

## 13-15 食品中の発がん抑制要因に関する研究

主任研究者 金沢医科大学医学部 田 中 卓 二

### 研究成果の要旨

大量合成した発がん抑制候補物質の auraptene、nobiletin やその関連物質 collinin に炎症を背景とする大腸発がんを抑制することが判明した。Auraptene、nobiletin は肝細胞癌細胞株に比べ、大腸癌細胞株に低濃度で増殖抑制を示し、SV40Tag Tg ラットにおける前立腺発がん対する抑制傾向が示唆された。ショウガ抽出物 zerumbone は、DEN 誘発肝発がん抑制傾向を示した。4 種の沖縄県自生植物抽出物のヒト大腸がん細胞株に対する増殖抑制機構として G1 cell cycle arrest と apoptosis 誘導が示唆された。ブドウ種子中 procyanidine (5-10 量体混合物) の大腸発がん抑制機構として、前がん病変細胞に対する apoptosis 誘導の関与が示唆された。Auraptene に HP 感染予防、抗炎症効果を見出せなかった。

### 研究者名および所属施設

| 研究者名      | 所属施設および職名        | 分担研究課題                          |
|-----------|------------------|---------------------------------|
| 田 中 卓 二   | 金沢医科大学医学部 教授     | 食品素材中の発がん抑制要因の広範囲探索とその作用機構の解析   |
| 小 川 久 美 子 | 名古屋市立東市民病院 部長    | 発がん抑制物質による遺伝子変化                 |
| 原 明       | 岐阜大学大学院医学研究科 助教授 | 肝がん発生に対する食品中抑制要因に関する研究          |
| 酒々井 真 澄   | 琉球大学医学部 助教授      | 大腸がん発生に対する食品中の抑制要因とその作用機序に関する研究 |
| 飯 飯 正 明   | 国立がんセンター研究所 室長   | 食道がん及び大腸がん発生に対する食品中の抑制因子に関する研究  |
| 宇 都 宮 洋 才 | 和歌山県立医科大学 講師     | 消化器がん発生に対する食品中の抑制要因の検索          |

### 総括研究報告

#### 1 研究目的

本研究班の目的は、後半な食品素材から有望な発がん抑制候補物質を見出し、その抑制機構を解明することにより、臨床試験に有用な情報を提供することにある。本

年度は、柑橘由来の発がん抑制候補物質である auraptene、nobiletin の大量合成を行い、auraptene と関連物質 collinin の炎症関連大腸発がんや SV40Tag Tg ラット前立腺発がんへの影響を、auraptene、nobiletin の大腸癌・肝細胞癌細胞株での細胞周期、apoptosis への影響を、また auraptene の *H. pylori* (HP) 運動能と

HP 誘発胃炎への影響について検討した。さらにショウガ抽出物 zerumbone の肝発がんへの影響やブドウ種子中の procyanidine の発がん抑制機構について検討した。

