

14-8 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

これまでの成果として、炎症による新規修飾塩基である 8-ニトログアニンが変異原性を発揮し、高頻度にG→T変異を誘発することが明らかとなった。また、ヒト尿中の 8-ニトログアニンおよび 8-ニトロキサンチンの検出に成功し、そのレベルは喫煙により有意に上昇していた。一方、培養細胞において、NO産生に依存した各種 8-ニトログアニン関連化合物、特に、全く新規の 8-ニトロ-cGMPの生成を証明した。さらに、8-ニトログアニンの修復酵素と考えられる脱ニトロ化酵素の存在が示唆された。なお、8-ニトロ-cGMPは、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された。また、NOが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。実際、iNOS阻害剤ONO-1714が、AOM誘発ラット大腸腫瘍の増殖抑制効果を示した。プロスタノイドについては、アゾキシメタン誘発大腸がんモデル、および、DMBA、TPA誘発皮膚がんを用いて、PGE₂受容体サブタイプEP₃が発がん過程において重要な役割を演じていることを明らかにした。さらに、炎症・NOにより大腸がんモデルを確立し、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。さらに今回初めて、沖縄産秋ウコン由来のturmerone、および、ミョウガ科植物由来のaframodial、galanal A・Bに強力な抗炎症、抗iNOS作用を見出した。特に、turmeroneは、有効抗炎症濃度において明かな細胞毒性を示さず、今後のがん予防への応用が期待された。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、がんのプログレッション及びがんの浸潤・進展に深く関与す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	* ¹ 熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授 * ² 教授	感染炎症における遺伝子損傷機構の解析
小倉 勤	* ³ 国立がんセンター研究所支所 室長 * ⁴ 北陸大学薬学部 教授	NOの腫瘍原性作用の解明とその抑制に関する研究 動物発がんモデルでの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	* ⁵ 北海道大学遺伝子病制御研究所 助手 * ⁶ 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 一酸化窒素による大腸発がん予防に関する研究
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	* ⁷ 国立病院機構大阪医療センター 厚生労働技官 * ⁸ 国立病院機構 和歌山病院 医師	肺リンパ増殖症におけるEpstein-Barrウイルスの発現 肺リンパ増殖症におけるEpstein-Barrウイルスの発現とマクロファージの関与

*1:平成16年4月1日～平成17年6月30日

*2:平成17年7月1日～平成18年3月31日

*3:平成16年4月1日～平成17年3月31日

*4:平成17年4月1日～平成18年3月31日

*5:平成16年4月1日～平成16年6月30日

*6:平成16年7月1日～平成18年3月31日

*7:平成17年4月1日～平成17年5月31日

*8:平成17年6月1日～平成18年3月31日

総合研究報告

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、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-ニトログアニン生成）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 研究方法

1) 抗8-ニトログアニン抗体の immunoaffinity column と HPLC 電気化学検出法を用いて、ヒト尿中および細胞培養系での 8-ニトログアニン関連化合物の検出・定量を行った。

また、gpt 遺伝子を組み込んだ CHO 細胞である AS52 細胞を 8-ニトログアニンで処理してその変異原性を解析した。さらに、各種細胞の培養系に 8-ニトログアニン関連化合物を添加して、グルコース飢餓による細胞死に与える影響と 8-ニトログアニン関連化合物の分解を検討した。

2) 膵臓がん細胞株および肝細胞がん細胞株 HepG2 細胞のグルコース飢餓による細胞死誘導における NO の細胞保護効果について、特に、5' -AMP-活性化タンパク質リン酸化酵素 (AMPK) に焦点をあて解析した。さらに、iNOS 欠損マウスおよび野生型マウスのベンズピレン誘発繊維肉腫細胞における AMPK 発現と転移・浸潤能について検討した。また、ヒト大腸がん組織における AMPK 発現についても解析した。

3) 炎症発がんのメカニズムの一つとして、既に、NO による HIF-1 α 発現と VEGF の誘導を介する血管新生を明らかにしている。そこで今回、NO 処理後の神経膠腫細胞株 A172 細胞における HIF-1 α mRNA 発現に対するの鉄イオン化合物、クエン酸鉄アンモニウムの影響を検討した。

4) 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、および、DMBA、TPA 誘発皮膚発がんにおける EP₃ の役割について検討した。

5) AOM 誘発ラット大腸発がんモデルに、iNOS 阻害剤 ONO-1714 を投与し、大腸発がんにおける NO の役割について検討した。

6) 家族性大腸腺腫症患者由来のヒト大腸腺腫細胞 (FPCK-1-1 細胞) による異物誘発性、慢性炎症発がんモデル (マウス) を用いて、食品由来の炎症発がん予防化

合物を探索した。

7) マウスマクロファージ株化細胞 RAW264 細胞における iNOS 発現抑制効果を持つ抗炎症・発がん抑制食品成分の探索を行い、さらに、その抗炎症・iNOS 抑制メカニズムについて解析した。

