

# NEWS LETTER

No.35 Mar. 2003

## Japanese Society For Cancer Prevention 日本がん予防研究会

### COX-2阻害剤によるハムスター膀胱発がんの抑制

西川秋佳

(国立医療品食品衛生研究所病理部)



#### 1. はじめに

膀胱癌による死亡率は、肺癌や大腸癌ほど顕著ではないにしても、男女とも年々増加している。しかも、膀胱癌は早期発見が難しいことなどの理由から、現在でも生存率の極めて低いがんの代表となっており、その一次予防に対する期待が高まっている。

*N*-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP)

誘発によるハムスター膀胱がんは、ヒト症例に類似した膀胱由来の管状腺癌であることから、膀胱がん予防物質の検索モデルとして常用されている。しかし、通常40週間以上の長い実験期間を要するため、BOPの投与を4週間に1週間隔で4回という従来の方法(図1)に変えて、1週間に4回とし、発がん修飾のエンドポイントを主として前癌病変である膀胱上皮異型的過形成の発生状況により検索する16週間の中期検索モデル(図2)を検討している。

表1に示すように、多くのヒトがん組織において誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX-2)の発現が増加することが知られており、実験動物における誘発がんをCOX-2阻害剤が抑制することも既に大腸<sup>1)</sup>、食道<sup>2)</sup>、舌<sup>3)</sup>、肝臓<sup>4)</sup>、肺<sup>5)</sup>、膀胱<sup>6)</sup>、乳腺<sup>7)</sup>、皮膚<sup>8)</sup>などの諸臓器で報告されている。今回、COX-2阻害剤の一つであるnimesulideの影響を従来の長期膀胱がんモデルおよび中期膀胱がん検索モデルを用いて検討した。

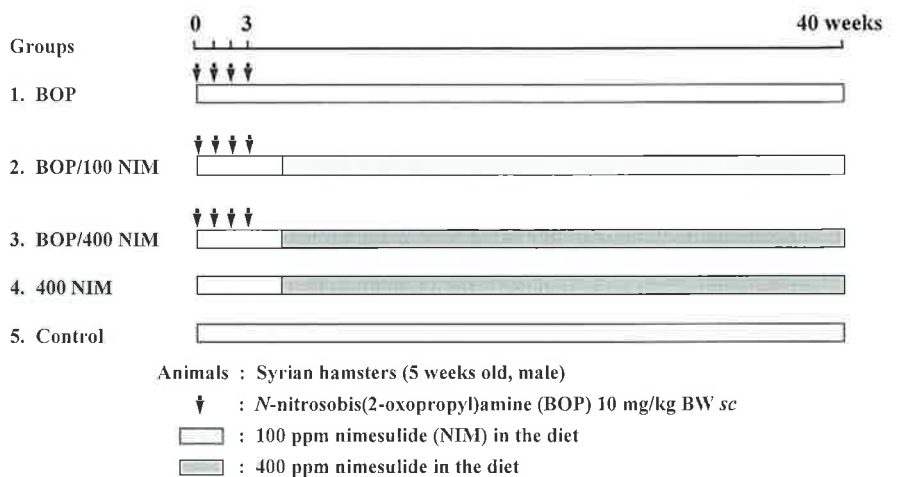
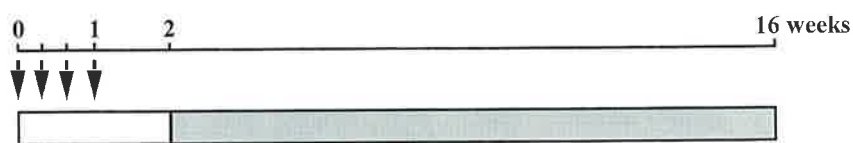


図1 従来の長期膀胱がんモデル

#### 目次

COX-2阻害剤によるハムスター膀胱発がんの抑制(西川秋佳) .....	1
DMH誘発ラット大腸発癌モデルにおける新規COX-2選択的阻害剤JTE-522の抑制作用(魏 民) .....	3
ACFに発現するGST- $\pi$ を標的とした大腸癌の化学予防(高山哲治) .....	4
大腸がんリスクに対するCD36遺伝子多型の影響(栗木清典) .....	6
緑茶飲用によるATLの発症予防—ATLハイリスクのHTLV-Iプロウイルス抑制効果(園田俊郎) .....	7
$\beta$ -クリプトキサンチン・ヘスペリジン高含有パルプによるラット舌発がん抑制(甲野裕之) .....	8
学会報告: 第一回アジア太平洋がん予防学会学術総会	
国際対がん連合(UICC)合同シンポジウム(田島和雄) .....	10



Animals : Syrian hamsters (6 weeks old, male)

Treatment : 1. Basal diet

2. 400 ppm nimesulide in the diet

▼ : BOP, 10 mg/kg BW *sc*

図2 中期膵発がん検索モデル

表1 ヒトがんにおけるCOX-2の発現と動物発がんに及ぼすCOX-2阻害の影響

COX-2発現を示す主なヒトがん	COX-2阻害による動物発がんへの影響
大腸がん	抑制
胃がん	?
食道がん	抑制
口腔・舌がん	抑制
唾液腺腫瘍	?
肝細胞がん	抑制
胆嚢・胆管がん	?
膵がん	?
肺がん	抑制
膀胱がん	抑制
前立腺がん	?
乳がん	抑制
子宮がん	?
卵巣がん	?
頭頸部がん	?
皮膚がん	抑制

## 2. 長期膵発がんモデル

雄シリアンハムスターを5群に分け、第1～3群(各30匹)にはBOPを一週間に一度計4回皮下投与し、1週後からnimesulideを0(第1群)、100(第2群)、400 ppm(第3群)の用量で36週間混餌投与した。第4及び5群には400 ppmのnimesulide混餌食及び基本食のみを同期間与えた。実験開始より40週後に剖検し、病理組織学的に検索するとともに、COX-2の発現を免疫組織化学的に検討した。

その結果、膵癌(高分化～中分化管状腺癌)の発生頻度は、第1群21/30(70%)、第2群22/30(73%)、第3群12/30(40%)であり、第3群は第1群に比べて有意に(P<0.05)減少した。膵癌の動物一匹当たりの平均個数(多発性)は、第1群0.93±0.79、第2群1.00±0.83、第3群0.57±0.77であり、同様に第3群は第1群に比べて有意に(P<