## 2 研究成果

柑橘由来の発がん抑制候補物質である auraptene、nobiletin の大量合成を行い、合成した auraptene の炎症関連大腸発がんへの影響を新規に開発した azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS) 誘発マウス大腸発がんモデルと 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)/DSS マウス大腸発がんモデルで検討する目的で動物実験を行い、その関連物質 collinin や COX-2 阻害剤 nimesulide の効果と比較した。＜実験 1＞AOM/DSS モデル：雄性 ICR マウスに AOM (10 mg/kg 体重、単回 i.p.) 投与後、1% DSS を 1 週間飲水投与して大腸腫瘍を誘発した。Auraptene、nobiletin、collinin は、それぞれ 0.01%、0.05% の濃度で、DSS 投与終了 1 週間後より、17 週間混餌投与した。実験終了時に大腸の病理学的解析を行った。大腸腺がんの発生頻度、発生個数は、AOM/DSS 群 (10 匹) では 100%、 $3.00 \pm 1.41$  であったのに対して、AOM/DSS/0.01% auraptene 群 (10 匹) で 50% ( $P < 0.02$ )、 $1.00 \pm 1.33$  ( $P < 0.005$ )、AOM/DSS/0.05% auraptene 群 (10 匹) で 40% ( $P < 0.01$ )、 $0.60 \pm 0.84$  ( $P < 0.001$ )、AOM/DSS/0.01% collinin 群 (10 匹) で 40% ( $P < 0.01$ )、 $0.90 \pm 1.20$  ( $P < 0.005$ )、AOM/DSS/0.05% collinin 群 (10 匹) で 40% ( $P < 0.01$ )、 $0.60 \pm 0.84$  ( $P < 0.001$ ) と、auraptene、collinin の混餌投与により有意に低下した。両物質投与による抑制率はほぼ同程度で、発生個数に用量相関性の抑制をみた。なお、AOM 単独群 (5 匹)、1% DSS 単独群 (5 匹)、0.05% auraptene 単独群 (5 匹)、0.05% collinin 単独群 (5 匹)、無処置群 (5 匹) に大腸腫瘍の発生はなかった。＜実験 2 - PhIP/DSS モデル＞雄性 ICR マウスに、PhIP (200 mg/kg 体重、単回 i.g.) 後、1% DSS を 1 週間飲水投与して大腸腫瘍を誘発した。DSS 投与終了 1 週間後より、0.05% auraptene、0.05% nobiletin、0.04% nimesulide を 17 週間混餌投与し、実験終了時に大腸の病理学的解析を行った。大腸腺がんの発生頻度、発生個数は、PhIP/DSS 群 (10 匹) では 90%、 $2.60 \pm 1.65$  であったのに対して、PhIP/DSS/0.05% auraptene 群 (10 匹) で 50%、 $0.90 \pm 0.99$  ( $P < 0.02$ )、PhIP/DSS/0.05% nobiletin 群 (10 匹) で 60%、 $1.20 \pm 1.14$  ( $P < 0.05$ )、PhIP/DSS/0.04% nimesulide 群 (10 匹) で 30% ( $P < 0.01$ )、 $0.60 \pm 1.07$  ( $P < 0.005$ ) と、auraptene、nobiletin、nimesulide の混

餌投与により有意に低下した。抑制率の程度は、nimesulide > auraptene > nobiletin の順であったが、物質間に有意差はなかった。なお、PhIP 単独群 (5 匹)、1% DSS 単独群 (5 匹)、0.05% auraptene 単独群 (5 匹)、0.05% nobiletin 単独群 (5 匹)、0.04% nimesulide 単独群、無処置群 (5 匹) に大腸腫瘍の発生をみなかった。これらの結果から、柑橘由来の発がん抑制候補物質として報告がなされている auraptene、nobiletin は、炎症を背景とする大腸発がんをも抑制することが判明した。さらに、auraptene の関連化合物である collinin についても同様に炎症関連大腸発がんを抑制することが明らかとなった。その抑制程度は、COX-2 阻害剤 nimesulide の抑制効果に匹敵するものと考えられた (田中)。

Auraptene、nobiletin の大腸癌及び肝細胞癌細胞株における細胞周期、apoptosis への影響を検討した。ヒト大腸癌細胞株 (Caco2, DLD-1, HT29) における各化合物の  $EC_{20}$  は、nobiletin が各々  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  M、auraptene が  $10^{-5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M で、ヒト (HepG2) およびラット (MHC1) 肝細胞癌細胞株においてはいずれも  $10^{-3}$  M であったのに比べ低濃度で、ヒト大腸癌細胞株が高感受性であることが示唆された。Auraptene は DLD-1 でわずかに apoptosis を誘導する傾向を示したが、nobiletin や他の細胞では明らかな誘導はなく、細胞周期にも、明らかな変化を来さなかった。別に、プロバシンをプロモーターに持つ SV40Tag Tg ラットにおける前立腺発がんへの影響を知るため、nobiletin あるいは auraptene の 0.05% 混餌食を 15 週間投与後、屠殺剖検した。体重、前立腺相対重量、血中 testosterone 濃度や前立腺癌の発生頻度に投与による有意な影響をみなかったが、前立腺組織に対する腺癌組織の面積比を画像解析したところ、腹葉においては両化合物投与群 (nobiletin 群:  $67.3 \pm 10.3\%$ 、auraptene 群:  $71.0 \pm 8.7\%$ ) で有意差はないものの対照群 ( $77.3 \pm 4.3\%$ ) より低値を示す傾向をみ、前立腺発がんに対して抑制作用を有することが示唆された (小川)。

