

## 17 指一6 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

ヒト変異型 c-Ha-ras 変異型遺伝子コンディショナル発現トランスジェニックラットを用いる発がん関連物質短期検索モデルを作成した。柑橘類由来 Auraptene は肥満 (db/db) マウス大腸発がんモデルにおいて、前がん病変の ACF、BCAC の発生を有意に抑制した。また Auraptene と Nobiletin は probasin/SV40 T 抗原トランスジェニック (TRAP) ラットにおいて、前立腺発がん過程の PIN から腺癌への進展を抑制した。DMH と DSS によるラット大腸発がんモデルにおいて、抗炎症剤であるスルファサラジンは発がん促進作用を示した。スナネズミ腺胃において、ヘリコバクターの感染は、DNA メチル化を誘発し、誘発されやすい CpG アイランドを 10 個同定した。ヘリコバクターの発がんプロモーター作用は CagA より CagE ノックアウトヘリコバクターにおいてより著しく抑制された。また、ヒトのピロリ菌除菌率は CYP2C19 遺伝子多型の内、高活性型 (RM) では低率である事が確認された。

### 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
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
津田 洋幸	名古屋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予知と予防の研究
三森 国敏	東京農工大学農学部 教授	rasH2 マウスを用いた非遺伝毒性発がん物質の発癌機序に関する研究
広瀬 雅雄	国立医薬品食品衛生研究所 部長	炎症関連大腸発がんの化学予防に関する研究
田中 卓二	金沢医科大学・医学部 教授	天然物を利用した発がん阻止に関する研究
朝元 誠人	名古屋市立大学大学院医学研究科 助教授	前立腺がんの予防、進展防止に関する実験的研究
中江 大	財団法人 佐々木研究所 部長	OGG1 遺伝子欠損マウスを用いた肺腺がんの分子標的予防に関する研究
益谷美都子	国立がんセンター研究所 室長	ポリ(ADP-リボース)代謝変異マウスモデルを用いたがんの予知と予防の研究
牛島 俊和	国立がんセンター研究所 部長	ヘリコバクター感染による DNA メチル化異常誘発とがん予防への活用
能美 健彦	国立医薬品食品衛生研究所 室長	化学物質による in vivo 変異原性抑制に関する研究
一瀬 雅夫	和歌山県立医科大学第二内科 教授	萎縮性胃炎の自然史に基づく胃がん発生子知と予防に関する検討
浜島 信之	名古屋大学大学院医学系研究科 教授	遺伝子多型別に見たがん化学予防の効果

## 総括研究報告

## 1 研究目的

ヒトがん発生要因の検索は、細菌を使った種々の *in vitro* 遺伝毒性試験と2年間にも及ぶ *in vivo* 長期発がん性試験により実施されてきた。両者のギャップを埋め検索に要する期間の短縮のため、個体レベルの前がん病変を指標とした中期検索法が開発されてきた。最近の遺伝子工学の発展に伴い各種の遺伝子改変動物が作成され、より高感度かつ短期間に発がん性の検索が可能となった。本研究では、これらの検索法の利点と限界を明確にするとともに、真にヒトがんのモデルとなるような動物モデルの確立を試みる。さらに、これらのモデルを用いた発がん機構の解明と、その情報をもとにしたがんの化学予防剤の開発を可能とする基盤的研究の確立を目指す。その中で発がん抑制に有効な物質についてはヒトへの臨床応用を試み、最終的にはヒトがんの予防を目標とする。

## 2 研究方法

各種遺伝子改変動物や遺伝子変異動物を用い各種の化学物質を投与し、発がん性・変異原性の検索結果を検討する。正常動物を用いた発がん性試験試験では、より短期間に検討可能で、実際のヒトの疾病状態に類似したモデルの作成を試みる。そして動物実験からヒトへの一連の研究として予知と予防のモデルとしてヘリコバクター ピロリ (*Hp*) 感染をとりあげ、発がん実験から疫学的研究まで展開する。それぞれの詳細は研究成果にまとめた。

## 3 研究成果

## A. 各種遺伝子改変動物や遺伝子変異動物を用いた発がん性予知と予防の検索

(1) ヒト変異型 c-Ha-ras 変異型遺伝子トランスジェニックラット (Hras250) を用いた検索モデルの開発  
CAGプロモーター下にヒト変異型c-Ha-ras遺伝子を組み込み、変異型c-Ha-ras遺伝子コンディショナル発現トランスジェニックラット (Hras250) を作成した。このHras250において、Cre-recombinaseを組み込んだアデノウイルスを  $1.0 \times 10^9$  pfu/ml 生食とし、0.3 ml用量 ( $3.0 \times 10^8$  pfu) を肺内に投与して気管、肺胞上皮等の構成細胞に導入した変異型ras遺伝子を発現させ、4週