0.05)減少した。他のBOPの発がん標的臓器である肺、肝臓及び腎臓における腫瘍性病変の発生頻度には第1～3群間で減少傾向はみられるものの有意差は認められなかった。第4及び5群に腫瘍性病変は発生しなかった。免疫組織化学的に、COX-2は膵癌および肺癌にやや強い発現がみられたが、COX-2発現に及ぼす顕著なnimesulide投与の影響は認められなかった。

## 3. 中期膵発がん検索モデル

雄シリアンハムスターを5群に分け、BOPを一週間に計4回皮下投与し、1週後から第1群(20匹)には基本食のみを、第2群(20匹)には400 ppmのnimesulideを混餌投与した。実験開始より16週後に剖検し、病理組織学的に検索した。

その結果、途中死亡動物はなく、最終体重には群間差を認めなかった。基本食

群(対照群)とnimesulide投与群の膵組織を病理組織学的に検索した結果、膵癌の発生頻度および多発性は、対照群6/20(30%)および0.57±0.47、投与群4/20(20%)および0.38±0.41であり、nimesulide投与による抑制傾向がみられた。膵管上皮異型的過形成の発生頻度および多発性は、対照群14/20(70%)および2.76±1.43、投与群9/20(45%)および1.24±0.88であり、nimesulide投与により有意に(P<0.01)抑制された。

## 4. おわりに

40週間のBOP誘発ハムスター膵発がんのポストイニシエーション(プロモーション)過程におけるCOX-2阻害剤nimesulideの経口投与は、膵腺癌の発生を抑制することが判明した。この成績は、非ステロイド系消炎鎮痛剤の服用が膵がんの発生頻度と逆相関を示すとする最近の疫学調査報告<sup>9)</sup>によく一致する。また、16週間の中期膵発がん検索モデルにおいても、nimesulideの投与により膵管上皮異型的過形成の発生が抑制されたことから、本モデルが中期膵発がん検索モデルとして有用である可能性が示された。

既に多臓器において同様なデータが数多く出ているこのような論文を投稿すると、既に大腸がんでの膨大なデータがあるのにどういった新規性があるのかという、発がんを良く理解されていないレフェリーからのコメントをしばしば頂戴する。トキシコダイナミクスの点からみても、発がんのプロモーション過程は臓器特異的であることを踏まえた上でコメントを頂ければと願う今日この頃である。

## 文献

- 1) Kawamori, T. *et al.*, *Cancer Res.* 58: 409, 1998.
- 2) Li, Z. *et al.*, *Carcinogenesis* 22: 547, 2001.
- 3) Shiotani, H. *et al.*, *Cancer Res.* 61: 1451, 2001.
- 4) Denda, A. *et al.*, *Carcinogenesis* 23: 245, 2002.
- 5) Rioux, N. *et al.*, *Cancer Res.* 58: 5354, 1998.
- 6) Grubbs, C.J. *et al.*, *Cancer Res.* 60: 5599, 2000.
- 7) Nakatsugi, S. *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 886, 2000.
- 8) Fischer, S.M. *et al.*, *Mol. Carcinog.* 25: 231, 1999.
- 9) Anderson, K.E. *et al.*, *JNCI* 94: 1168, 2002.

## DMH誘発ラット大腸発癌モデルにおける新規COX-2選択的阻害剤JTE-522の抑制作用

魏 民  
(大阪市立大学大学院医学  
研究科都市環境病理学)



### はじめに

非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) は、Cyclooxygenase (COX) 活性を抑え、プロスタグランジン (PG) 合成を抑制することにより抗炎症作用を示す。COXにはCOX-1とCOX-2の2つのアイソフォームが存在することが知られており、その中で胃粘膜を保護しているのはCOX-1から産生されるPGであり、COX-2は炎症巣におけるPG産生に関与することが明らかとなっている。NSAIDs服用による胃粘膜傷害は主にCOX-1を阻害することによって生じると考えられており、近年、COX-2を選択的に阻害する抗炎症薬が開発され、より副作用が軽減された抗炎症薬として使用されるようになった。このころよりNSAIDsの長期服用者の集団では大腸癌の発生率が低いという疫学調査が報告されるようになり、また、ヒト大腸癌においてもCOX-2の過剰発現が認められるとする報告がなされ、さらに動物実験においても、大腸癌の発生にCOX-2が関係していることが明らかとなった<sup>1,2)</sup>。これらのことからCOX-2は大腸癌発生に重要な役割を果たしていることが判明し、COX-2選択的阻害剤は大腸癌の化学予防薬としても期待されるようになった<sup>3)</sup>。

JTE-522 (日本たばこ産業) は新規のCOX-2選択的阻害剤であり、COX-2に対する選択性が極めて高く、炎症性疾患治療薬として安全性の高い臨床上有用な薬剤になるものと期待されている<sup>4-6)</sup>。これまでにJTE-522はAPCノックアウト

マウスにおける小腸ポリープの発生を抑制することが報告されており<sup>7)</sup>、今回、我々はジメチルヒドラジン (DMH) 誘発ラット大腸発癌モデルにおけるJTE-522の腫瘍抑制効果について検討を行った。

### DMH誘発ラット大腸ACFに対するJTE-522の抑制効果

大腸中期発癌性試験法を用いて、大腸前癌病変マーカーであるaberrant crypt foci (ACF) の発生を指標にJTE-522がどのような作用を発揮するかを検討した。6週齢の雄性F344ラット80匹を5群に分け、第1、4群には溶媒としての0.5% CMCのみを1ml週5回、強制胃内投与し、第2群には0.5% CMCに懸濁したJTE-522を3mg/kg、第3、5群には10mg/kgの濃度を週5回、強制胃内投与した。実験開始1週間後より第1~3群にはDMH20mg/kgを週1回、合計4回皮下投与した。対照群として4、5群には生理食塩水を皮下投与した。実験開始後12週でラットを屠殺し、大腸、小腸、肝および腎の病理学的検索を行った。また大腸におけるACFの発生頻度を検索した。

実験期間中JTE-522は体重の増加に影響を与えなかった。最終体重、相対肝、腎重量においてもJTE-522処置による有意な差を認めなかった。飲水量はJTE-522高用量群 (10mg/kg) で非処置および低用量群 (3mg/kg) に比較して有意な増加が認められた。摂餌量には各群間で有意な差は見られなかった。肝、腎にはいずれの群とも特記すべき病理学的変化は認められなかった。

