

13 - 14 大腸がんの高危険度群を対象とするがん予防介入試験に関する研究

主任研究者 兵庫医科大学 石 川 秀 樹

研究成果の要旨

本研究では、大腸がんの高危険度群に対し3つの無作為割付臨床試験を実施した。

1) 大腸腫瘍摘除者に対する食生活介入試験：対象者219人を実験群104人、対照群102人に割付けた。介入前の実験群・対照群の背景に差はなく、生物学的受容指標においても良好な受容性が得られた。あと2年以内で完遂の予定である。

2) 大腸腫瘍摘除者に対する運動指導介入試験：211人中165人が食事指導の参加を承諾、運動負荷の除外項目に抵触しない127人中103人を無作為に運動療法・食事療法群53人と食事療法のみ群50人に割り付け、2年間の介入は完遂した。2年目の腺腫の発生率では、運動療法を行った群で有意差はないが発生はやや減少する傾向が見られた。

3) 遺伝性非ポリポース大腸がん(HNPCC)に対する発がん予防試験：HNPCC患者100人を対象に、Sアリルシステインを主成分とした熟成ニンニク抽出(AGE)カプセルによる二重盲検無作為割付介入試験を実施した。2005年3月末までに、75人に参加を呼びかけ59人(79%)の参加同意を得た。参加同意後に6人が参加を中止した。あと3年以内で完遂の予定である。

研究者名および所属施設

研究者名 所属施設および職名

石川秀樹 兵庫医科大学医学部 助手

徳留信寛 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

富田尚裕 関西労災病院 部長

野水整 星総合病院 診療部長兼主任外科部長

松浦成昭 大阪大学大学院医学系研究科 教授

平田敬治 産業医科大学医学部 助手

HNPCCにおける発がん予防に関する研究

大腸腫瘍摘除後の腫瘍予防のための食生活介入研究

病歴聴取および腫瘍組織RER解析からのHNPCCスクリーニングの検討

HNPCCの臨床的研究

HNPCCにおける細胞増殖・アポトーシス等に関する研究

HNPCCの発がん機序に関する研究

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、大腸がんの高危険度群に対して、食品成分の投与や生活習慣変容による3つの無作為割付臨床試験を実施し、大腸がん予防法を開発することである。

1) 大腸腫瘍摘除者に対する食生活介入試験 大腸

腫瘍摘除後の患者に対し、多価不飽和脂肪酸のn3/n6比を上げる食事指導による無作為割付介入試験を完遂する。

2) 大腸腫瘍摘除者に対する運動指導介入試験 大腸多発腫瘍摘除後の患者に対して、フィットネスクラブでの運動勧奨による無作為割付介入試験を完遂する。

3) 遺伝性非ポリポース大腸がん(HNPCC)に対する

発がん予防試験 HNPCC患者100人を対象に、S アリルシステインを主成分とした熟成ニンニク抽出(AGE)カプセルによる二重盲検無作為割付介入試験を実施する。それにあわせてHNPCCの実態把握と大腸背景粘膜のmRNA発現量測定による中間代理指標の開発を行う。

2 研究成果

1) 大腸腫瘍摘除者に対する食生活介入試験

徳留らにより、大腸腫瘍の内視鏡的摘除を受けた患者を対象に、実験群・対照群の無作為割付を行い、インフォームドコンセントを入手した。実験群には、a) 総脂肪摂取抑制、b) n-6PUFAs (リノール酸など)を多く含む植物油摂取の抑制、c) 魚介類摂取の勧奨、d) α -リノレン酸を多く含むしそ油摂取の勧奨、e) 魚油製剤(EPA 100mg/日+DHA 400mg/日相当量)摂取の勧奨を行っている。対照群には総脂肪摂取抑制のみを導入している。

対象者219人を実験群104人、対照群102人に割付けた(拒否13人)。介入前において、実験群・対照群の年齢、男女比、BMI、摂取エネルギー、飲酒・喫煙習慣、血清脂質(TGやHDL-C)、PT、過酸化脂質などの血液検査項目、大腸内視鏡検査結果(腫瘍の数、大きさ、性状)などには両群に差はなかった。実験群の微量抗酸化物質や食物繊維の摂取量、運動習慣、血清TCは高かったが、本研究の介入内容である総脂質、n-6PUFAs、n-3PUFAsの摂取量、脂肪エネルギー比には有意差はなく、概ね良好な無作為割付が行われた。

