

14 - 9 発がんにおける炎症の役割と発がん予防に関する研究

主任研究者 熊本大学 赤池孝章

研究成果の要旨

本研究の当該年度の成果として、炎症による新規修飾塩基である 8-ニトログアニンが、真核細胞の DNA およびウイルス RNA に対して変異原性を発揮し、RNA については、C U 変異を高頻度に誘発した。一方、8-ニトログアニンが、がん細胞にヘムオキシゲナーゼ - 1 を誘導し細胞死耐性に関与することが示唆された。また、炎症反応に伴い産生される NO は AMPK および ARK5 の発現誘導や活性化を介してがん細胞の低栄養による細胞死耐性を獲得させ、がんの浸潤・転移を促進することが示された。プロスタノイドについては、アゾキシメタン誘発大腸発がんモデルを用いて、PGE2 受容体サブタイプ EP3 が大腸発がんに対して抑制的に働いていることを明らかにした。さらに、炎症・NO により大腸発がん動物モデルを確立し、植物由来の auraptene が NO による核酸塩基修飾阻害作用を介して著しい発がん予防効果を示すことを証明した。以上より、NO・プロスタノイドなどの一連の炎症性活性分子種が、がんのプロGREッション及びがんの浸潤・進展に深く関わることが示唆された。

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
赤池孝章	熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授	感染症における遺伝子損傷機構の解析
小倉勤	国立がんセンター研究所支所 室長	NO の腫瘍原性作用の解明とその抑制に関する研究
高橋真美	国立がんセンター研究所 室長	発がんにおけるプロスタノイド及び一酸化窒素の役割に関する研究
岡田太	*1 北海道大学遺伝子病制御研究所 助手 *2 山形大学大学院医学系研究科 助教授	一酸化窒素の発がん機構と予防に関する研究
傳田阿由美	奈良県立医科大学医学部 講師	線維化を伴う肝発がんモデルにおける発がん機構の研究
村上明	京都大学大学院農学研究科 助手	抗炎症性発がん抑制食品成分の究明とその作用特性の解析
島影美鈴	国立病院機構大阪医療センター 厚生労働技官	肺リンパ増殖症における Epstein-Barr ウイルスの発現

*1：平成16年4月1日～平成16年6月30日

*2：平成16年7月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

本研究においては、発がんにおける炎症の役割を解明し、その予防法の開発の基礎を築くことを目的とする。このため本年度は、各種動物モデルおよび培養細胞を用いて、炎症性分子種による発がん効果を、NO・活性酸素による遺伝子修飾（特に、8-ニトログアノシン生成）とそれに伴った生存シグナル伝達（細胞死抑制）、蛋白質・酵素（プロスタノイド産生系）・遺伝子発現異常という観点から解析した。さらに、新規の抗炎症・抗酸化物質の検索を行い、それらの発がん抑制効果とそのメカニズムを検討した。

2 研究成果

本年度の成果は以下のように要約される。

1) 炎症による新規修飾塩基である8-ニトログアノシンの生体内生成を証明した。また、8-ニトログアノシンそのものが、真核細胞のDNAおよびウイルスRNAに対して変異原性を発揮し、RNAについては、C→U変異を誘発することがわかった。さらに、8-ニトログアノシンが、肝臓がん由来細胞株HepG2細胞のグルコース飢餓により誘導される細胞死を、ヘムオキシゲナーゼ-1の誘導を介して強力に抑制し、NOによる生存シグナルに寄与していることが示唆された。また、8-ニトログアノシンおよびその関連化合物のヒト肺組織と尿中での検出・定量に成功した。

2) NO処理肝がん細胞がグルコース飢餓耐性能を獲得することを明らかにした。その機序としてNOは5'-AMP-活性化タンパク質リン酸化酵素(AMPK)をリン酸化しその活性を調節していた。iNOS欠損マウスおよび野生型マウスへのベンズピレン誘発繊維肉腫細胞は、グルコース飢餓条件下において野生型細胞ではAMPKの活性化が認められたが、iNOS欠損細胞はAMPKの活性化は認められず容易に細胞死が誘導された。新たに発見したAMPK関連酵素ARK5の過剰発現細胞のヌードマウス皮下移植の結果、コントロール細胞に比し造腫瘍性が亢進し腹膜播種や肝転移が高頻度で認められた。大腸癌臨床症例では、ARK5は腫瘍に発現し、その発現レベルは大腸がんのステージに伴い高く、特に肝転移巣で最も強かった。以上より、炎症反応に伴い産生されるNOはAMPKおよび新規AMPK関連酵素ARK5の発現誘導や活性化を介してがん細胞の低栄養による細胞死耐性を獲得させ、さらにがんの浸潤・転移を促進する新たな機能を持つことが示された。