表1に大腸におけるACFの発生を示す。全大腸あたりのACFの数はDMH単独投与群に比べて、JTE-522高用量群で有意に減少した。また、Focusあたり1、

2、3個のaberrant crypt (AC) からなるACF数もDMH単独投与群およびJTE-522低用量群に比してJTE-522高用量群で有意に低値であった。Focusあたり4個以上のACからなるACF数についてはJTE-522投与群はDMH単独投与群に比して減少傾向が示した。これらの実験結果より、JTE-522は大腸ACFの発生を有意に抑制することが明らかとなり、この薬剤が大腸癌の発生を抑制する可能性が示された。

### DMH誘発ラット大腸腫瘍発生に対するJTE-522の抑制効果

次にこれらの大腸中期発癌性試験の結果をふまえ、我々はDMH誘発ラット長期大腸発癌モデルを用いてJTE-522の腫瘍抑制効果を検討した。6週齢の雄性F344ラットを4群に分け、実験開始1週間後よりDMHを40mg/kgの濃度で週に1回、4週間にわたり皮下投与した。第2、3群は全期間投与群とし、実験の開始時から終了時までJTE-522を0.005%または0.015%の濃度で混餌投与した。第4群はpost-initiation投与群としてJTE-522を0.015%の濃度でDMH最終投与後1週間より混餌投与した。第1群は陽性対照群としてDMH単独投与を行った。実験開始後40週で動物を屠殺し、大腸腫瘍の病理学的検索を行った。

最終体重では0.015%全期間投与群とpost-initiation投与群でDMH単独投与群に比して体重抑制が認められたが、相対肝、腎重量にはJTE-522処置による有意な差を認めなかった。前回の実験と同様、摂餌量には各群間に有意な差は見られなかったが、飲水量はJTE-522高用量群 (0.015%) で非処置群および低用量群 (0.005%) に比して有意な増加が認められた。

表1 JTE-522のDMH誘発ACFに対する抑制効果

Groups	No. of rats	Total no. of ACF/rat	No. of foci containing			
			1 crypt	2 crypts	3 crypts	≥ 4 crypts
<b>DMH (+)</b>						
1. Vehicle	20	409 ± 135	124 ± 48	137 ± 42	94 ± 40	55 ± 28
2. 3mg/kg JTE-522	20	458 ± 105	126 ± 41	157 ± 33	110 ± 24	66 ± 27
3. 10mg/kg JTE-522	20	285 ± 65*	87 ± 29*	87 ± 23*	67 ± 17*	44 ± 13
<b>DMH (-)</b>						
4. Vehicle	10	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.3	0	0
5. 10mg/kg JTE-522	10	1.0 ± 1.3	0.6 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0

\*: p < 0.01. (v. s. DMH+vehicle group)

表2 JTE-522のDMH誘発大腸腫瘍（腺腫および癌）に対する抑制効果

Treatment	No. of rats	Multiplicity	Incidence (%)
<b>DMH+</b>			
1. Basal diet	27	1.44 ± 0.85	25 (93)
2. 0.005% JTE-522	27	1.48 ± 1.05	24 (89)
3. 0.015% JTE-522	27	1.11 ± 1.19	17 (64)*
<b>DMH-</b>			
4. 0.015% JTE-522	27	1.00 ± 0.88	20 (74)

\*p &lt; 0.01 (v. s. basal diet group)

表2に大腸における腫瘍の発生を示す。大腸腫瘍（腺腫および癌）の発生率は陽性対照群に比べ0.015%全期間投与群で有意に減少した。post-initiation投与群においても減少傾向を示した。さらに、腫瘍の病理組織型別にその抑制効果を見ると、管状腺癌において、JTE-522高用量投与は全期間投与、post-initiation投与群ともに有意な抑制効果を示した。JTE-522はDMH誘発ラット長期大腸発癌モデルにおいても大腸癌抑制効果があることが確認された。

以上の結果より、JTE-522はDMH誘発ラット大腸発癌モデルにおいて発癌抑制効果を示した。今後、大腸癌の治療および化学予防薬として臨床応用が期待される。

#### おわりに

最近の報告では、COX-2は大腸癌以外の腫瘍でも過剰発現が確認されており、COX-2選択的阻害剤が、肺、皮膚、膀胱の発癌モデルにおいて抑制効果を持つことが報告されている。COX-2阻害剤の腫瘍抑制メカニズムとして、アポトーシスの誘導、血管新生抑制などが*in vitro*で示されているが依然不明な点は多く、*in vivo*における詳細な解析も今後必要と思われる<sup>8,9)</sup>。現在、我々は本実験によって得られたラット大腸粘膜からmRNAを抽出し、cDNAアレイ法による網羅的な遺伝子発現解析を行っている。JTE-522の抗腫瘍活性に関連する遺伝子群を同定することにより、COX-2阻害剤の腫瘍抑制メカニズムが明らかにされるのではと期待している。

#### 参考文献：

1. Rosenberg L. et al: J Nat Cancer Inst 83: 355-358, 1991.
2. Oshima M. et al: Cell 87: 803-809, 1996.

3. Stephen M. et al: Biochimica et Biophysica Acta 1470, M69-M78, 2000.
4. Wakitani K. et al: Jpn J Pharmacol 78: 365-371, 1998.
5. Matsushita M. et al: Inflamm Res 46: 461-466, 1997.
6. Masaki M. et al: Inflamm Res 47: 187-192, 1998.
7. Sasai H. et al: Carcinogenesis 21: 953-958, 2000.
8. Uefuji K. et al: Anticancer Res, 20, 4279-4284, 2000.
9. Fosslie, E. Review: Ann Clin Lab Sci 31, 325-348, 2001.