これまでラット大腸や口腔において発がん抑制作用が報告されているショウガ抽出物 zerumbone について、*N,N*-diethylnitrosamine (DEN) 誘発 (40 ppm、5 週間飲水投与) ラット肝発がん修飾効果を検討した。その結果、zerumbone (0.01%、0.05%) の initiation 相混餌投与により、実験開始後 7 週で単位面積  $cm^2$  当たりの前がん成病変 GST-P 陽性巣 (DEN+0.01% zerumbone 群:  $85.5 \pm 61.7$ 、0.05% zerumbone 群:  $70.7 \pm 68.3$ ) が、DEN 群 ( $105.7 \pm 44.7$ ) に比べ低下傾向を示し、また実験開始後 32 週の時点で直径 3 mm 以上の肝腫瘍の発生個数 (/匹) が zerumbone の

initiation 相(DEN+0.01% zerumbone 群:  $3.14 \pm 2.33$ 、0.05% zerumbone 群:  $2.81 \pm 1.53$ )及び promotion 相(DEN→0.01% zerumbone 群:  $2.90 \pm 2.04$ 、DEN→0.05% zerumbone 群:  $2.81 \pm 1.81$ )混餌投与で DEN 群( $3.19 \pm 1.12$ )に比べ、用量依存性に低下傾向を示したが有意差を認めなかった(原)。

ヒト大腸がん細胞株に対する増殖抑制効果が確認された4種類の沖縄県自生植物抽出物の分子生物学的作用メカニズムを解析する目的で、特に apoptosis 誘導と細胞周期に及ぼす作用を検討した。加えて、発がん抑制候補物質として知られる indole-3-carbinol(I3C)の作用についても検討した。アキノワスレ草とベニイモは HCT116 細胞株において G1 cell cycle arrest を誘導した。アキノワスレ草、ベニイモ、秋ウコン、クレソンは同細胞株に対して sub-G1 分画と核の断片化、クロマチンの凝縮を惹起した。これら抽出物の細胞増殖抑制機構として G1 cell cycle arrest と apoptosis 誘導が示唆された。I3C は HCT116 及び HT29 細胞株に対して濃度依存性に増殖を抑制、p21<sup>CIP1</sup> の mRNA 発現を誘導し、細胞周期調節に関わる分子に作用する可能性が示唆された(酒々井)。

ブドウ種子に多量に含有されるポリフェノールの一種 procyanidine は、flavan-3-ol が縮合した重合度の異なる混合物として存在し、重合度が高いほど強力な抗酸化能を有する。procyanidine によるラット大腸がん細胞 RCN-9 に対する殺細胞効果は、procyanidine 5 量体から 10 量体の混合物(PA5/10)が、エビガロカテキンガラート(EGCG)、procyanidine 1 量体(PA1)や 2 量体から 4 量体の混合物(PA2/4)より強い細胞増殖抑制を示した。PA5/10 処置細胞では、核の断片化およびクロマチンの凝縮が観察され、細胞周期への影響を FACS にて検討したところ、sub G<sub>1</sub>期の割合が PA5/10 の濃度依存性に増加し、50  $\mu$ M では約 85%と EGCG より強く apoptosis が誘導された。また、PA5/10 および EGCG 処置 RCN-9 細胞では interferon- $\gamma$  濃度が各々 1.6 倍、1.9 倍増加した。apoptosis 誘導機構として、caspase-9 および -3 の活性をそれぞれ対照の 11.4 倍、17.0 倍に著しく増大( $p < 0.01$ )させることが明らかとなり、Western blotting でも caspase 活性体の増加を確認した。以上の結果から、これまでに報告した procyanidine の AOM 誘発大腸発がん抑制機構として、前がん病変細胞に対する PA5/10 による apoptosis 誘導の関与が示唆された(飯郷)。