3) EP₃ノックアウトマウスを用いてアゾキシメタン

(AOM)誘発大腸発がん実験を行ない、大腸発がんにおけるEP₃の役割について検討した。EP₃^{-/-}マウス及び野生型マウスにおけるAOM誘発大腸腫瘍の発生率は、EP₃^{-/-}マウスの方が高かった。一匹あたりの腫瘍数は、EP₃^{-/-}マウスで2.17 ± 0.51、野生型マウスで0.75 ± 0.15であり、EP₃^{-/-}マウスにおいて有意な増加が認められた(P<0.05)。また、2mm以上の腫瘍数はEP₃^{-/-}マウスにおいて有意に増加していた。EP₃受容体の欠損は、大腸発がんを促進することが明らかとなった。以上より、PGE₂受容体サブタイプEP₃は大腸発がんに対して抑制的に働いていることが示唆された。

4) これまでに家族性大腸腺腫症患者由来の培養ヒト大腸腺腫細胞が、ヌードマウスに誘発した慢性炎症を介して中分化型腺がんへと進展することを明らかにした。このヒト大腸腺腫細胞を用いて、炎症を背景とした大腸発がんには、炎症局所に生成されるNOが生体内発がん要因として貢献するものとの結論に至った。さらに、この炎症発がんを予防する化合物を探索した結果、柑橘類より単離された化合物aurapteneにヒト大腸腺腫細胞のがん化を著しく抑制する効果のあることを明らかにした。この機序として、炎症局所に発現誘導される一酸化窒素合成酵素を抑制すること。生体内に増殖する腫瘍を抑制すること。腫瘍組織への選択的蓄積もしくは移行があることを見出した。

5) 穀類に含まれる13-HOAcに、NFκBとAP-1の抑制を介する抗炎症作用を確認した。また、マウス皮膚発がん2段階試験においては、160および1600 nmolの投与で、腫瘍数を顕著に低下させた。一方、秋ウコンに含まれるNO産生抑制成分としてar-turmerone、α-およびβ-turmeroneの混合物（構造異性体）を単離した。秋ウコンには、すでに抗炎症性発がん抑制成分curcuminが含まれていることから、これらの活性と比較したところ、curcumin、ar-turmerone、α-およびβ-turmeroneのIC₅₀値はそれぞれ、13.2 μM、>100 μM（100 μMにおいて抑制率48%）、24.5 μMであった。秋ウコン中におけるα,β-turmeroneの含量はcurcuminの約2倍にも上ることから、機能的に新しい抗炎症性発がん予防物質として期待できるものと考えられる。

6) コリン欠乏アミノ酸(CDAA)食による線維化を伴うマウス・ラット肝発がんモデルにおける発がんへの関与因子を検索した。CDAA食投与ラット肝でのprostaglandin (PG) E₂ receptor subtype, EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ mRNA発現を半定量的RT-PCRにて検索した。その結果、EP₃については、CDAA食投与肝で発現亢進が見られ、

特に径5mm以上の肝腫瘍にて明らかな発現亢進を示した。EP₃の発現低下の本肝発がんへの関与が示唆された。

7) 肺がんとの鑑別が困難な肺リンパ増殖症であり、間質性肺炎を繰り返してリンパ腫に到る疾患、lymphoid interstitial pneumonia (LIP)の発症に、Epstein-Barr virus (EBV)感染が、関連している可能性が示唆された。