### ACFに発現するGST- $\pi$ を標的とした大腸癌の化学予防

高山 哲治

(札幌医科大学医学部内科学第四講座)



#### 1. はじめに

1989年Birdは発癌剤処理したマウス及びラット大腸にメチレンブルーに濃染

する微小病変を見出し、aberrant crypt foci (以下ACF)と命名した<sup>1)</sup>。これまでに、ACFは細胞増殖活性の亢進や癌遺伝子(K-rasなど)の異常などを有することが明らかにされ、実験大腸癌の発癌過程の初期病変と考えられている。ヒトにおいても、マウスやラットと同様にACFの存在が確認されている<sup>2)</sup>。我々は、大腸拡大内視鏡を用いてヒトACFを観察し、生検組織の解析を行うことにより、ACFには抗アポトーシス作用を有するGlutathione S-transferase (GST) - $\pi$ が発現することを見出した。本稿では、ACFに発現するGST- $\pi$ の意義とそれを標的とした大腸癌の化学予防について概説したい。

#### 2. 拡大内視鏡を用いたヒトACFの観察

従来、ヒトACFは大腸癌の手術摘出標本の肉眼的に正常と思われる粘膜をメチレンブルーで染色し、実体顕微鏡を用いることにより観察、同定してきた。そのため、手術を受ける大腸癌患者が対象の大部分であり、健常人や腺腫患者のACFは解析されていなかった。我々は、拡大内視鏡を用いてヒトACFを*in situ*にて観察し、健常人、腺腫患者および癌患者のACFの解析を行った(図1)。その結果、ACFの陽性率、数ともに健常人、腺腫患者、癌患者の順に有意に増加することを見出した。また、腺腫患者では腺腫の数に比例してACF数が増加すること、さらにサイズの大きいACFが増加することを見出した<sup>3)</sup>。さらに、腺腫の基部にACFが多数合併する病変を数多く見出し、ACFがヒトにおいてもadenoma-carcinoma sequenceのprecursorである可能性を指摘した。また、ACFの生検組織を用いて遺伝子解析を行い、ACFでは既にK-ras変異が高率に認められること、APC変異、 $\beta$ -catenin変異は認められないことを見出した<sup>4)</sup>。

#### 3. NSAIDsのACFに対する抑制効果

周知の如く、NSAIDsの長期服用者では大腸癌死亡率が低く、その発癌予防効果が示唆されている。そこで我々は、インフォームドコンセントの得られたACFを有する者を対象にNSAIDsの一つであるsulindacを投与したところ、ACFが有意に減少することを見出した<sup>5)</sup>。その機序を調べるために、スリダクを4日間服用したところでACFを生検しTUNEL染色を行ったところ、ACF組織には多数のTUNEL陽性細胞を認め、アポトーシスを起こしていることが明らかにされた。最近、抗アポトーシス因子

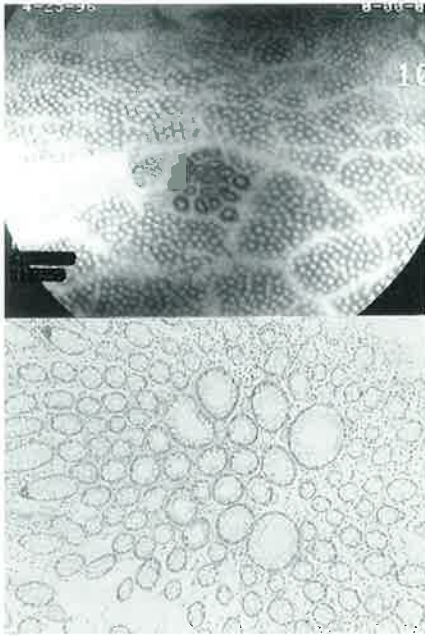


図1. ACFの拡大内視鏡所見と病理組織所見

として腺腫や癌に発現する cyclooxygenase (COX) -2が注目されていることから、我々はACFにおけるCOX-2の発現を検討したがCOX-2の発現は認められなかった。

#### 4. ACFにおけるGST- $\pi$ の発現とその意義

Bernsteinら<sup>5)</sup>は、正常大腸上皮は絶えず胆汁酸によりアポトーシスを受けて新陳代謝していること、胆汁酸への抵抗性の獲得が発癌の初期に起こることを示唆している。そこで我々は、ACFにはCOX-2以外の何らかの抗アポトーシス因子が存在し、NSAIDsはこれを阻害するのではないかと考えた。以前より大腸癌やポリープではGlutathione S-transferase (GST) - $\pi$ が発現していることが報告さ

れており、さらに、GST- $\pi$ は最近種々の細胞においてアポトーシスを抑制することが報告されている。そこでACFにおけるGST- $\pi$ の発現を検討したところ、ACFの約90%に高発現していることを見出した<sup>6)</sup>。さらに、正常二倍体細胞 (HEL) に変異K-ras 遺伝子の導入実験を行い、GST- $\pi$ がAP-1を介して誘導されていることも明らかにした。

その後、GST- $\pi$  遺伝子の導入実験を行い、GST- $\pi$  が胆汁酸誘導アポトーシスに対する抵抗性の獲得に一役を担っていること、さらに、GST- $\pi$  ノックアウトマウスではACF、ポリープ数ともに少なく、GST- $\pi$  が大腸発癌に重要な役割を果たしていることが確かめられた。

#### 5. GSTP1-1 阻害剤を用いた発癌予防

GSTは解毒酵素の一つであり、大きく $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\pi$ のアイソザイムに分けられる。この阻害剤としては古くからエタクリン酸、インドメタシン (NSAIDsの一種) などが知られている。我々は、米国Telik社との共同開発によりGSTの基質であるGlutathioneをもとに、そのSH基にmethybenzeneを、C末端にbenzeneを付加することによりGSTの $\pi$ クラスに特異的な阻害剤 $\gamma$ -Glutamyl-S-(benzyl) cysteinyl phenylglycine diethylester (GSPD) を合成した (図2)。これらの阻害剤を胆汁酸とともにACF組織に添加するといずれもアポトーシスを誘導することが確かめられた。また、ラットにアゾキシメタンを投与した後GSPDを連日投与するとACF数は有意に抑制され、このGST特異的阻害剤の発癌予防効果が示唆された。

#### 6. おわりに

現在、上記の理論を立証するために

sulindac、etodorac、placeboのrandomized double blind trialを行っている。これらの薬剤を2カ月間投与し、ACF数の変化と1年後のACF、ポリープの発生状況を見る試験である。前

述の理論が正しければ、sulindacではACFが抑制されるが、etodoracでは抑制されないことが期待される。ポリープにはGST- $\pi$ に加えてCOX-2も発現しているので、ポリープの発生は、sulindacはもとよりetodoracでも少し抑制されることが期待される。

#### 文献

1. Bird RP: Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 37: 147-141, 1987.
2. Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 22: 287-94, 1991.
3. Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H and Niitsu Y. Aberrant crypt foci as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Medicine* 1998, 339: 1277-1284.
4. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, Sato B, Takimono R, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Analysis of K-ras, APC and  $\beta$ -catenin in aberrant crypt foci in patients with adenoma and cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 121, 599-611, 2001.
5. Bernstein C, Bernstein H, Garewal H, Dinning P, Jabi R, Sampliner RE, McCuskey MK, Panda M, Roe DJ, L'Heureux L, Payne C. A bile acid-induced apoptosis assay for colon cancer risk and associated quality control studies. *Cancer Research*. 59: 2353-7, 1999
6. Miyanishi K, Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Nobuoka A, Nakajima T, Takimono R, Kogawa K, Kato J, Sakamaki S, and Niitsu Y. Glutathione transferase- $\pi$  overexpression is closely associated with K-ras mutation during human colon carcinogenesis. *Gastroenterology* 121, 865-874, 2001.