これまでに、実験群66人と対照群52人のエンドポイントにおいて、コンプライアンスマーカーおよび中間マーカーを評価した。実験群では、摂取エネルギー、脂質エネルギー比や食用油の摂取量が有意に減少し、青身魚由来の脂質とタンパク質が有意に増加した。脂肪酸摂取では、一価不飽和脂肪酸やリノール酸が主たる構成成分であるn-6PUFAsが有意に減少し、 α -リノレン酸、EPA、DHAで構成されるn-3PUFAsが有意に増加したことにより、n-6PUFAs/n-3PUFAsは有意に低下した。一方、対照群では脂肪酸の変化はみられなかった。

一般血液検査では、実験群のTGが有意に減少したが、対照群では血清TCや血糖値が有意に上昇した。副反応の指標として、PTや過酸化脂質などを評価したが、副反応が出現するほどではなかった。実験群において、各種脂肪酸の摂取量の変化に対応して、その血漿中濃度は有意に変化した。対照群では変化はみら

れなかった。現在、赤血球膜・S状粘膜中脂肪酸構成の分析を行っている。また、S状結腸粘膜におけるアポトシスマーカー(TUNEL、Bax、Bcl-2)や細胞増殖マーカー(Ki-67)の免疫化学組織染色の分析も継続している。

これまでのところ、良好なコンプライアンスが得られ、エンドポイントも期待される傾向が観察されている。引き続き、コンプライアンスを維持して、エンドポイントの解析に耐えうるデータの維持と管理が必要である。

2) 大腸腫瘍摘除者に対する運動指導介入試験

石川らは、大腸腫瘍摘除者に対する運動指導介入試験として、適応基準に合致した211人に参加を呼びかけ、165人(78%)が食事指導についての参加を承諾した。参加を承諾した165人のうち運動負荷に関する除外項目により除外された41人を除く127人について運動負荷療法についての無作為割付試験について再び参加を呼びかけた。103人(81%)が参加を承諾し、運動療法および食事療法をおこなう53人と食事療法のみを行う50人に無作為に割り付けされた。2年間の介入はすべて終了した。2年目の腺腫の発生率では、運動療法を行った群で有意差はないが発生はやや減少する傾向が見られた。また、運動療法を行った群の2年目の大腸背景粘膜でcyclin D1、PCNA mRNA発現が減少し、Bax mRNA発現は増加する傾向が見られた。

3) 遺伝性非ポリポーシス大腸がん(HNPCC)に対する発がん予防試験

HNPCCに対する発がん予防試験を行うための基礎検討のために下記の検討を行った。富田らは、遺伝性非ポリポーシス性大腸癌(HNPCC)の診断における病歴および臨床病理学的諸因子の重み、およびRER解析の有用性を検証し、臨床上有用なHNPCCスクリーニングのstrategyを確立するため、大阪遺伝性大腸癌研究会(代表世話人：岩永 剛先生)の中での多施設共同研究(阪神地区18施設)として、HNPCCを疑う大腸癌症例を集積し、検討を行った。

2003年7月に症例集積の完了した第2次研究の結果を踏まえて、今回の第3次研究においてはエントリー基準の一部改定を行い、改定アムステルダム基準合致例、50歳未満の若年者例、同時性あるいは異時性大腸多発癌、同時性あるいは異時性多臓器重複癌、第1度近親者に少なくとも2名のHNPCC関連癌を

有する大腸癌（HNPCC関連癌には、大腸癌、胃癌、子宮癌、小腸癌、膵癌、腎盂・尿管癌を含む）主治医がHNPCCの可能性を考える大腸癌の術前大腸癌症例のエントリーを行った。

インフォームドコンセント取得の後、手術時に摘出標本から腫瘍および正常部分を採取凍結し、DNAを抽出の後、PCR法を用いて5つのmicrosatellite marker（D2S123, D3S1067, TP53, D18S51, BAT26）でのMSI解析を行い、2つ以上陽性の場合をMSI-high、1つ陽性の場合をMSI-low、陰性の場合をMSSと判定した。エントリー項目および臨床病理学的因子とMSIとの関連について検討すると共に、アムステルダム基準合致例、およびMSI-high症例に関しては、患者に説明の上、可能な場合は別の臨床研究（菅野班（吉田班）班研究）として原因遺伝子の遺伝子診断を行った。

現時点での登録症例39例中、症例登録書（CRF）回収は34例、解析終了は37例。MSI-highは6例（16.2%）、MSI-lowは2例（5.4%）であった。現在までに2例において遺伝子診断を行い、うち1例にhMSH2遺伝子のgermline mutation（病的変異との既報告あり）が確認された。今回の第3次研究においては、それまでの第1次、第2次におけるエントリー基準の大きな項目であった本邦の臨床診断基準を敢えて削除したが、現在のところ、登録症例数は少なくなったものの、MSI-highの割合は16.2%と、2次研究の12.2%よりも上昇し、またその中からHNPCCを疑って遺伝子診断の実施に至った症例も既に2例出ている。

