

## 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

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-ニトログアニンが変異原性を発揮し、DNA中に高頻度にG→T変異を誘発することが分かった。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。DMBA、TPA誘発皮膚発がんモデルにおいて、EP<sub>3</sub>受容体の発現が扁平上皮がんへの進展に重要な役割を演じていることが示唆された。また、ヒト大腸腺腫細胞の慢性炎症発がんモデルにおいて、食品由来のauraptene、nobiletinによる著しい発がん抑制効果を認めた。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。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- $\kappa$ 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	* <sup>1</sup> 熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授	感染炎症における遺伝子損傷機構の解析
	* <sup>2</sup> 教授	
小倉勤	北陸大学薬学部 教授	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	山形大学大学院医学系研究科 助教授	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	* <sup>3</sup> 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 ウイルスの発現とマクロファージの関与
	* <sup>4</sup> 国立病院機構 和歌山病院 医師	

\*1：平成17年4月1日～平成17年7月30日

\*2：平成17年7月1日～平成18年3月31日

\*3：平成17年4月1日～平成17年5月31日

\*4：平成17年6月1日～平成18年3月31日

## 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、プロスタノイドによる遺伝子修飾とそれに伴った生存シグナル伝達(細胞死抑制)という視点から解析した。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) 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 $\alpha$  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 $\alpha$  mRNA 発現に対する鉄イオン化合物、クエン酸鉄アンモニウムの影響を検討した。

3) EP<sub>3</sub> ノックアウトマウスを用いて DMBA、TPA 誘発皮膚発がんにおける EP<sub>3</sub> の役割について検討した。

4) アゾキシメタン (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。

5) ヒト大腸腺腫細胞 (FPCCK-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 1'-acetoxychavicol acetate (ACA)、auraptene、nobiletin の発がん予防効果を検討した。

6) 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 のマウスマクロファージ株化細胞 RAW264 細胞における iNOS 発現抑制効果とそのメカニズムを解析した。

7) 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 CDA 食誘発肝発がん機構を解析した。

8) 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検討した。

## 3 研究成果

1) 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。また、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唆された。

2) NO による HIF-1 $\alpha$  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。

3) マウス皮膚がんモデルにおいて、EP<sub>3</sub> 受容体の発現が扁平上皮がんへの進展に重要な役割を演じていることが示唆された。

4) 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。

5) ヒト大腸腺腫細胞の異物誘発性、慢性炎症発がんモデルにおいて、ACA、auraptene、nobiletin による著しい発がん抑制効果を認めた。また、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。このことより、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。

6) turmerone、および、aframodiol、galanal A・B に NF $\kappa$ 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。

7) 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的 DNA 損傷が関与することが示唆された。

8) 培養細胞系において、マクロファージによる B リンパ腫細胞のトランスフォーム能の増強が確認され、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。

#### 研究成果の刊行発表

##### 外国語論文

1. Yasuhara, R., Akaike, T., et al., Interleukin-1 $\beta$  induces death in chondrocyte-like ATDC5 cells through mitochondrial dysfunction and energy depletion in a reactive nitrogen and oxygen species-dependent manner. *Biochem. J.*, 389: 315-323, 2005.
2. Zaki, H. M., Akaike, T., et al., Nitric oxide-induced nitrative stress involved in microbial pathogenesis. *J. Pharmacol. Sci.*, 8: 117-129, 2005.
3. Saito, S., Akaike, T., et al., Effect of nitric oxide in amyloid fibril formation on transthyretin-related amyloidosis. *Biochemistry*, 44: 11122-11129, 2005.
4. Sawa, T., Akaike, T., et al., Analysis of urinary 8-nitroguanine, a marker of nitrative nucleic acid damage, by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection coupled with immunoaffinity purification: association with cigarette smoking. *Free Radic. Biol. Med.*, 40: 711-720, 2006.
5. Akuta, T., Akaike, T., et al., Nitrative stress through formation of 8-nitroguanosine: A new insight into microbial pathogenesis. *Nitric Oxide*, 14: 101-108, 2006.
6. Alam, M. S., Akaike, T., et al., Involvement of *Salmonella enterica* serovar Typhi RpoS in resistance to NO-mediated host defense against serovar Typhi infection. *Microb. Pathog.*, 40: 116-125, 2006.
7. Ohshima, H., Akaike, T., et al., 8-Nitroguanine, a product of nitrative DNA damage caused by reactive nitrogen species: Formation, occurrence and implications in inflammation and carcinogenesis. *Antioxidants Redox Signal.*, 2006, in press.
8. Unno, Y., Akaike, T., et al., Nitric oxide-induced downregulation of leptin production by 3T3-L1 adipocytes. *Nitric Oxide*, 2006, in press.
9. Suzuki, A., Ogura, T., et al., ARK5 is transcriptionally regulated by the Large-MAF family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: ARK5 as a new molecular determinant of malignant multiple myeloma. *Oncogene*, 24: 6936-6944, 2005.
10. Suzuki, A., Ogura, T., et al., Involvement of transforming growth factor-beta1 signaling in hypoxia-induced tolerance to glucose starvation. *J. Biol. Chem.*, 280: 31557-31563, 2005.
11. Minchenco, O.H., Ogura, T., et al., Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie*, 87: 1005-1010, 2005.
12. Minchenco, O.H., Ogura, T., et al.,

- Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochim. Pol.*, 52: 881-888, 2005.
13. Minchenco, OH., Ogura, T., et al., Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation. *Mol. Cell Biochem.*, 280: 227-234, 2005.
14. Kishimoto, A., Ogura, T., et al., A pull-down assay for 5' AMP-activated protein kinase activity using the GST-fused protein. *Mol. Biotechnol.*, 32: 17-21, 2006.
15. Suzuki, A., Ogura, T., et al., Ndr2 acts as the upstream kinase of ARK5 during IGF-1 signaling. *J. Biol. Chem.*, 2006, in press.
16. Niho, N., Takahashi, M., et al., Suppression of azoxymethane-induced colon cancer development in rats by a prostaglandin E receptor EP1-selective antagonist. *Cancer Sci.*, 96: 260-264, 2005.
17. Niho, N., Takahashi, M., et al., Concurrent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation by NO-1886, increasing lipoprotein lipase activity in Min mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 2970-2974, 2005.
18. Shoji, Y., Takahashi, M., et al., Prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> deficiency modifies tumor outcome in mouse two-stage skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26: 2116-2122, 2005.
19. Takahashi, M., et al., Suppressive effect of an inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, on AOM-induced rat colon carcinogenesis. *Nitric Oxide*, 14: 130-136, 2006.
20. Nagaoka, Y., Okada, F., et al., Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331: 215-223, 2005.
21. 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*, 5: 1024-1032, 2005.
22. Zhao, W., Okada, F., et al., Hypoxia suppresses the production of matrix metalloproteinases and migration of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 35: 3468-3477, 2005.
23. Okada, F. and Fujii, J., Prevention of tumor progression as the ultimate goal of cancer therapy. *Cancer Therapy*, 3: 219-226, 2005.
24. Ishii, T., Okada, F., et al., Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic. Res.*, 39: 697-705, 2005.
25. Okada, F., et al., Involvement of reactive nitrogen oxides for acquisition of metastatic properties of benign tumors in a model of inflammation-based tumor progression. *Nitric Oxide*, 14: 122-129, 2006.
26. Tanaka, H., Okada, F., et al., siRNA gelsolin knockdown induces epithelial-mesenchymal transition with a cadherin switch in human mammary epithelial cells. *Int. J. Cancer*, 118: 1680-1691, 2006.
27. Okada, F., et al., Prevention of inflammation-mediated acquisition of metastatic properties of benign mouse fibrosarcoma cells by administration of an orally available superoxide dismutase. *Br. J. Cancer*, 2006, in press.
28. Fujii, J., Okada, F., et al., Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2006, in press.
29. Powell, C., Denda, A., et al., Temporal correlation of pathology and DNA damage with gene expression in a choline deficient model of rat liver injury. *Hepatology*, 42: 1137-1147, 2005.
30. Murakami, A., et al., New class of linoleic acid metabolites biosynthesized by corn and rice lipoxygenases: Suppression of proinflammatory mediator expression via attenuation of MAPK- and Akt-, but not PPAR $\gamma$ -, dependent pathways in stimulated macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 70: 1330-1342, 2005.
31. Kwon, K.-H., Murakami, A., et al.,

- Interleukin-1 $\beta$  targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337: 647-654, 2005.
32. Ikeda, Y., Murakami, A., et al., Ursolic acid promotes the release of macrophage migration inhibitory factor via ERK2 activation in resting mouse macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 70: 1497-1505, 2005.
33. Kim, H.-W., Murakami, A., et al., Suppressive effects of mioga ginger and ginger constituents on reactive oxygen and nitrogen species generation, and the expression of inducible proinflammatory genes in macrophages. *Antioxid. Redox Signal.*, 7: 1621-1629, 2005.
34. Murakami, A., et al., Suppressive effects of Okinawan food items on free radical generation from stimulated leukocytes and identification of some active constituents: implications for the prevention of inflammation-associated carcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 6: 437-448, 2005.
35. Shimakage, M., et al., Down-regulation of ASY/Nogo transcription associated with progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Cancer*, 2006, in press.
36. Nakajima, H., Shimakage, M., et al., Epstein-Barr virus-associated primary leptomeningeal lymphoma. *Eur. J. Neurol.*, 2006, in press.