

14 指—5 個体レベルでの発がん予知と予防に関する基盤的研究

主任研究者 愛知県がんセンター 立 松 正 衛

研究成果の要旨

各種遺伝子改変動物や短期バイオマーカーの開発、中・短期の代替発がん性試験による発がん性の検討を行った。p53 ノックアウト(KO)、OGG1 KO、Parp-1 KO マウスでは、発がん物質や標的臓器により感受性が異なり、rasH2 マウス、Hras128 ラットでは正常では見られない腫瘍の発生が観察された。遺伝子改変動物を用いた化学物質の評価には十分な注意が必要と考えられた。2種類のヘテロサイクリックアミンの混合は発がんイニシエーション活性を低下し、食品の発がん性に総合的な判断の必用性を示した。大腸炎誘発物質 dextran sulfate sodium を用いたラット大腸化学発がん早期誘発モデルの作製に成功し、 β -catenin accumulated crypt がよい指標となる事を示した。H. pylori (Hp) 感染によりスナネズミ幽門腺細胞 DNA のメチル化が亢進する事を実験的に明らかにした。Hp 感染 N-methyl-N-nitrosourea 誘発スナネズミ腺胃発がん系において、cyclooxygenase-2 阻害剤が発がん抑制的に働く事を証明した。疫学的検索と in vitro あるいは in vivo の実験より、梅エキスの胃炎あるいは胃がん抑制効果が確認された。リグナン類が Hp 運動能を抑制することを示した。

研究者名および所属施設

研究者氏名	所属施設および職名	分担研究課題
立松 正衛	愛知県がんセンター 副所長	個体レベルでの発がん予知と予防の早期判定に関する研究
福島 昭治	大阪市立大学大学院医学研究科 教授	遺伝子改変動物を用いた発がん性検出
津田 洋幸	*1 国立がんセンター研究所 部長	遺伝子改変ラットを用いた発がん予知の研究
	*2 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授	
三森 国敏	東京農工大学農学部 教授	短期発がん性試験に用いられる遺伝子改変マウスにおける発がん増強機序に関する研究
広瀬 雅雄	国立医薬品食品衛生研究所 部長	ラット中期大腸発がん試験法の開発と応用
森 秀樹	岐阜大学医学部 教授	大腸がんの発生予知とその予防に関する基礎的研究
*3 朝元 誠人	名古屋市立大学医学部 助教授	肝細胞間連絡能低下トランスジェニックラットの発がん予知への応用
*4 益谷 美都子	国立がんセンター研究所生化学部 室長	ポリ(ADP-リボース)代謝の異常とがん化との関連
中江 大	(財)佐々木研究所 部長	ラットにおける子宮体部発がんの予知と予防に関する基礎的研究
一瀬 雅夫	和歌山県立医科大学 教授	胃炎進展と発がん、その制御の可能性に関する検討
牛島 俊和	国立がんセンター研究所 部長	DNA メチル化の進行と胃がん発がんリスク
能美 健彦	国立医薬品食品衛生研究所 室長	個体レベルで見る遺伝子再編成と発がん

*1：平成14年4月1日～平成15年8月31日

*2：平成15年9月1日～平成17年3月31日

*3：平成14年4月1日～平成16年3月31日

*4：平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

種々の化学物質の発がん性は *in vitro* 遺伝毒性試験や *in vivo* 長期発がん性試験、ラット肝前がん病変である胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性巣を指標とした中期検索法や大腸前がん病変による短期検索法により検索されてきた。一方、各種の遺伝子改変動物を用いた短期代替発がん試験の提出により発がん性は評価可能であると変更された。また、動物体内でおきた遺伝子の点突然変異を検出できるようにデザインされた遺伝子改変動物も考案された。正常動物においては、個体レベルの前がん病変を指標とした短・中期検索法の、各種遺伝子改変動物においては腫瘍の早期発生の利点から前がん病変のみならず腫瘍発生を指標とした検索法の利点と限界を明確にし、ヒトがんの発生要因となりうる化学物質の発がん性の予知を目指す。また、これらの動物モデルを利用したがん予防法の検索と得られたデータのヒトへの外挿を目的とした基盤的研究を行う。