野水らは、遺伝性非ポリポーシス大腸癌におけるTGF β 型レセプターを中心とした免疫染色の検討を行った。対象はHNPCC13例28病変、若年者大腸癌4例、一般大腸癌21例である。免疫染色はABC法により、TGF β Rはup state 06-227、Ki67はZYMED 7B11、BAXはDAKO A3533、bcl-2はDAKO 124の抗体を使用した。TGF β Rの染色率は、一般大腸癌において、正常部で71.4%、腫瘍部で52.4%、HNPCCにおいて、正常部で28.6%、腫瘍部で28.6%、若年者大腸癌では、正常部で100%、腫瘍部で75%であった。BAXでは、一般大腸癌において、正常部で66.7%、腫瘍部で61.9%、HNPCCにおいて、正常部で64%、腫瘍部で64%、若年者大腸癌では、正常部で100%、腫瘍部で100%であった。Bcl-2では、一般大腸癌において、正常部で28.6%、腫瘍部で4.8%、HNPCCにおいて、正常部で3.6%、腫瘍部で3.6%、若年者大腸癌では、正常部で0%、腫瘍部で0%

であった。Ki67 labeling index(Ki67-LI)では、一般大腸癌において、77.8%、HNPCCにおいて、19.2%、若年者大腸癌では、80%であった。一般大腸癌に比較し、HNPCCでのKi67の染色性が有意に低く、HNPCCの予後を良好にしている一因は、細胞増殖能が低いことが関係している可能性も考えられた。さらに野水らは、HNPCCの遺伝子変異検出率を上げるためにMultiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法を行い、HNPCC家系で、これまでに見いだすことのできなかったhMLH1のexon4-19の欠失を見いだした。

松浦らは、HNPCCにおける細胞増殖・アポトーシス等に関する研究として、大腸癌介入試験における分子生物学的バイオマーカー測定に関する基礎的研究を行った。本研究の関連プロジェクトである小麦ふすま、乳酸菌製剤および運動負荷の介入試験において採取された大腸粘膜生検サンプルを材料にして、多数の分子マーカーを検討し、サンプル中の保存状態、安定性、再現性ならびに結果の有意性からcyclin D1、PCNA (proliferating cell nuclear antigen) およびBax mRNA発現の測定が最も有効であることを明らかにした。介入の有無にかかわらず、大腸腫瘍の既往歴のある患者の大腸粘膜生検サンプルでCyclin D1あるいはPCNAのmRNA発現高値症例およびBax mRNA発現低値症例では異型度の強い腺腫が発生するリスクが2倍程度に増加する結果が得られた。また、これらのmRNA発現レベルと喫煙、アルコール摂取を初めとする種々の生活習慣との間には有意な相関が見られた。中間代理指標として非腫瘍部である大腸粘膜上皮を採取し、そのmRNAを評価するのは技術的にも容易で、定量性、客観性にも優れているので、将来、大腸腺腫、さらには大腸癌の代理マーカーとして側定することが期待できると考えられた。

平田らは、1,2-dimethylhydrazine (DMH)によるラット大腸発癌モデルを用いて、AGEの発癌抑制効果を検討した。5週齢の雄SDラット60匹をcontrol群(n=12)、AGE単独投与群(n=12)、1,2-dimethylhydrazine (DMH)単独投与群(n=18)、DMHおよびAGE投与群(n=18)の4群に分けた。AGE投与群には4%のAGEを配合したペレットを経口投与し、AGE非投与群にはCE-2基本飼料を与えた。DMH投与群には実験開始2週間後よりDMH(20mg/kg)を週1回20週間皮下投与し、DMH非投与群には生理食塩水を皮下投与した。DMH投与開始から25週目に全ラットを屠殺

