11 月 13,14 日)

23) Shimizu S, Fujii G, Nakanishi R, Onuma W,
Mutoh M, Yano T. Suppression of intestinal
carcinogenesis in *Apc*-mutant mice by the
citrus limonid limonin. The 38th Annual
Scientific Meeting, Nutrition Society of
Australia. Tasmania, Australia
(Nov.26-28,2014)

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。

大腸内視鏡部会組織構築と大腸 T1 癌治療後前向き追跡調査に関する研究

担当責任者 田中信治 所属名 広島大学病院内視鏡診療科
役職名 教授

研究要旨

本邦において内視鏡的あるいは外科手術された大腸T1癌症例を前向きに集積し、1)大腸癌治療ガイドラインの内視鏡治療根治基準の妥当性、2)内視鏡的摘除後の根治基準外症例における経過観察例と追加外科手術施行例別にみた転移・再発の頻度、その特徴と予後、3)最初から外科手術を施行した症例の予後と転移・再発例の特徴、を明らかにし、大腸T1癌に対する内視鏡的摘除の適応、根治度判定、サーベイランス法を策定するために必要な大腸T1癌の長期予後から見た信頼性の高いエビデンスが構築するため、オールジャパンで大腸内視鏡部会の組織を構築し、J-CAPP Study IIのエントリーを行う施設を選定し、さらにそれをサポートするワーキンググループを構築、T1癌の治療後前向き登録追跡研究も実施する体制を整えた。

A. 研究目的

本邦において、人口の高齢化とともに本来ならば外科手術が推奨される大腸 T1 癌に対しても、高齢や合併症などを理由に内視鏡的摘除のみで経過観察を余儀なくされる症例が増加している。大腸 T1 癌に対する治療の原則はリンパ節郭清を伴う腸切除であるが、リンパ節転移率は全体でも約 10%程度である^{1),2)}。現在、大腸 T1 癌症例の集積によって、粘膜下層(SM)にある程度浸潤している病変におけるリンパ節転移リスクの極めて低い条件も明らかになりつつある³⁾⁻⁸⁾。大腸癌治療ガイドライン 2014 年度版⁹⁾では、『内視鏡的摘除後標本の病理組織学的評価にて(1)SM 浸潤度 1,000 μm 以上、(2)脈管侵襲陽性、(3)低分化腺

癌・印環細胞癌・粘液癌、(4)浸潤先進部の簇出(budding)Grade2/3 の因子を1つでも認めれば、追加治療としてリンパ節郭清を伴う腸切除を考慮する』と記載されている。ただし、この記載はリンパ節転移危険因子を 1 つでも認めれば直ちに追加外科手術をすべきという意味ではなく、種々のリンパ節転移危険因子の組み合わせから予測される転移リスクからみた根治性と患者背景(本人の意思、年齢、身体的活動度、合併症など)を総合的に比較評価し、十分なインフォームド・コンセントを得た上で慎重に追加手術の適応を決定することが必要との主旨である。大腸癌研究会プロジェクト研究「1000 μ 以深 SM 癌転移リスクの層別化(味岡洋一委員長)」にて多数例の解析結果から、1000 μm 以深癌のリンパ節転移リスクは、他の病理

組織学的リスク因子がないもの(転移率 1.4%, 95%CI 0.0-1.7%)と種類を問わず他にリスク因子が1因子以上加わったもの(転移率 11.3%)に大別されることが明らかになった。しかしながら、この条件は外科的切除、あるいは内視鏡摘除後に外科的切除がなされた大腸 T1 癌症例の解析結果に基づくものであり¹⁰⁾、微小転移や内視鏡的摘除の影響は考慮されていない。また、これまで報告されている内視鏡的摘除後長期経過観察した大腸 T1 癌の臨床経過は全て retrospective な解析から得られたものであり¹¹⁾⁻¹⁹⁾、大腸 T1 癌内視鏡的摘除後の根治判定基準の妥当性に関しては十分なエビデンスがあるとはいえないのが現状である。また、外科手術された大腸 T1 癌の経過観察中においても再発症例を認めることもあるが²⁰⁾、その頻度や再発形式は明らかとなっていない。追加外科手術後の再発に対する内視鏡的摘除の影響についてもエビデンスが乏しい²¹⁾。また、大腸 T1(SM)癌内視鏡的摘除後のサーベイランス法については、大腸癌治療ガイドライン 2014 年版⁹⁾ではサーベイランス期間は術後 5 年間を目安とし、術後 3 年以内はサーベイランス間隔を短めに設定する(3 ヶ月毎の腫瘍マーカー, 6 ヶ月毎の CT 検査, 1 年ごとの大腸内視鏡検査)ことが記載されているが、サーベイランス期間や間隔に関しては十分なエビデンスはない。