2 研究成果

A. 遺伝子改変動物による発がん性予知と予防の検索

(1) p53 ノックアウト(KO)マウス

p53 KO マウス各遺伝子型に 1 種類の発がん物質で異なる臓器に発がんを誘発する N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP, DHPN) を投与して発がん感受性と p53 遺伝子変異を検討した。実験 15 週では、20 ppm 投与群では p53 nullizygous (-/-) マウスにのみ血管腫瘍が発生し、200 ppm 投与群では、wild type (+/+) より heterozygous (+/-) の方が有意に高値であった。肺では、(-/-) マウスでは 24% (5/21) に腺がんが発生したが、(+/+) や (+/-) マウスでは、いずれも 3% (1/32) に腺腫の発生が見られたのみであった。実験 40 週、20 ppm 投与群では、血管腫瘍の発生率は、(+/+) マウスに対して (+/-) マウスでは有意に高率であった。肺腫瘍も (+/-) で増加傾向を示した。血管肉腫では 60% (12/20) に、肺腺がんでは 11.8% (2/17) に p53 遺伝子変異変異を認めた。解析可能であった (+/-) マウス腫瘍では全て野生型の allele に変異が認められた (5/5)。(-/-) マウスは、臓器に関わらず発がん性の亢進を認めしたが、(+/-) マウスの感受性亢進は、その遺伝子異常による正常 p53 の欠失とよく相関することが明らかとなった。

砒素は IARC でクラス 1 に分類されたヒトの発がん物質である。200 ppm dimethylarsinic acid (DMA) を (+/-) および (+/+) のマウスに飲料投与した結果、(+/-) では (+/+) マウスより早期にリンパ腫や肉腫が出現した。

(2) 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) KO マウス

酸化了的 DNA 障害により形成される 8-OHdG を修飾する OGG1 遺伝子 KO マウス (OGG1^{-/-} 又は OGG1^{+/-}) を用いて 200 ppm の DMA を飲水投与した。DMA 投与群で 8-OHdG

のレベルが上昇し、DMA 投与 OGG1^{-/-} 群では、悪性リンパ腫と肺腫瘍を高頻度に認めた。Phenobarbital (PB) を投与した実験では、雌 KO マウスで腫瘍発生頻度が 60% に有意に上昇した。

(3) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) KO マウス

2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) を Parp-1^{-/-}、Parp-1^{+/-}、及び Parp-1^{+/+} 雄マウス 12 週齢マウスに混餌投与し、発がん感受性を検討したが、肝腫瘍発生頻度に差は見られなかった。4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 10 ppm を飲水投与後の発がん感受性について調べたが、舌、食道、前胃腫瘍発生頻度に genotype 間の差は無かった。Parp-1 欠損は DHPN や azoxymethane 等のアルキル化剤に誘発される発がん感受性を亢進させるが、IQ や 4NQO 等の DNA に大型の付加体を形成する発がん物質の評価には有用でないことが示された。

(4) rasH2 マウス

Ethyl nitrosourea (ENU) 投与 rasH2 マウスでは、前胃扁平上皮がんの発生が高率に認められた。腫瘍組織では、ras シグナル関連因子 (マウス内在性の Ha-ras、raf、MAP3K2 等) の発現上昇が確認され、腫瘍形成増強に関与することが示唆された。DHPN を飲水投与した結果、肝血管肉腫、肺腺腫・腺がん、気管上皮の扁平化に加えて、前胃過形成・乳頭腫、尿道移行上皮過形成・乳頭腫、唾液腺導管乳頭腫・扁平上皮がんの発生も認められ、広い腫瘍スペクトラムを示した。IQ 300ppm 混餌投与では、26 週で前胃腫瘍が 11/22 (50%) に認められ、その発がん性を短期間に検出し得ることが示唆された。

(5) ヒトプロト型 c-Ha-ras Tg ラット (Hras128)

雌 Hras128 ラットに N-methyl-N-nitroso urea (MNU) を経靜脈投与することで、20 日程度で乳腺腫瘍が発生した。IQ、4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)、acrylamide を投与し、雌で 6 週観察した結果、肉眼的乳腺腫瘍発生率の増加が見られた。また、IQ 300ppm を 6 週間混餌投与した結果、乳がん発生の有意な増加が見られた。Hras128 の腹単徑部乳腺を用いた発がん物質の短期間でのスクリーニングの開発が可能であると考えられる。