し、体重、各種臓器重量、大腸腫瘍の発生頻度、大腸aberrant crypt foci (ACF)の発生頻度の検討、HE染色による病理組織学的診断、非腫瘍部粘膜のKi-67(MIB-5)、ssDNA、Bax免疫染色を行った。飼料摂取量は各群間で有意差が無かった。体重、肝重量および相対肝重量はDMH投与で減少したが、脾重量はDMH投与で増加した。DMH非投与群は両群共に大腸腫瘍が発生しなかったが、DMH単独群では 3.7 ± 1.0 個 (mean $\pm$ S.D)、発生率93.3%と腫瘍を認めた。DMH+AGE群でも 1.0 ± 1.0 個、発生率66.7%と腫瘍が認められたが、平均個数はDMH単独群と比較して有意 ($p=0.0081$)に減少していた。DMH非投与群は両群共に大腸ACFの発生を認めなかったが、DMH単独群では 273.3 ± 106.0 個、DMH+AGE群では 141.6 ± 75.2 個のACFが発生し、両群間に有意差 ($p<0.0001$)を認めた。MIB-5 indexもDMH単独群が $37.8 \pm 9.0\%$ 、DMH+AGE群が $22.9 \pm 8.3\%$ と、AGE投与により有意 ($p<0.0001$)に低下した。ssDNA免疫染色によるapoptosis indexはDMH単独群が $0.86 \pm 0.36\%$ 、DMH+AGE群が $0.74 \pm 0.34\%$ と、AGE投与により低下する傾向があったが、Bax陽性細胞はDMH単独群が $26.4 \pm 10.0\%$ 、DMH+AGE群が $33.5 \pm 12.9\%$ と、AGE投与により増加する傾向があった。これらのことより、AGEはDMH投与による大腸発癌を抑制し、大腸癌の化学予防効果を持つことが示唆された。その機序として細胞増殖抑制が考えられた。

石川らはHNPCCにおける発がん予防に関する研究として、HNPCCまたはその病的変異保有者を対象とし、熟成ニンニク抽出物が大腸がんの発生を予防するか否かを、二重盲検による無作為割付臨床試験により検討した。

対象は、アムステルダム診断基準 類似基準に合致するHNPCC関連がん術後患者または、遺伝子診断にてHNPCC関連遺伝子に異常があることが判明した者である。アムステルダム診断基準 類似基準合致例とは、3名以上の血縁者がHNPCC関連がん(大腸がん、子宮内膜がん、小腸がん、腎盂・尿管がん、胃がん)に罹患しており、かつ、罹患の1名は他の2名の第一度近親者であること、少なくとも継続する2世代にわたり罹患者がいること、罹患者の1名は50歳未満で診断されていること、家族性大腸腺腫症が除外されていることのすべての条件に合致していることである。年齢は25歳以上とする。登録後、半年以内に大腸内視鏡検査を行い、大腸腫瘍の有無を確認、S

状結腸粘膜の正常部位から2カ所の粘膜採取を行った後に、試験食品の投与を開始する。割付方法は、層別化ブロックランダム法により、無作為に熟成ニンニク抽出物 (AGE) を服用するAGE群と、無機能食品を服用するNF群に分ける。AGE、は熟成ニンニク抽出液に賦形剤としてセルロースを加え乾燥した熟成ニンニクエキス粉末をカプセルに充填し、1日量である4カプセルに熟成ニンニク抽出液1.6 ml (エキス分として約480~500 mg)、セルロース735 mg、シヨ糖脂肪酸エステル11 mgを含有する。

試験開始時と終了時に全大腸内視鏡検査を実施し、大腸病変の有無を確認する。もしも、隆起性病変があった場合には、生検による組織診断を実施する。内視鏡検査時にS状結腸の2カ所より大腸粘膜採取し、mRNAの抽出を行う。それ以外に、免疫学的検査としてNK細胞活性、NK細胞数、各種免疫関連サイトカインの測定を行う。予定患者数は100人、各群50人である。呼びかけ期間は2002年1月1日~2006年9月30日であり、試験が終了するのは2008年9月30日である。試験終了後も10年間は追跡を行う予定である。

2005年3月末までに、HNPCCが疑われる患者及びその家族144人に面談を行い、家族歴既往歴の聴取や、遺伝子検査のためのカウンセリングなどを行った。その結果、93人がアムステルダム類似診断基準に合致した。内視鏡検査時期や抗がん剤の服用の有無などより、参加を呼びかけることのできない者を除く75人に参加を呼びかけ59人 (79%) の参加同意を得た。参加同意後に6人が参加を中止した。

この試験は、遺伝子診断により発癌の超高危険度群を設定し、分子生物学的指標の変化を把握することにより発癌予防効果を把握しようとする試みであり、これからの発癌予防における臨床試験のモデルになるものと考えている。

3 倫理面への配慮

すべての試験の参加者には、面接により本試験に関する詳細な説明を行い、十分な理解の上でインフォームドコンセントを得ること、試験参加者の資料に関しては厳重な管理を行い個人情報漏洩がないようにすること、試験参加中のいつでも参加者の希望により試験を中止できるような体制をとること、参加施設すべての倫理委員会の承認を得ることなどを行っている。