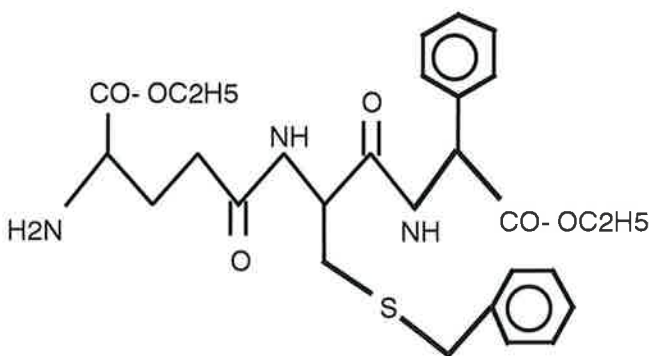


図2. GST- $\pi$  specific inhibitor ( $\gamma$ -Glutamyl-S-(benzyl) cysteinyl phenylglycine diethylester (GSPD))

#### 会員名簿について

NEWS LETTER 本号の別冊として「日本がん予防研究会会員名簿」を同封致しました。お名前・ご住所・ご所属等に変更がございましたら事務局 (FAX: 011-222-1526) までご連絡をお願い致します。また入会希望の方がいらっしゃいましたらご紹介ください。

## 大腸がんリスクに対する CD36 遺伝子多型の影響

栗木 清典

(愛知県がんセンター研究所疫学・予防部、  
日本学術振興会特別研究員 PD)



### はじめに

わが国の大腸がん罹患率や死亡率は、近年の生活習慣の欧米化による脂肪摂取の増加に伴い上昇しており、米国日系移民のこれらの率は米国白人よりもむしろ高いと報告されている。WCRF/AICR<sup>1)</sup>によれば、脂質摂取は大腸がんの possible なリスク要因である。脂質代謝において、CD36 は酸化 LDL 受容体や長鎖脂肪酸の輸送体などの機能を担っていることが最近報告された<sup>2)</sup>。アジア系民族（日本、韓国、台湾、インドネシア）の CD36 表現型欠損症（高 LDL-cholesterol 血清値）の発生率は米国白人（0.3%）より約10倍高いこと<sup>3)</sup>や、わが国の SNPs 探索から新たな CD36 遺伝子多型（A52C）が報告されている<sup>4)</sup>が、大腸がんとの関連は検討されていない。

同様に、アルコールは大腸がんの probable なリスク要因であり、その代謝に関連する ALDH2 遺伝子多型（Glu487Lys）の変異頻度はアジア系民族で高く、飲酒習慣はこの多型による影響を受ける。大腸がんリスクに対し、アルコール代謝能の低い多型（Glu/Lys+Lys/Lys）の多量飲酒は、代謝能の高い多型（Glu/Glu）より数倍高いことが示されている<sup>5)</sup>。さらに、アルコール代謝は、脂質代謝に対し、肝臓で脂肪酸のβ酸化や末梢組織での利用を抑制することが知られている。

ゆえに、がんのリスクおよび予防に対する生活習慣（環境）要因と遺伝的要因の相互作用は、多数の両要因が複雑に絡み合っているため、系統的に評価することが重要だと考える。

### 大腸がん CD36 遺伝子多型

大腸がんリスクに対する CD36 遺伝子多型の影響について、ALDH2 遺伝子多型および飲酒習慣を考慮した症例対照研究の結果から紹介する。男女ともに Glu/Glu では CD36 遺伝子多型の関連がみられなかったが、Glu/Lys + Lys/Lys では、A/A に対する C/C の直腸がんのオッズ比は男性（2.37）より女性（9.68）で高かった（表1）。低飲酒（<1回/週）者の A/A に対する高飲酒（≥5回/週）者の C/C の大腸がんのオッズ比は、約50%が高飲酒者である男性で3.77と有意に高かったが、80%以上が低飲酒者である女

性では該当者なしのためリスク評価はできなかった（表2）。これらの結果は、大腸がんリスクに対する CD36 遺伝子多型と ALDH2 遺伝子多型および飲酒習慣の相互作用を示した。つまり、大腸がんリスクの遺伝的要因を有していても、その発生には生活習慣要因が大きく影響を及ぼすことを明らかにした。

現在、脂質摂取と CD36 遺伝子多型の大腸がんリスクに対する関連を検討しているが、食事調査方法、脂質摂取量と質の評価、エネルギー摂取と消費の影響など、他にも十分考慮すべき問題点は多く残っている。また、本研究対象者の血

表1. ALDH2 遺伝子多型を考慮した大腸がんに対する CD36 遺伝子多型のオッズ比

	ALDH2 Glu/Glu		ALDH2 Glu/Lys+Lys/Lys	
	大腸がん	直腸がん	大腸がん	直腸がん
男性 A/A	1.00	1.00	1.00	1.00
A/C	1.03 (0.45-2.34)	0.88 (0.28-2.74)	0.40 (0.11-1.28)	0.28 (0.05-1.28)
C/C	1.40 (0.61-3.28)	1.10 (0.22-3.66)	1.75 (0.79-4.21)	2.37 (0.96-6.51)
女性 A/A	1.00	1.00	1.00	1.00
A/C	0.83 (0.30-2.24)	0.59 (0.13-2.27)	1.47 (0.52-4.17)	2.32 (0.62-9.59)
C/C	0.64 (0.14-1.73)	0.93 (0.20-2.67)	4.24 (1.42-20.40)	9.68 (2.13-96.10)

大腸がん（直腸がん）症例数/対照数は、男性の74(38)/116、女性の54(27)/122であり、オッズ比は年齢、喫煙および飲酒習慣を補正して算出し、95%信頼区間を示した。