(6) 新規トランスジェニック (Tg) ラットの作製

アデノウイルス (AdeX/Cre) 感染によりコンディショナルに TGFα を発現するラットに diethylnitrosamine (DEN) (40mg/kg) を投与すると GST-P 陽性巣数に有意な増加が確認され、発がん感受性の亢進が認められた。また、TGFα を強制発現した Tg ラットの肝臓では、GST-P 陽性巣の発生が確認された。しかし、c-myc および Cyclin D1 Tg ラットでは、発がん感受性の亢進は見られなかった。変異コネクシン 32 を肝臓で発現する Tg ラットでは non-Tg に比べて DEN、DHPN のいずれの物質の投与によっても肝の GST-P 陽性細胞巣は数、面積ともに有意に亢進している事が示され、発がん予知への研究

に応用可能だと考えられた。

B. 正常動物による発がん性予知と予防の検索

(1) 肝臓 GST-P 陽性巣

複数種のヘテロサイクリックアミン(HCA)のイニシエーション活性について検討した。2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) と 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-b]quinoxaline (MeIQx)の検討において、同時投与群ではMeIQx単独投与群よりもイニシエーション活性は有意に減少した。時間差投与した場合は先にPhIPを投与すると他のHCAのイニシエーション活性は抑制されることが示唆され、食品の発がん性評価の際は複合的な解析が重要であることが明らかとなった。

(2) 大腸β-catenin accumulated crypts (BCAC)

化学発がん物質投与後に大腸粘膜に見られる aberrant crypt foci (ACF) と BCAC の有用性を検討した。azoxymethane (AOM) 投与した F344 ラットにコール酸 (CHA) を投与したところ、BCAC は、AOM + CHA 投与群においては AOM + BD 投与群に比べ crypt multiplicity ($P < 0.002$) が有意に増加した。逆に ACF については、CHA 投与により発生率、サイズとも有意に減少した。AOM 高感受性 (SWR/J) と低感受性 (AKR/J) の二つの系統において BCAC と ACF、腫瘍発生状況を比較解析した。BCAC の発生率は、SWR/J が AKR/J より有意に高かった。BCAC と腫瘍の大腸区域別発生頻度は類似した傾向を示し、両系統ともに近位より遠位において多く発生した。ACF の発生率は、SWR/J の方が AKR/J よりやや低い傾向にあった。マウスの大腸発がんモデルにおいても大腸腫瘍の発生様式は ACF の発生パターンとは異なり、BCAC のものに類似しておりその短期バイオマーカーとしての有用性が示唆された。

(3) ラット中期大腸発がん試験法の確立と応用

1,2-dimethylhydrazine (DMH) と dextran sulfate sodium (DSS) を組み合わせて腫瘍性病変を最終指標とした中期大腸発がん修飾物質検出系の確立を試みた。その結果、イニシエーション後に DSS を 1 週間投与することにより、最も高頻度に多数の大腸の腫瘍性病変が発生し、本モデルが短期間で大腸発がん修飾物質を検出する試験法として応用可能であると考えられた。腫瘍発生数は ACF との間に関連性は認められなかったが、BCAC に一致した。Dextrin、indole-3-carbinol (I-3-C)、perilla oil、corn oil を用いて本モデルの修飾効果を検討したところ、修飾作用を鋭敏に検出できた。実験期間としては 10 週程度が適しており、長期間になると、腫瘍の進展により差が無くなる傾向がみられた。

(4) 子宮内膜

Donryu 系雌性ラットに *N*-ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) の単回子宮腔内投与による子宮体部発がん系を開発した。11

週齢 Donryu 系メスラットに、20 mg/kg 体重の ENNG を単回子宮腔内投与し、経時的に子宮内病変を観察した。子宮内膜増殖性病変としては、9 月齢より異型性過形成が観察され、加齢と共に進行し、12 月齢から子宮内膜腺がんが出現した。高度異型性過形成が浸潤性の高分化型子宮内膜腺がんに進展していく像から、異型性過形成が前がん病変として短期 end-point マーカーになり得ると考えられた。ENNG 投与後、4-hydroxyestradiol (4HE) を子宮腔内投与した結果、3 カ月目より異型過形成が出現し、12 カ月では腺がんの発生頻度が有意 ($p < 0.05$) に増加した。植物性リグナン hydroxymatairesinol (HMR) を混餌投与したところ、子宮内膜腺がんの発生が抑制されたが、*p*-tert-octylphenol、I-3-C では促進された。本モデルは、発がん機構に基づいた化学物質の子宮体部発がん性の予知と予防効果の検出に有用な動物モデルとなり得ることが判明した。*p44/42* 遺伝子産物の発現や活性化は、ヒトに類似した早期指標として有用であった。これらの結果より、ラット子宮体部化学発がんモデルは、子宮内膜腺がんの予知と予防について有用であると考えられた。