近年の内視鏡診断および治療の進歩は目覚ましく、早期大腸癌に対する内視鏡治療法としてポリペクトミー、内視鏡的粘膜切除術(endoscopic mucosal resection: EMR)が行われており、さらに内視鏡的粘膜下層剥離術(endoscopic submucosal dissection: ESD)も2012年4月に条件付きで保険収載されている。内視鏡的摘除は治療の側面のみならず、完全摘除生検(total excisional biopsy)としての診断手技としても重要な役割がある²²⁾⁻²⁴⁾。特に大腸 T1 癌に対しては深部断端陰性で完全摘除することが上記の根治判定に必要不可欠である。

本臨床研究の目的は、本邦において内視鏡的あるいは外科手術された大腸 T1 癌症例を前向きに集積し、

- 1) 大腸癌治療ガイドラインの内視鏡治療根治基準の妥当性、
 - 2) 内視鏡的摘除後の根治基準外症例における経過観察例と追加外科手術施行例別にみた転移・再発の頻度、その特徴と予後、
 - 3) 最初から外科手術を施行した症例の予後と転移・再発例の特徴
- を明らかにし、大腸 T1 癌に対する内視鏡的摘除の適応、根治度判定、サーベイランス法を策定するために必要な大腸 T1(SM)癌の長期予後から見た信頼性の高いエビデンスが構築することである。

B. 研究方法

<対象者条件>

内視鏡的あるいは外科的に切除され病理学的に最終診断された大腸 T1(SM)癌(以下、T1 癌と記載する)。

<調査方法>

前向きコホート研究:各施設倫理委員会承認後から内視鏡的あるいは外科的に切除された大腸 T1 癌症例を共同前向き試験(前向きコホート研究)として収集し解析を行う。

- 1) 病理結果にて大腸 T1 癌と診断された患者のうち、予後調査に同意の得られた患者に対し、本研究について説明文書を用いて説明を行い、文書による同意を得る。同意取得後、「症例登録票 FAX 返信用」に記載してデータセンターへ FAX し症例の登録を行う。
- 2) あらかじめ各施設に配布した「大腸 T1 癌データベース(FileMaker)」の登録項目を入力する。なお、個人情報院内連結可能匿名化の処理が事前に行われている。

- 3) 摘除標本の病理組織学的所見に基づき大腸癌治療ガイドラインに従い根治度を判定し、追加治療の有無も含めて、病理組織結果および次のサーベイランス大腸内視鏡検査の予定月を含めて、その症例の「大腸 T1 癌データベース (FileMaker)」をデータセンターに送付する。データセンターにおいて、初回治療後 10 年まで患者状況を監視する。「大腸 T1 癌データベース (FileMaker)」は各施設でも厳重に保管する。
- 4) 誤登録・重複登録が判明した場合は速やかにデータセンターへ連絡する。
- 5) 収集したデータは事務局とデータセンターで保管管理する。
- 6) 何らかの理由で中止の場合は「中止報告書」に記載のうえデータセンターへ連絡する。

< 目標症例数 >

数千症例を目指す。

(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。参加施設はすべて各施設の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。データに関して連結可能匿名化を行う。

C. 研究結果

オールジャパンで大腸内視鏡部会の組織を構築し、J-CAPP Study II のエントリーを行う施設を選定し、さらにそれをサポートするワーキンググループを構築、T1 癌の治療後前向き登録追跡研究を実施する体制を整えた。現在、プロトコルの作

成最終段階に入っており、プロトコル完成後、各施設の倫理委員会での承認を得て、症例の登録を開始する準備が整いつつある。

D. 考察

大腸内視鏡的摘除病変が pT1 癌であった場合は約 10% にリンパ節転を認めるため、内視鏡治療後の追加治療が必要か否かを判定する必要がある。以下が、大腸癌治療ガイドライン 2014 における追加治療方針である。

 垂直断端陽性の場合には外科的切除を追加することが望ましい。

摘除標本の組織学的検索で以下の一因子でも認めれば、追加治療としてリンパ節郭清を伴う腸切除を考慮する。

(1) SM 浸潤度 1,000 μm 以上

(2) 脈管侵襲陽性

(3) 低分化腺癌、印環細胞癌、粘液癌

(4) 浸潤先進部の簇出 (budding) Grade 2/3

注)