程度の短期にびまん性に肺がんを発生させる事に成功した。組織像は腺がん、扁平上皮がんおよび両者が混合した腺扁平上皮がんであった。これに基づき、短期多発がん発生量の1/100のCre発現アデノウイルスを気管より肺内に噴霧、翌日より被検物質を投与の4週程度で終了する肺がん促進物質の短期検索の基礎を確立した。

## (2) p53ノックアウト (K0) マウスのIQに対する発がん感受性

p53(+/-)マウスの発がん感受性には臓器特異性があり、臓器によっては発がん感受性の亢進はみられないが、p53(-/-)マウスでは臓器に関係なく発がん感受性が高度に亢進していることを明らかにしてきた。2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) はマウスの肺、肝臓、前胃に発がん性を示すことが知られており、臓器による感受性の違いを検討した。5週齢のp53 K0マウスを用い、短期実験では、雄の(+/+), (+/-)および(-/-)マウスに300 ppmのIQを15週間混餌投与し、長期実験では、雌雄の(+/+ )および(+/-)マウスに同濃度のIQを40週混餌間投与した後、基礎飼料を12週間投与した。短期実験では、(-/-)マウスにおいて、IQ投与により、(+/+ )および(+/-)マウスと比較して有意に高率に扁平上皮の過形成が発生した ( $P < 0.0005$ , vs (+/+ )および  $P < 0.05$ , vs (+/-) )。長期実験でも(+/+ )と(+/-)間で同様の結果を得た。また、雌のIQ投与群において高率に肝細胞腺腫および肝細胞癌が認められたが(+/+ )および(+/-)マウスの間で発生率に差は認められなかった。これらの結果より、(+/-)マウスの発がん感受性は臓器により異なることが明らかになった。

(3) rasH2 マウスにおける PPAR $\gamma$  アゴニストに対する発がん感受性

p53 ノックアウトマウスが PPAR $\gamma$  アゴニストや $\alpha \cdot \gamma$  のデュアルアゴニストの発がん性を検出できないことから、rasH2 マウスを用いて PPAR $\gamma$  アゴニストに対する発がん感受性を検証した。7週齢、雌雄の rasH2 マウス各 50 匹を 3 群に分け、PPAR $\gamma$  アゴニストである troglitazone 0、3000 および 6000ppm を 26 週間混餌投与した。脾臓、皮下、子宮などに暗赤色腫瘍が散見され、いずれも血管腫/血管肉腫で、rasH2 マウスが troglitazone に対して発がん感受性を示すことが示唆

された。

(4) 肥満 (db/db) マウス大腸発がんモデルにおける auroaptene (AUR) の効果

柑橘類由来化合物 AUR の肥満関連大腸発がんへの影響を知る目的で、AOM 誘発 db/db マウス大腸発がんモデルを用いた動物実験を行った。雌性 db/db マウス 30 匹、雌性+/+マウス 28 匹を使用し、それぞれ AOM 群、AOM+AUR 群、AUR 群、無処置群に分けた。AOM (10 mg/kg 体重) は週 1 回、計 3 回マウスに皮下注射し、大腸がん前駆病変を誘発した。AUR は 250 ppm の濃度で AOM 投与の 1 週前より、全実験期間 (10 週) 中、混餌投与した。実験は 10 週で終了し、実験終了時に、大腸の病理組織学的解析 (ACF、BCAC) と血液生化学的検査 (T-cho、TG、glucose、leptin) を行った。その結果、大腸粘膜の ACF 数は、db/db マウスの AOM+AUR 群で、AOM 群に比べ有意 ( $P < 0.001$ ) に低下し、+/+マウスにおいても、有意 ( $P < 0.001$ ) に低下していた。BCAC 数でも同様の結果が得られた。