表2. 飲酒頻度を考慮した大腸がんに対する CD36 遺伝子多型のオッズ比

	飲酒習慣		
	<1回/週	1-4回/週	≥5回/週
男性 A/A	1.00	2.35 (0.59-10.42)	2.03 (1.14-3.91)
A/C	1.40 (0.29-6.66)	0.99 (0.15-5.78)	2.35 (0.75-8.36)
C/C	2.83 (0.75-13.65)	2.50 (0.74-9.44)	3.77 (1.36-13.56)
女性 A/A	1.00	1.48 (0.19-8.20)	1.32 (0.48-3.72)
A/C	1.50 (0.70-3.22)	NE	1.78 (0.08-18.91)
C/C	1.42 (0.67-2.95)	2.36 (0.42-13.04)	NE

オッズ比は年齢と喫煙習慣を補正して算出し、95%信頼区間を示した（NE: Not estimate.）。

清脂質は未分析であるため、CD36遺伝子多型と血清脂質との関連を検討できないのが残念であるが、今後の興味深い課題と考えている。

## 大腸がん予防のために

最近の分子生物学の進展により、がんリスクに関連する新たな遺伝子やその多型が発見され、がん発生のメカニズムを解明する知見が次々と蓄積されている。しかし、がん予防において、遺伝的要因は変えられないため、生活習慣を改善する population strategy の実践と共に、個々人の遺伝的要因を考慮したがん予防の展開が期待されている。

大腸がんリスクに対する脂質摂取やその代謝に関連する分子疫学研究は、今後積極的に検討されると思われる。近年徐々に生活習慣の欧米化の影響を受けているアジア諸国に視野を広げ、CD36やALDH2遺伝子多型などの宿主要因をアジア系民族共通の課題として、大腸がん予防に対する生活習慣要因を検討する研究が文部科学省科研費によるがんの疫学研究領域で進行している。

## 参考文献

- 1) World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 1997.
- 2) Endemann, *et al.* J. Biol. Chem., 268: 11811-11816, 1993.
- 3) Abumrad, *et al.* J. Biol. Chem., 268: 17665-17668, 1993.
- 4) Yamamoto, *et al.* Blood, 77: 1740-1747, 1991.
- 5) JSNP. <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>
- 6) Matsuo, *et al.* J. Epidemiol., 12: 70-76, 2002.

## 緑茶飲用によるATLの発症予防 —ATLハイリスクの HTLV-Iプロウイルス抑制効果

園田俊郎、園田純一郎、小迫知弘 他  
(鹿児島大学医学部ウイルス学)



成人T細胞白血病(ATL)は、human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)がCD4+T細胞に潜伏感染し長年月の増殖と破壊をくりかえすうちに、宿主T細胞のDNA損傷がおこりATL細胞が出現して発症すると考えられている。HTLV-I感染T細胞の異常増殖にはHTLV-I Tax蛋白と細胞分裂マシンとの相互作用が必須であるが、HTLV-I感染T細胞のなかでTax遺伝子の発現を抑制しアポトーシスを誘導すればATLの発症予防ができるとおもわれる。

緑茶ポリフェノールは種々のがん細胞の増殖を抑制することがin vitro培養系でみとめられている。私たちは、緑茶ポリフェノール成分がHTLV-I Tax遺伝子

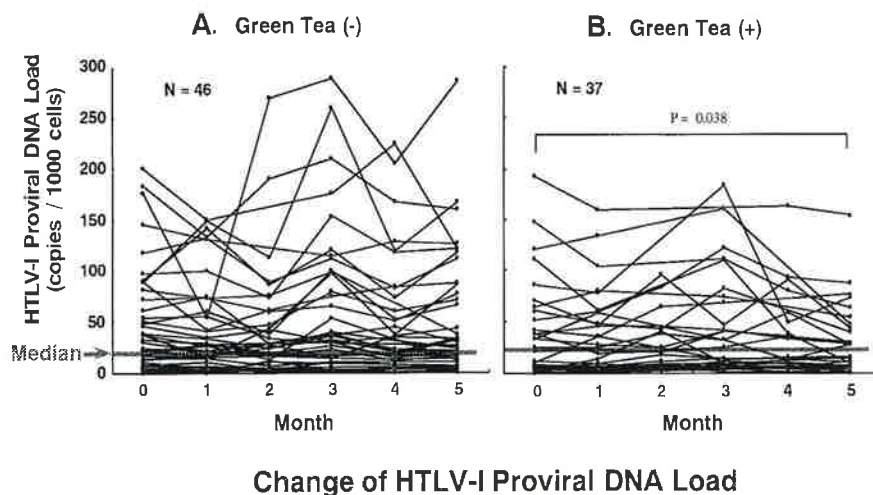
の機能を修飾しATL細胞にアポトーシスを誘導することをin vitro培養試験で確認し、緑茶によるATL発症予防の可能性について報告した(Jap J. Cancer Res. 2001)。今回の研究では、緑茶飲用によるHTLV-I抑制作用をin vivoで確認するため、HTLV-Iキャリアの協力をえてカプセル化した緑茶エキス粉末を服用してもらい、末梢血リンパ球中のHTLV-Iプロウイルス量の減少効果を測定した。HTLV-Iプロウイルスの定量はLightCyclerによるreal-time PCR測定法を採用した。被験者は鹿児島県在住のHTLV-Iキャリア101名、緑茶カプセル9錠(通常の緑茶10杯分に相当)を毎日服用、月1回末梢血7ccを献血してもらい、リンパ球DNAを分離、HTLV-IプロウイルスDNAを新規合成の特異プライマーとプローブによるPCR検出系で定量した。

被験者101名は鹿児島県HTLV-I母子感染サーベイランス事業に参加したHTLV-Iキャリアのなかから説明同意がとれた者(女性97名、男性配偶者4名)であった。被験者には毎日の生活状況(喫煙、飲酒、特定の嗜好品、健康状態、不眠や胃腸障害)を記録し採血時に提出してもらい、緑茶カプセル摂取の副作用の調査も併せておこなった。被験者101名のうち2名が緑茶カプセル摂取後に胃腸障害を訴え中止、他の16名は遠隔地のため月1回の検査通院ができず除外された。最終的には83名の被験者についての結果がまとめられている。

被験者83名のHTLV-Iプロウイルス量には2000倍以上の変動がみられ、末梢血リンパ球1000ヶあたり0.1~300コピーまでの範囲に広がっている(図1)。そ

## 年会費納入のお願い (平成15年分)

日本がん予防研究会の新年度は1月から始まります。つきましては、個人会員の方は平成15年度年会費(1~12月分5,000円)の納入をお願い申し上げます。また過年度未納分がある会員につきましては過年度分もお支払いをお願い申し上げます。なお、年会費2年間未納の場合は会員資格を失うこととなっておりますのでご留意下さい。