・垂直断端陽性とは、癌が粘膜下層断端に露出しているものである。

 根治基準からはずれた の(1)～(4)の条件を認めた場合の具体的対応である。注意すべき点は、
 の中の条件をひとつでも認めれば追加治療としてリンパ節郭清を伴う腸切除を行うべきであると記載されているわけではない。(2)～(4)の条件をひとつでも認めた場合は、リンパ節転移のリスクが高いため追加手術を行うべきであると考えられるが、1,000 μm 以深浸潤例 (T1b 癌) のすべてが追加手術の絶対適応になっているわけではない。T1b 癌であっても 約 9 割の症例はリンパ節転移がなく、SM 浸潤度以外のリンパ節転移危険因子、個々の症例の身体的・社会的背景、手術の合併症、術後の QOL や患者自身の意思等を十分に考慮したうえで追加治療の適応を決定することが重

要である。

実際、近年の症例の集積によって、内視鏡的摘除 pT1b 癌でもリンパ節郭清を伴う追加手術が絶対的に必要でない条件が明らかになりつつある⁷⁾⁸⁾。Nakadoi ら⁶⁾によると、脈管侵襲陽性、低分化腺癌、印環細胞癌、粘液癌、浸潤先進部の簇出(budding)grade 2/3 の条件を認めなければ、SM 浸潤度にかかわらず大腸 pT1 癌のリンパ節転移率は 1.2%程度である。同様の報告が予後の解析からもなされている¹⁸⁾。また、大腸癌研究会でのプロジェクト研究報告でも pT1b 癌でも未分化型成分を伴わない T1 癌で脈管侵襲が陰性、簇出が軽度であれば、SM 浸潤度にかかわらずそのリンパ節転移率は約 1.3%であることが明らかになっている(Data not shown)。さらに、外科手術の合併症や術後再発リスクもゼロではないし、外科的手術を施行したとしても、フォローアップ研究会による報告ではリンパ節転移を認めない pT1 癌の再発率は結腸で 0.8%、直腸で 4.1%と報告されている²⁰⁾。さらに、高齢化社会を迎えた現在、患者の年齢・基礎疾患・身体的活動度・患者の意志・人工肛門になるか否かなどの要素も十分に考慮した上で外科手術を追加するかどうかを比較検討しなくてはならない要素も多い。特に下部直腸の病変に対する Miles 手術の術後 QOL には性機能や排便排尿障害などの問題点もある。ISR で肛門が温存されても排便機能障害の問題が残るため十分な患者に対する説明が重要である。このような背景のもと、T1b 癌に対する内視鏡的摘除生検の可能性も学会で議論されるようになってきた²³⁾。ただし、内視鏡的切除技術の精度管理や内視鏡的摘除 pT1b 癌非追加手術例の長期予後のエビデンスなどがまだまだしっかりしておらず、先進施設での臨床研究の段階である。

これまでに、大規模な内視鏡的摘除大腸 pT1 癌の中・長期予後に関する前向き試験は行われておらず、本研究において「大腸 T1 癌の予後に関する多施設共同前向きコホート研究」で、「大腸

癌治療ガイドラインの内視鏡治療根治基準の妥当性を長期予後調査結果から検証する。内視鏡的摘除後の根治基準から外れる症例に関して各種病理所見別を検討し、経過観察例と追加外科手術施行例別に転移・再発の頻度、その特徴と予後を明らかにする。最初から外科手術を施行した症例の予後と転移・再発例の特徴を明らかにする。」の 3 項目に関するしっかりとしたエビデンス構築を目標に長期間の前向き研究がまさに始まったところであるが、その結果が出ることによって大腸 T1 癌に対する内視鏡的摘除後の意味のない追加手術を大幅に減じる事が可能になり、患者の QOL や医療経済に及ぼすメリットは計り知れないほど大きいと考えられる。

E. 結論

大腸 T1 癌に対する内視鏡的摘除の適応、根治度判定、サーベイランス法を策定するために必要な大腸 T1 癌の長期予後から見た信頼性の高いエビデンスが構築するため、オールジャパンで大腸内視鏡部会の組織を構築し、J-CAPP Study II のエントリーを行う施設を選定し、さらにそれをサポートするワーキンググループを構築、T1 癌の治療後前向き登録追跡研究も実施する体制を整えた。