*H. pylori* (HP) はヒト胃がん発生の強力な promoter であり、胃粘膜における持続的な感染と炎症がその発生に関与していると考えられている。従って、HP 感染予防

と胃炎の軽減により、胃がん発生の抑制が期待できる。今年度は柑橘由来の auraptene について、1) *in vitro* での HP 運動能と、2) HP 感染スナネズミ腺胃モデルにおける HP 感染ならびに胃炎に対する効果について検討した。その結果、1) auraptene は 500  $\mu$ g/ml の濃度で、HP 運動能を 1 時間後に対照群の 25%以下に抑制した。2) HP 摂種後 10 週でスナネズミ腺胃を病理組織学的に検索したが、auraptene の混餌投与(0.01%、0.05%)では胃炎を抑制しなかった。また、auraptene 混餌投与は HP 菌量(半定量的 RT-PCR 法)にも影響しなかった。この結果から、auraptene は、HP 運動能を顕著に阻害するが、HP 感染予防、抗炎症効果には乏しいと考えられた(宇都宮)。

### 3 倫理面への配慮

動物実験にあたっては各研究者所属施設の動物実験指針に従い実験動物委員会の承認に基づき行った。動物への発がん物質の投与や屠殺時には苦痛を軽減し、動物愛護を充分考慮した。

### 研究成果の刊行発表

#### 外国語論文

1. Nishikawa, A., Tanaka, T., et al. Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 4: 373-384, 2004.
2. Nishikawa, A., Tanaka, T., et al. Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis. *Curr. Drug Metab.*, 5: 363-373, 2004.
3. Kagawa, M., Tanaka, T., et al. An acyclic retinoid, NIK-333, inhibits *N*-diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis through suppression of TGF- $\alpha$  expression and cell proliferation. *Carcinogenesis*, 25: 979-985, 2004.
4. Murakami, A., Tanaka, T., et al. Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *Int. J. Cancer*, 110: 481-490, 2004.
5. Suzuki, R., Tanaka, T., et al. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component biobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Lett.*, 210: 159-169, 2004.
6. Hirose, Y., Tanaka, T., et al. Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-*db/db* mice.

- Carcinogenesis, 25: 821-825, 2004.
7. Kohno, H., Tanaka, T., et al. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPAR $\gamma$  expression and alteration of lipid composition. Int. J. Cancer, 110: 896-901, 2004.
  8. Kohno, H., Tanaka, T., et al. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. Cancer Sci., 95: 481-486, 2004.
  9. Suzuki, R., Tanaka, T., et al. Preventive effects of powdered broccoli sprout on azoxymethane-induced rat colonic aberrant crypt foci. J. Toxicol. Pathol., 17: 119-126, 2004.
  10. Suzuki, R., Tanaka, T., et al. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci., 95: 721-727, 2004.
  11. Hosokawa, M., Tanaka, T., et al. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR $\gamma$  ligand, troglitazone, on colon cancer cells. Biochim. Biophys. Acta, 1675: 113-119, 2004.
  12. Yoshida, M., Tanaka, T., et al. Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism. Carcinogenesis, 25: 2257-2264, 2004.
  13. Suzuki, R., Tanaka, T., et al. Citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced large bowel carcinogenesis in rats. Biofactors, 21: 111-114, 2004.
  14. Tanaka, T., et al. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess  $\beta$ -catenin gene mutations and increases immunoreactivity for  $\beta$ -catenin, cyclooxygenase-2, and inducible nitric oxide synthase. Carcinogenesis, 26: 229-238, 2005.
  15. Suzuki, R., Tanaka, T., et al. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. Histol. Histopathol., 20: 483-492, 2005.
  16. Kohno, H., Tanaka, T., et al.:  $\beta$ -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. Cancer Sci., 96: 69-72, 2005.
  17. Yoshida, K., Tanaka, T., et al. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. Cancer Lett., 221: 29-39, 2005.
  18. Futakuchi, M., Ogawa, K., et al., Suppression of metastasis by nuclear factor kappaB inhibitors in an in vivo lung metastasis model of chemically induced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci., 95: 18-24, 2004.
  19. Ohnishi, H., Ogawa, K., et al., Inhibition of cell proliferation by nobiletin, a dietary phytochemical, associated with apoptosis and characteristic gene expression, but lack of effect on early rat hepatocarcinogenesis in vivo. Cancer Sci., 12: 936-942, 2004.
  20. Ogawa, K., et al., Down regulation of apoptosis revealed by laser microdissection and cDNA microarray analysis of related genes in rat liver preneoplastic lesions. Med. Mol. Morphol., 38: 23-29, 2005.
  21. Yamada, T., Ogawa, K., et al., Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor blocker synergistically suppresses chronic pancreatitis in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., in press, 2005.
  22. Sakata, K., Hara, A., Tanaka, T., et al., Dietary supplementation with a citrus antioxidant auraptene inhibits N,N-diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. Oncology, 66: 244-252, 2004.
  23. Hata, K., Hara, A., et al., Tumor formation is correlated with expression of  $\beta$ -catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. Cancer Sci., 95: 316-320, 2004.