(図1) 緑茶カプセル服用にHTLV-Iプロウイルス量の変動

## β-クリプトキサンチン・ヘスペリジン高含有パルプによるラット舌発がん抑制

甲野裕之  
(金沢医科大学 第1病理)



### 1. はじめに

柑橘類の摂取はがん予防に有効であることが疫学研究により報告されている<sup>1)</sup>。我々のグループは従来より天然物を利用した発がんの抑制を目指し、動物を用いた基礎的研究を続けているが、特に柑橘類にはクマリン系化合物のオーラブテン<sup>2)</sup>、テルペン系化合物のオバクノン、リモニン<sup>3)</sup>、フラボン系化合物のノビレチン<sup>4)</sup>など様々な活性物質が存在している。本稿ではこれまでの研究で発がん抑制作用が報告されているカロテノイド系化合物のβ-クリプトキサンチン<sup>5,6)</sup>、およびフラボノイド系化合物のヘスペリジン<sup>7)</sup>に注目し、ヒトへの応用を考慮しβ-クリプトキサンチン・ヘスペリジン高含有パルプCHRP (0.67%β-クリプトキサンチン、3.58%ヘスペリジンを含有)を調製した(表1)。CHRPに

表1 CHRPの組成

成分	%
蛋白	39.1
脂肪	32.9
繊維	0.4
灰分	1.4
β-クリプトキサンチン	0.67
ヘスペリジン	3.58
水分	1.1

して、追跡期間5カ月中の変動幅においても固体差がみられ、50~300までの高度に変動するもの(高度変動群)、50~16までのもの(中程度変動群)、16~0.1までのもの(低変動群)の3つのグループにわけられた。このように広範囲のウイルス量をもちながら無症候性キャリアの個体が存在していることの意義を改めて注目したい。

今回の緑茶カプセル服用試験では、HTLV-Iプロウイルス量が高度に変動するもの(高度変動群)で抑制効果がみとめられた(図1B)。ここでは、緑茶カプセル服用前と服用5カ月後でHTLV-Iプロウイルス量の有意減少がみとめられた(p=0.038)。緑茶カプセル服用なしの対照群(A)ではHTLV-Iプロウイルス量が追跡期間中に大幅に変動したが、服用群(B)では小幅の変動でかつ、20~50%の減少をしめした。以上の結果から、緑茶カプセル服用によりHTLV-I感染T細胞の増殖が抑制され、これを死滅させる効果が期待された。

緑茶ポリフェノール中の有効性分はエピガロカテキンガレート(EGCg)といわれている。今回服用した9錠の緑茶カプセルにはEGCg257mgが含まれている。既報(Nakagawa *et al.*)により腸管吸収率を0.5%と見積もると、平均体重60キログラムの人ではEGCg1.3mgが体液6.7リットル中に取り込まれることになる。血液濃度は0.2ug/mlとなり極めて低濃度である。In vitro 培養試験の結果と照合する

と、緑茶カプセルで期待されるHTLV-I感染T細胞の抑制効果は高々5~10%である(図2)。今回の服用試験では5カ月間の集積効果を観察しており、in vitro 培養試験の結果と大きな矛盾はなさそうである。今後の研究課題として、(1)緑茶ポリフェノールの体内動態、(2)脱カフェイン緑茶カプセルによる副作用の軽減、(3)緑茶ポリフェノールによるHTLV-I感染T細胞のアポトーシス誘導機序の解明、などが挙げられる。

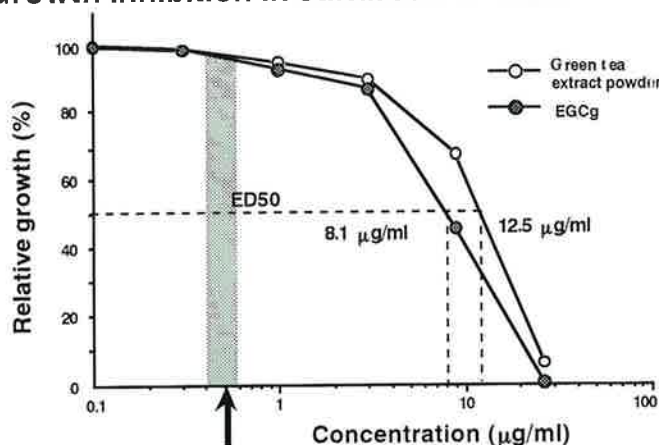
本研究の最大の眼目は、HTLV-Iプロウイルスを生物指標として緑茶ポリフェノールによるATLの化学予防の効果を短期間(5カ月)で評価する実験系を確立したことである。他のウイルス関連がん(HPV子宮がん、HBV/HCV肝がん、EBV悪性リンパ腫など)の化学予防においても起因ウイルスのDNA/RNAを指標にすれば短期間で効果判定ができるとおもわれる。

### (参考文献)

Li *et al.* Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 34-40, 2000.

Nakagawa *et al.* Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1981-1985, 1997.

### Growth Inhibition in cultured ATL cells



Estimated range of blood concentration\* after taking 9 capsules of green tea extracted powder

\* Nakagawa *et al.* *Anal. Biochem.* 1997; 248: 41-49  
Yang *et al.* *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 1998; 7: 351-354

(図2) 緑茶ポリフェノールによるATL細胞のin vitro増殖抑制



は前がん病変をバイオマーカーとした短期の実験により、ラット大腸異型腺窩巢 aberrant crypt foci の発生を抑制すること、肝、舌、大腸において第二相解毒酵素を抑制するという結果を得た。そこで、CHRPによる舌発がん修飾作用を確認するために4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 誘発ラット舌発がんモデルで検討したのでその結果を紹介したい。

## 2. 材料と方法

CHRPは株式会社愛媛柑橘資源開発研究所で作製された<sup>8)</sup>。ラット舌発がんモデルとして、20 ppmの4-NQOを雄性F344ラットに8週間飲水投与して舌腫瘍を誘発した。動物は5週齢で購入し1週間の検疫後、実験に供した。計67匹のラットを5群に分け以下の処置を行った(図1)。第1群(15匹): 4-NQO群、第2群(17匹): 4-NQO + CHRP 500 ppm群、第3群(19匹): 4-NQO → CHRP 500 ppm群、第4群(8匹): CHRP 500 ppm群、第5群(8匹): 無処置群の計5群に分けた。CHRPは基礎食(日本クレアCE-2)に混合し、混餌投与した。