F. 文献

- 1) 小平 進、八尾恒良、中村恭一、他. SM 細分類からみた転移陽性大腸 SM 癌の実体—アンケート調査集計報告. 胃と腸 9:1137-1142、1994
- 2) Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, Matsukuma S, Kanai T, Kurihara H, Ozawa K, Yoshimura K, Bekku S. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 127:385-394, 2004
- 3) Tanaka S, Haruma K, Teixeira CR, Tatsuta S, Ohtsu N, Hiraga Y, Yoshihara M, Sumii K,

- Kajiyama G, Shimamoto F. Endoscopic treatment of submucosal invasive colorectal carcinoma with special reference to risk factors for lymph node metastasis. *J Gastroenterol* 6:710-717, 1995
- 4) Kitajima K, Fujimori T, Fujii S, Takeda J, Ohkura Y, Kawamata H, Kumamoto T, Ishiguro S, Kato Y, Shimoda T, Iwashita A, Ajioka Y, Watanabe H, Watanabe T, Muto T, Nagasako K. Correlations between lymph node metastasis and depth of submucosal invasion in submucosal invasive colorectal carcinoma: a Japanese collaborative study. *J Gastroenterol* 39:534-543, 2004
 - 5) Okabe S, Shia J, Nash G, Wong WD, Guillem JG, Weiser MR, Temple L, Sugihara K, Paty PB. Lymph node metastasis in T1 adenocarcinoma of the colon and rectum. *J Gastrointest Surg* 8:1032-1039, 2004
 - 6) Nakadoi K, Tanaka S, Kanao H, Terasaki M, Takata S, Oka S, Yoshida S, Arihiro K, Chayama K (2012) Management of T1 colorectal carcinoma with special reference to criteria for curative endoscopic resection. *J Gastroenterol Hepatol* 27:1057-1062
 - 7) 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* 28:1269-1276, 2014.
 - 8) Iida S, Hasegawa H, Okabayashi K, Moritani K, Mukai M, Kitagawa Y. Risk factors for postoperative recurrence in patients with pathologically T1 colorectal cancer. *World J Surg* 3:424-430, 2012
 - 9) 大腸癌研究会 (編). 大腸癌研究会治療ガイドライン 医師用 2014 年版. 金原出版, 2014
 - 10) Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y, Tanaka S, Ito Y, Ajioka Y, Hamaguchi T, Hyodo I, Igarashi M, Ishida H, Ishiguro M, Kanemitsu Y, Kokudo N, Muro K, Ochiai A, Oguchi M, Ohkura Y, Saito Y, Sakai Y, Ueno H, Yoshino T, Fujimori T, Koinuma N, Morita T, Nishimura G, Sakata Y, Takahashi K, Takiuchi H, Tsuruta O, Yamaguchi T, Yoshida M, Yamaguchi N, Kotake K, Sugihara K; Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 17:1-29, 2012.
 - 11) Bories E, Pesenti C, Monges G, Lelong B, Moutardier V, Delpero JR, Giovannini M. Endoscopic mucosal resection for advanced sessile adenoma and early-stage colorectal carcinoma. *Endoscopy* 38: 231-235, 2006
 - 12) Choi DH, Sohn DK, Chang HJ, Lim SB, Choi HS, Jeong SY. Indications for subsequent surgery after endoscopic resection of submucosally invasive colorectal carcinomas: a prospective cohort study. *Dis Colon Rectum* 52:438-445, 2009
 - 13) Tateishi Y, Nakanishi Y, Taniguchi H, Shimoda T, Umemura S. Pathological prognostic factors predicting lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 23:1068-1072, 2010
 - 14) Oka S, Tanaka S, Kanao H, Ishikawa H, Watanabe T, Igarashi M, Saito Y, Ikematsu H, Kobayashi K, Inoue Y, Yahagi N, Tsuda S, Simizu S, Iishi H, Yamano H, Kudo SE, Tsuruta O, Tamura S, Saito Y, Cho E, Fujii T, Sano Y, Nakamura H, Sugihara K, Muto T. Mid-term prognosis after endoscopic resection for submucosal colorectal carcinoma: summary