8) 8-オキソグアニン関連修復酵素である OGG1 欠損マウスを用いて CDAA 食誘発肝発がん機構を解析した。

9) 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 の発症における、Epstein-Barr (EB) virus による B 細胞のがん化と炎症反応の関与について検討した。このため、ヒト B 細胞由来リンパ腫細胞株をヒトマクロファージと共培養して、マクロファージの B リンパ腫細胞のトランスフォーム能への影響を解析した。

3 研究成果

1) 炎症による新規修飾塩基である 8-ニトログアニンの生体内生成を証明した。具体的には、ヒト尿中に、炎症性 NO による修飾塩基である 8-ニトログアニンの生成を証明した。尿中 8-ニトログアニンは、非喫煙者より、喫煙者に優位に上昇しており、感染・炎症による発がんのバイオマーカーとしての有用性が示された。あわせて、gpt 遺伝子を組み込んだ CHO 細胞である AS52 細胞を用いて 8-ニトログアニンの変異原性を解析したところ、8-ニトログアニンが、gpt 遺伝子変異を誘発しその変異原性は、過酸化水素に匹敵するものであった。この変異誘発のメカニズムとして、DNA 中に脱プリン部位を生成し、高頻度に G→T 変異を誘発することが分かった。一方、培養細胞において、NO 産生に依存した各種 8-ニトログアニン関連化合物、特に、全く新規の 8-ニトロ-cGMP の生成を証明した。また、マウスの培養マクロファージに 8-ニトログアニンの修復酵素と考えられる脱ニトロ化酵素活性が検出され、生体内で、ニトロ化・脱ニトロ化の制御機構が存在することが示唆された。さらに、8-ニトロ-cGMP 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として機能していることが示された。

2) NO 処理肝がん細胞がグルコース飢餓耐性を獲得することを明らかにした。その機序として NO は 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。大腸がん臨床症例では、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) NO による HIF-1 α 発現が、鉄イオン化合物であるクエン酸鉄アンモニウムにより抑制されることが分かった。このことは、がん治療・発がん予防において、新規血管新生抑制剤としてこの様な鉄イオン化合物の応用の可能性を示唆している。

4) 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。一方、皮膚発がん過程においては、EP₃ 受容体の発現は扁平上皮がんへの進展に重要であることが示唆された。

5) iNOS 阻害剤 ONO-1714 の AOM 誘発ラット大腸発がんに対する抑制効果を検討した結果、大腸の ACF 数は、10、20、50、100 ppm の ONO-1714 混餌投与群でそれぞれ、対照群の 94、73、71、53% であり、20 ppm 以上の ONO-1714 混餌投与で有意な減少がみられた。さらに、長期実験により ONO-1714 の AOM 誘発ラット大腸発がんに対する作用を調べたところ、大腸腺がんの発生率及び個体当たりの発生数に有意差は認められなかったが、腫瘍径 3 mm 以上の腺がんの発生数が 100 ppm ONO-1714 投与群で有意に低下していた。ONO-1714 は大腸発がん過程において ACF の発生数を顕著に抑制したが、腫瘍の発生自体を抑制するには至らず、大きい腫瘍の発生数を減少させるに留まった。ONO-1714 は腫瘍の増殖を遅らせる作用があることが示唆された。

6) 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。さらに、抗ニトログアニン抗体を用いた免疫組織染色により、特に、auraptene に 8-ニトログアニン生成抑制効果を確認した。以上より、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が明かとなった。

7) 穀類に含まれる 13-HOA に、NF κ B 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。さらに、沖縄産秋ウコン由来の turmerone、および、ミョウガ科植物由来の aframodial、galanal A・B に NF κ B 阻害を介する強力な抗炎症、抗 iNOS 作用を見出した。特に、turmerone は、既知の秋ウコン由来の curcumin と同程度の抗炎症活性を有するが、curcumin と異なり、有効抗炎症濃度において明かな細胞毒性を示さず、今後のがん予防への応用が期待される。

8) OGG1 欠損マウスを用いて CDAA 食誘発肝発がん機構を解析したところ、CDAA 食による発がんイニシエーションに酸化 DNA 損傷が関与することが示唆された。

9) EB virus による B 細胞のがん化に炎症、マクロファージの関与が推察された。

以上より、NO・プロスタノイドなどの炎症性活性分子種が、核酸塩基修飾（特に、8-ニトログアニン生成）を介して変異原性を発揮し、さらに、細胞死・細胞増殖、血管新生に関わるシグナル分子の発現調節異常をもたらし、がんのプログレッションおよびがんの浸潤・進展に深く関与することが示された。これまで、発がん抑制活性を有する食品由来の新規抗酸化・抗炎症物質の検索・同定も順調に進んでおり、今後、炎症発がんの分子メカニズムの解明とその予防に関する研究のさらなる展開が期待される。

4 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。