CHRP 500 ppm含有飼料は実験開始より10週間(4-NQO + CHRP 500 ppm群)、22週間(4-NQO → CHRP 500 ppm群)、32週間(CHRP 500 ppm群)投与し、実験開始後32週で犠牲死後剖検し、舌腫瘍の病理組織学的解析を行った。また、舌上皮における細胞増殖活性、ポリアミン量、肝臓および舌上皮のGST、QRの第二相解毒酵素活性についても解析を行った。

## 3. 結果

ラット当たり一日摂取量に有意な差は認められなかった。また、第2群の4-NQO + CHRP 500 ppm投与群でわずかな体重減少がみられ、第1群の4-NQO投与群では肝重量の有意な増加が認められた。舌扁平上皮がんの発生頻度と発生個数(/ラット)は第1群の4-NQO群: 8/15 (53%)、 $0.53 \pm 0.50$ 、第2群の4-NQO + CHRP 500 ppm群: 5/17 (35%)、 $0.41 \pm 0.60$ 、第3群の4-NQO → CHRP 500 ppm群: 1/19 (5%)、 $0.05 \pm 0.22$ であり、第3群の4-NQO → CHRP 500 ppm群で発生頻度、発生個数とも第1群の4-NQO群

に対し有意(それぞれ $P=0.0024$ 、 $P<0.005$ )に減少していた。またCHRP 500 ppm群、無処置群はともに舌腫瘍の発生を認めなかった(図2)。舌腫瘍の背景舌上皮におけるPCNA標識率(%)は第5群の無処置群に対して、第1群の4-NQO群で有意な上昇がみられ、第3群ではPCNA標識率が正常舌上皮のレベルにまで低下していた。一方、舌粘膜のポリアミン量も第1群の4-NQO群で有意な上昇がみられ、第3群の4-NQO → CHRP 500 ppm群では正常レベルであった。さらに、肝臓、舌粘膜におけるGST活性は第3群の4-NQO → CHRP 500 ppm群で第1群の4-NQO群に対し有意な増強を示し、QR活性は肝臓で増強、舌粘膜で抑制を示した。

## 4. 考察

以上の結果から、CHRPはプロモーション相での投与により4-NQO誘発ラット舌発がんに対して抑制的に作用する。また、別の実験によりCHRP投与によりラット大腸発がんに対しても抑制的に作用することも確認している。これらの発がん抑制の機構として標的臓器における細胞増殖活性の低下が考えられた。一方、解毒酵素であるGST活性の上昇、ポリアミン量の減少が認められたことから、標的臓器での解毒酵素の修飾やポリアミンの生合成抑制なども発がん抑制に関与していると考えられる。

## 5. おわりに

野菜や果物の摂取量とがんの発生リスクには逆相関があることは疫学的に示されている<sup>9)</sup>。最近柑橘ジュースによるラット大腸発がん抑制<sup>10)</sup>、マウス肺発がん抑制<sup>11)</sup>をはじめ、柑橘類に存在するヘスペリジン、ディオスミンによる実験的誘発大腸炎の抑制<sup>12)</sup>、コレステロール代謝の修飾作用<sup>13)</sup>など興味深いデータが報告されている。これまでの発がん予防研究では天然物からの活性成分を抽出し、単一化合物としての発がん予防作用の検討を見たものが多く、活性成分を複合的に投与して検討した研究は少ない。本稿では異なる構造を持つ化合物を利用した発がん抑制の可能性を紹介した。今後は、さらなる作用機序の解明を行い、臨床試験に寄与できるような科学的裏付けを提供できるよう努力したい。

## 引用文献

1) Steinmetz, K. A. et al., Cancer Causes Con-

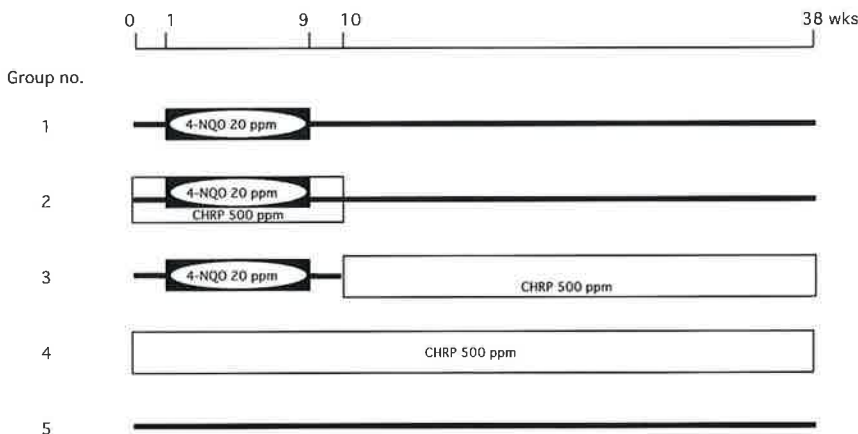


図1 実験プロトコール

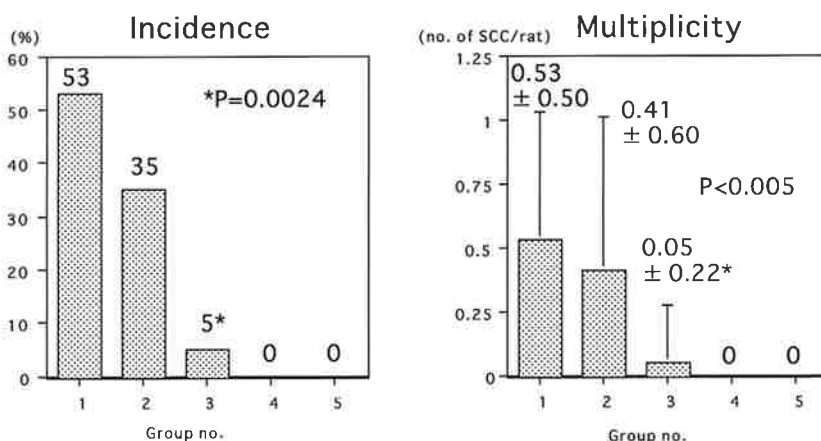


図2 舌扁平上皮がんの発生頻度・発生個数