3 倫理面への配慮

動物実験については、各施設の動物実験倫理規定により、また、ヒトに関する研究では、各施設の倫理審査規定に則り審査・承認を得て行った。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Fang, J., Akaike, T., et al., Enhanced chemotherapeutic effect against tumor cells by heme oxygenase inhibitor combined with anticancer agents. *Int. J. Cancer*, 109: 1-8, 200.
2. Sugiura, H., Akaike, T., et al., Quantitative assessment of protein-bound tyrosine nitration in airway secretions from patients with inflammatory airway diseases. *Free Rad. Res.*, 38: 49-57, 2004.
3. Okamoto, T., Akaike, T., et al., Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 286: L198-209, 2004.
4. Yoshitake, J., Akaike, T., et al., Nitric oxide as an endogenous mutagen for Sendai virus without antiviral activity. *J. Virol.*, 78: 8709-8719, 2004.
5. Fang, J., Akaike, T., et al., Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis*, 9: 27-35, 2004.
6. Kuwahara, H., Akaike, T., et al., Antioxidative and antimutagenic activities of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) isolated from canola oil. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 219-280, 2004.
7. Gareish, K., Akaike, T., et al., SMA-doxorubicin, a new polymeric micellar drug for effective antitumor targeting. *J. Control Release*, 97: 219-230, 2004.
8. Yasuhara, R., Akaike, T., et al., Interleukin-1 β induces death in chondrocyte-like ATDC5 cells through mitochondrial dysfunction and energy depletion in a reactive nitrogen and oxygen species-dependent manner. *Biochemical J.*, 2005, in press.
9. Zaki, H. M., Akaike, T., et al., Nitric oxide-induced nitrate stress involved in microbial pathogenesis. *J. Pharmacol. Sci.*, 2005, in press.
10. Suzuki, A., Ogura, T., et al., IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324: 986-992, 2004.
11. Takamochi, K., Ogura, T., et al., Molecular analysis of the TSC1 gene in adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 46: 271-281, 2004.
12. Suzuki, A., Ogura, T., et al., Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5. *Oncogene*, 23: 7067-7075, 2004.
13. Kusakai, G., Ogura, T., et al., Strong association of ARK5 with tumor invasion and metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 23: 263-268, 2004.
14. Kusakai, G., Ogura, T., et al., ARK5 expression in colorectal cancer and its implications for tumor progression. *Am. J. Pathol.*, 164: 987-995, 2004.
15. Suzuki, A., Ogura, T., et al., ARK is a tumor invasion-associated factor downstream of Akt signaling. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 3526-3535, 2004.
16. Takahashi, M., et al., Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.*, 95: 475-480, 2004.
17. Shoji, Y., Takahashi, M., et al., Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP₃ during colon cancer development. *Gut*, 53: 1151-1158, 2004.

18. Matsubara, S., Takahashi, M., et al., Cloning of Mongolian gerbil cDNAs encoding inflammatory proteins, and their expression in glandular stomach during *H.pylori* infection. *Cancer Sci.*, 95: 798-802, 2004.
19. Hiromura M, Okada F et al., Inhibition of Akt kinase activity by a peptide spanning the beta A strand of the protooncogene TCL1. *J Biol Chem*, 279 : 53407-53418, 2004.
20. Zhao S, Okada F et al., Effect of steroids on [18F] fluorodeoxyglucose uptake in an experimental tumour model. *Nucl Med Commun.* 25: 727-730, 2004.
21. Hirai A, Okada F et al., Expression of AIE-75 PDZ-domain protein induces G(2)/M cell cycle arrest in human colorectal adenocarcinoma SW480 cells. *Cancer Lett.* 211: 209-218, 2004.
22. Hayashi E, Okada F et al., Proteomic profiling for cancer progression: Differential display analysis for the expression of intracellular proteins between regressive and progressive cancer cell lines. *Proteomics*, 2005, in press.
23. Nakae, D., Denda, A., et al., Inhibition of hepatocellular carcinomas by phenyl N-tert-butyl nitron in rats fed with a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Cancer Lett.*, 206, 1-13, 2004.
24. Yamamoto, K., Denda, A. et al., Suppressive effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 56: 145-151, 2004.
25. Higashi, K., Denda, A., et al., Genetic resistance to chemical hepatocarcinogenesis in the DRH rat strain. *Comp. Med.*, 54: 373-377, 2004.
26. Murakami, A. et al., Zerumbone, an anti-inflammatory phytochemical, induces expression of proinflammatory cytokine genes in human colon adenocarcinoma cell lines. *Biofactors*, 21, 95-101, 2004.
27. Ito, K., Murakami, A. et al., Induction of apoptosis in human myeloid leukemic cells by 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) through a mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism, *Clin Cancer Res*, 10, 2120-30, 2004.
28. Murakami, A. et al., Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice, *Int J Cancer*, 110, 481-90, 2004.
29. Sakata, K., Murakami, A. et al., Dietary supplementation with a citrus antioxidant auraptene inhibits N,N-diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis., *Oncology*, 66, 244-52, 2004.
30. Kwon, K.-H., Murakami, A. et al., Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: abrogation of pro-inflammatory gene expression, *Biochem. Pharmacol.*, 69, 395-406, 2005.
31. Shimakage, M. *et al.* Expression of Epstein-Barr virus in Langerhans' cell histiocytosis. *Human Pathology* 35:862-868, 2004.
32. Shimakage, M. Correspondence To the Editor, Expression of Epstein-Barr virus in Langerhans' cell histiocytosis. *Human Pathology* 35: 1574, 2004.

日本語論文

1. 傳田阿由美 (分担) アスピリン、予防医学辞典、松島綱治・酒井敏行・石川昌・稲寺秀邦 (編) 朝倉書店、印刷中、2005.
2. 傳田阿由美、ノックアウトマウスを用いた COX-2 の作用と抑制、がん予防食品開発の新展開、大澤俊彦 (監) シーエムシー出版、印刷中、2005.