C. 遺伝子改変動物を用いた変異原性の検索

*gpt*ΔTg マウスを用い、発がん物質により誘発される遺伝子変異の特徴を分子レベルで検討した。マイトマイシン C (MMC) 投与により欠失変異頻度は 2.9 倍、点突然変異頻度も 1.7 倍上昇した。MMC は DNA の 2 本鎖の間にクロスリンクを作るため、複製の際に DNA の二重鎖切断を誘発し、この切断末端を連結、修復する際に欠失変異体が生成したものと考えられた。次に、HCA である aminophenylnorharman (APNH) を雄 *gpt* Δ マウスに投与した。肝の遺伝子変異率は用量相関的に増大し、20ppm 投与群において対照値の 10 倍に達した。肝臓に対する変異原性は APNH>MeIQx>PhIP の順で、肝発がん性と相関した。雄 *p53*^{-/-}、*p53*^{+/-}*gpt*Δ マウスに DHPN を 4 週間飲水投与し *gpt* 変異頻度を比較すると、肝臓において *p53*^{-/-} が *p53*^{+/-} マウスよりも約 2 倍高い突然変異頻度を示した ($P < 0.02$)。p53 の変異抑制作用には臓器特異性があり、肝臓において DHPN の変異誘発を抑制していることが示唆された。

D. 発がんにおける遺伝子発現および変異の機構解析

(1) 胃がん患者における DNA メチル化異常

DNA メチル化は、がん抑制遺伝子の不活化等を通じて発がんに関与する。非がん部でのメチル化異常と発がんリスクの相関を検討した。がん部でのメチル化異常の頻度が少なかった *ba305p22.3*, *PGAR*, *FLJ32130*, *RIKEN 2210016F16* homologue 遺伝子については、非がん部胃粘膜でのメチル化異常は認めなかった。胃がんでのメチル化異常を比較的高頻度に認めた *FLNC*、*Thrombomodulin*, *HRASLS*, *HAND1*, *LOX*, *p16*, *hMLH1* 遺伝子については、41 例中 2-5 例で、非がん部胃粘膜で

もメチル化異常を認めた。*Thrombomodulin* 遺伝子については、胃がんでのメチル化異常を認めた 16 例のうち 3 例に非がん部胃粘膜でのメチル化異常を認めた。*p16* 遺伝子については、胃がん、非がん部胃粘膜でのメチル化異常をそれぞれ 9 例、4 例認めた。非がん部でのメチル化異常が、(1) 遺伝子発現低下に重要な領域か、(2) その遺伝子の発現低下ががん化に重要か、(3) 観察したメチル化異常はゲノム内のどのような領域かなど、今後解決すべき問題点が数多くあることが判明した。多くのがん抑制遺伝子の不活化に、そのプロモーター領域 CpG island (CGI) の異常メチル化が関与することが見出されている。*p16* プロモーター領域 CGI の辺縁部では、胃がん症例の周辺正常胃粘膜の方が、非胃がん症例の正常胃粘膜よりも、高頻度にメチル化異常をもつことが確認された ($P=0.05$)。また、*HRASLS*, *FLNC*, *HAND1* 遺伝子のプロモーター領域 CGI の中心部、及び、*p41Arc* 遺伝子の非プロモーター領域 CGI でも、胃がん症例の周辺正常胃粘膜で非胃がん症例の正常胃粘膜に比較して高頻度にメチル化異常を認めた。一方、*p16*, *hMLH1* の発現に重要なプロモーター領域 CGI の中心部では、両群ともメチル化を認めなかった。以上より、胃粘膜に蓄積したメチル化異常を測定することにより、胃発がんのリスクを予測できる可能性があると考えられた。