24. Suzui, M., et al., Acyclic retinoid activates retinoic acid receptor  $\beta$  and induces transcriptional activation of p21<sup>CIP1</sup> in HepG2 human hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 3: 309-316, 2004.
25. Morioka, T., Suzui, M., et al., The modifying effects of *Peucedanum japonicum*, an herb in the Ryukyu Islands, on azoxymethane-induced colon preneoplastic lesions in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 205: 133-141, 2004.
26. Nabandith, V., Suzui, M., et al., Inhibitory effects of crude  $\alpha$ -mangostin, axanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in the rat. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 5: 427-432, 2004.
27. Einbond, L.S., Suzui, M., et al., Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 83: 221-231, 2004.
28. Shimizu, M., Suzui, M., et al., Effects of acyclic retinoid on growth, cell cycle control, the EGFR signaling pathway, and gene expression in human squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 10: 1130-1140, 2004.
29. Shimizu, M., Suzui, M., et al., Synergistic effects of acyclic retinoid and OSI-461 on growth inhibition and gene expression in human hepatoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 10: 6710-6721, 2004.
30. Yoshimi, N., Suzui, M., et al., Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Sci.*, 95: 792-797, 2004.
31. Morioka, T., Suzui, M., et al., Modifying effects of *Terminalia catappa* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Eur. J. Cancer Prev.*, in press, 2005.
32. Iigo, M., et al., Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Cytokine*, 25: 36-44, 2004.
33. Shimamura, M., Iigo, M., et al., Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, 111: 111-116, 2004.
34. Takahashi, T., Iigo, M., et al., Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development. *Cancer Sci.*, 95: 448-453, 2004.
35. Fujita, K., Iigo, M., et al., Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat. *Cancer Lett.*, 213: 21-29, 2004.
36. Nomoto, H., Iigo, M., et al., Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutr. Cancer*, 49: 81-88, 2004.
37. Fujita, K., Iigo, M., et al., Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis*, 25: 1961-1966, 2004.
38. Tsuda, H., Iigo, M., et al., Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 19: 245-263, 2004.
39. Shoda J., Utsunomiya H., et al., Genipin enhances Mrp2 (Abcc2)-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver. *Hepatology*, 39: 167-178, 2004.
40. Wang X., Utsunomiya H., et al., Calcitonin receptor gene and breast cancer: quantitative analysis with laser capture microdissection. *Breast Cancer Res. Treat.*, 83: 109-117, 2004.

## 日本語論文

1. 田中卓二. 特集 がんの化学予防：動物実験によるスクリーニング. *最新医学*, 59: 2396-2402, 2004.
2. 森 幸雄, 田中卓二, 他. イソチオシアネートとクルクミンによるラットにおける乳腺と食道抗発がん作用と代謝活性化. *Environ. Mutagen Res.*, 26: 221-231, 2004.