- of a multicenter questionnaire survey conducted by the colorectal endoscopic resection standardization implementation working group in Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum Dig Endosc 23:190-194, 2011
- 15) Kobayashi H, Higuchi T, Uetake H, Iida S, Ishikawa T, Ishiguro M, Sugihara K. Resection with en bloc removal of regional lymph node after endoscopic resection for T1 colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 19:4161-4167, 2012
 - 16) Ikematsu H, Yoda Y, Matsuda T, Yamaguchi Y, Hotta K, Kobayashi N, Fujii T, Oono Y, Sakamoto T, Nakajima T, Takao M, Shinohara T, Murakami Y, Fujimori T, Kaneko K, Saito Y (2013) Long-term outcomes after resection for submucosal invasive colorectal cancers. *Gastroenterology* 144:551-559
 - 17) Yoda Y, Ikematsu H, Matsuda T, Yamaguchi Y, Hotta K, Kobayashi N, Fujii T, Oono Y, Sakamoto T, Nakajima T, Takao M, Shinohara T, Fujimori T, Kaneko K, Saito Y (2013) A large-scale multicenter study of long-term outcomes after endoscopic resection for submucosal invasive colorectal cancer. *Endoscopy* 45: 718-724
 - 18) Yoshii S, Nojima M, Nosho K, Omori S, Kusumi T, Okuda H, Tsukagoshi H, Fujita M, Yamamoto H, Hosokawa M. Factors associated with risk for colorectal cancer recurrence after endoscopic resection of T1 tumors. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2:292-302, 2014
 - 19) Di Gregorio C, Bonetti LR, de Gaetani C, CPedroni M, Kaleci S, Ponz de Leon M . Clinical outcome of low- and high-risk malignant colorectal polyps: results of a population- based study and meta-analysis of the available literature. *Intern Emerg Med* 9:151-160, 2014
 - 20) Kobayashi H, Mochizuki H, Morita T, Kotake K, Teramoto T, Kameoka S, Saito Y, Takahashi K, Hase K, Oya M, Maeda K, Hirai T, Kameyama M, Shirouzu K, Sugihara K. Characteristics of recurrence after curative resection for T1 colorectal cancer: Japanese multicenter study. *J Gastroenterol* 46:203-211, 2011
 - 21) Alexander Rickert, Rustam Aliyev, Sebastian Belle, Stefan Post, Peter Kienle, Georg Kähler. Oncologic colorectal resection after endoscopic treatment of malignant polyps: Does endoscopy have an adverse effect on oncologic and surgical outcomes? *Gastrointest Endosc* 79:951-960, 2014
 - 22) Kawamura YJ, Sugamata Y, Yoshino K, Abo Y, Nara S, Sumita T, Setoyama R, Kiribuchi Y, Kawano N. Endoscopic resection for submucosally invasive colorectal cancer: is it feasible? *Surg Endosc* 13:224-227, 1999
 - 23) Ozawa S, Tanaka S, Hayashi N, Nishiyama S, Terasaki M, Nakadoi K, Kanao H, Oka S, Yoshida S, Chayama K. Risk factors for vertical incomplete resection in endoscopic submucosal dissection as total excisional biopsy for submucosal invasive colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 28:1247-1256, 2013
 - 24) Asayama N, Oka S, Tanaka S, Hayashi N, Arihiro K and Chayama K (2014) Endoscopic submucosal dissection as total excisional biopsy for clinical T1 colorectal carcinoma. *Digestion JGA Special Issue 2015*[in press]
- G. 研究発表(関連する業績を含む)
1. 論文発表

- 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規模 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。

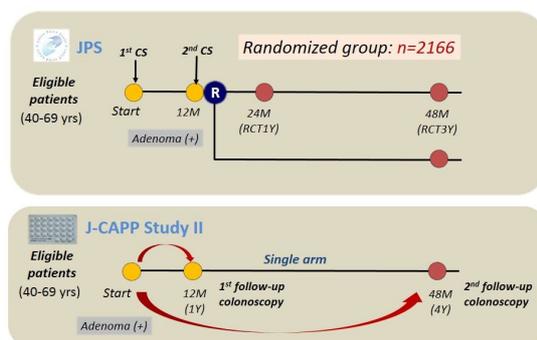
(倫理面への配慮)

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 か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-Nargel 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、橋本磨和、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、橋本磨和、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) 橋本磨和、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

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（分担）

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院

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生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ものと考えられている。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) によるグラジェント方式
- [グラジェント条件] 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ル、2-アルケナル、4-ヒドロキシ-2-アルケナ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、大腸がんの発生に關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關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關連化合物による、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關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關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。