(2) Hp 感染スナネズミにおける DNA メチル化異常

スナネズミを用いて、Hp 感染が DNA メチル化異常を誘発するか否かを検討した。Hp 感染あるいは非感染スナネズミ 幽 門 腺 腺 管 を 分 離 し た 。Methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) 解析の結果、288 個のうち、152 個が独立、49 個が CpG アイランド様配列を持っていた。これらのうち、マウス、ラット、ヒトゲノム配列と相同性をもつものがそれぞれ 31 個、1 個、2 個であった。MS-PCR 法により、20 個の CGI 様配列は、Hp 感染群の胃腺管でのみメチル化が亢進していることが示された。以上より、Hp の慢性感染により、胃腺管にメチル化が誘導されることが示され、発がんとの関係が示唆された。

E. ヒト胃がんの予防のための基礎データの集積

(1) COX-2 阻害剤によるスナネズミ腺胃発がん抑制

Hp 感染に伴う慢性胃炎から胃がん発生に至る一連の過程において、cyclooxygenase (COX)-2 の発現が上昇していることが示されている。Hp 感染スナネズミを用いた N-methyl-N-nitroso-urea (MNU) 投与胃発がん系を用いて、選択的 COX-2 阻害剤 (etodolac) 投与を行い、がんの発生における COX-2 の役割について検討した。その結果、etodolac は用量依存性に Hp 抗体価の有意な低下と胃発がん抑制効果を示し、プロモーション過程への関与が主であると考えられた。胃がん発生制御の上で COX-2 を標的とする戦略の合理性が強く示唆された。

(2) Hp 誘発胃炎および胃発がん抑制の試み

胃腸の薬として日本に伝統的に伝わる梅エキスをについて、in vitro あるいは動物実験モデルを用いて、Hp

誘発胃炎および胃がんに対して梅エキスの有効性を検討した。in vitro では、梅エキスの添加によって Hp の活発な運動の抑制が確認された。スナネズミ腺胃発がんモデルを用いた in vivo 実験より、梅エキ스는胃炎および腺胃発がんを抑制した。

(2) 植物由来リグナンによる抗 Hp 作用

ウメエキスが Hp 運動能を抑制することから、植物に含まれる化学物質として、種々のリグナン類による Hp 運動能と増殖能を比較検討した。ある種のリグナンは、強力に Hp 運動能を抑制し、増殖阻止に働くものもあった。活性と構造を比較検討すると、基本骨格に結合する側鎖の構造と位置により、その活性が左右されることが明らかとなった。

F. ヒトがんの予防のための臨床データの集積

Hp 感染と胃炎進展、胃がん発生に至る各段階について検討し胃がん発生の制御について検討した。血清ペプシノゲン (PG) I、II 値と抗 Hp IgG 抗体価の両血液検査の結果を用いる事で、慢性萎縮性胃炎を進展度に応じて A 群 [健康群、HP(-)&PG(-)]、B 群 [HP 感染成立群、HP(+)&PG(-)]、C 群 [萎縮性胃炎群、HP(+)&PG(+)]、D 群 [高度に腸上皮化生を合併した化生性胃炎群、HP(-)&PG(+)] の 4 群にグループ化した。A 群では胃がんの発生は認められなかったが、B 群では 19 例 (罹患 107/100,000 person year)、C 群では 24 例 (同 238/100,000)、D 群では 2 例 (同 871/100,000) であり、罹患率も hazard ratio も共に有意に段階的な増加を示した。

Hp 以外の環境因子 (アルコール、塩分摂取量等) 内視鏡所見、病理組織学的所見、血清 Hp IgG 抗体価、Pgl/II 値、血中サイトカインを比較検討した。また、古来より胃炎に卓効があるとされてきた梅の実の CAG 抑制効果について併せて検討を行った。血清 IL-8 レベルは Hp 感染群で有意に高く、萎縮性胃炎が進展する傾向にあった。

3. 倫理面への配慮

動物は必要最小限の頭数を用いるよう十分な準備を行ったうえで開始し、各施設の実験動物取り扱い規定、米国国立衛生研究所 (NIH) が推奨している動物倫理に関するガイドラインに準拠して実験を実施した。ヒトの材料についてはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従い、各施設倫理委員会の了承のもと、informed consent を得て施行し、個人情報厳重管理下においた。