(5) probasin/SV40 T 抗原トランスジェニック (TRAP) ラットにおける前立腺発がん過程の Nobiletin と AUK の抑制効果

前立腺癌トランスジェニックモデルを用いて、柑橘類由来のがん予防物質として期待される Nobiletin と AUR による前立腺癌抑制効果を検討した。5 週齢雄 probasin/SV40 T 抗原トランスジェニック (TRAP) ラット 27 匹を 3 群 (9 匹/群) に分け、対照群は 2% corn oil 混餌基礎食; Nobiletin 群は 0.05% nobiletin + 2% corn oil; AUR 群は 0.05% AUK + 2% corn oil を 15 週間投与した。その結果、病理組織学的には全動物に前立腺癌が認められ、その頻度に有意な差はなかった。しかし、画像解析による上皮成分の定量的検討では、Nobiletin ならびに AUR 投与群の腺上皮の占める相対面積は対照群より有意に減少し、(Prostatic intraepithelial neoplasia) PIN が優勢の腺は有意に増加した。以上より TRAP ラットにおいて Nobiletin および AUR は前立腺発がん過程の PIN から腺癌への進展に対して抑制作用を有することが示された。

(6) *gpt delta* マウスにおける Nobiletin の NNK 誘発遺伝毒性に対する抑制作用

タバコ特異的なニトロサミン NNK

(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) の遺伝毒性作用に対する Nobiletin の抑制作用について検討した。*gpt delta* マウス (雌 4 匹、雄 6 匹) に Nobiletin を 100 ppm あるいは 500 ppm を 7 日間混餌投与した後、NNK (2 mg/mouse/day, i. p.) を 4 日間投与し、さらに Nobiletin の投与を継続して 38 日目に屠殺し、肺における変異頻度を測定した。その結果、NNK 投与した雌マウス肺の変異頻度は Nobiletin 100 ppm 投与群で有意 ( $P = 0.04$ ) に低下し、500 ppm でも同程度に低下した。雄でも同様の結果であることから、Nobiletin の NNK 誘発遺伝毒性に対する抑制作用が示唆された。

B. 正常動物を用いた発がん性試験

(1) DMH-DSS ラット大腸発がんモデルにおける抗炎症剤の効果

1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) と大腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の組合せ投与によるラット大腸発がんモデルにおいて、ラットに抗炎症作用を有するニメスリド、ラクトフェリン、スルファサラジンの効果を検討した。F344 雄ラット 120 匹に DMH (40 mg/kg 体重) を 1 週間に 3 回皮下投与した後、DSS を 1% 濃度で 1 週間飲水投与し、その後経時的に大腸の粘膜病変を病理組織学的に解析した。さらに発がん抑制効果の期待される化学物質の作用する時期を明らかにするため、DMH-DSS モデルラット 100 匹に対し、抗炎症作用を有するニメスリド、ラクトフェリンあるいはスルファサラジンを各々 0.04、0.2 あるいは 0.5% 濃度で混餌投与した。各化学物質の投与時期は、実験前半、7 週から 11 週までの実験後半、あるいは全実験期間の 3 群に分け、4、6 及び 11 週時の大腸粘膜病変を比較検討した。その結果、ニメスリド及びスルファサラジンは、実験前半の粘膜傷害/炎症期に投与することにより粘膜上皮の修復を遅延させた。さらにスルファサラジンは何れの時期の投与においても腫瘍発生を促進した。ラクトフェリンについては実験前半の投与による発がん促進を示し、ニメスリドについては実験期間を通して投与した群では発がん抑制を示す結果が得られた

C. ヘリコバクターピロリ (*Hp*) 感染をモデルにしたヒト胃がんの予防への基礎

(1) *Hp* 感染によるスナネズミ胃粘膜のメチル化

HP 感染後 30 週の雄スナネズミ胃粘膜 10 例、同 50 週の胃粘膜 7 例を用いて、DNA メチル化を解析した。ヒトで HP 感染により DNA メチル化が誘発されることが知られる CpG アイランド領域のスナネズミ相同領域を、PCR 法によりクローン化した。

Methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) 法は、定法に従い、実施した。THBD ではメチル化は検出されなかったが、HAND1 プロモーター領域では、1/10 及び 2/7 例について、DNA メチル化を検出した。得られた CpG アイランドのうち 10 個については、定量的なメチル化解析を行い、HP 感染スナネズミの胃粘膜では、非感染スナネズミの胃粘膜に比べて 2.4-87 倍のメチル化が誘発されていることを認めた。

(2) スナネズミ腺胃発がんに対する *cagA* および *cagE* ノックアウト *Hp* の影響

5 週齢雄性スナネズミに 30ppm の MNU を 10 週間隔週投与した後、*cagA* または *cagE* をノックアウトした *Hp* (ATCC43504) 株 ( $\Delta$  *cagA* 株および  $\Delta$  *cagE* 株) を感染させた。感染後 28 週目に胃を採取し病理標本を作製し、胃がん発生の有無と *Hp* 感染の確認をおこなった。ピロリ菌感染が成立したスナネズミの胃がんの発生率は、野生株で 43% (6/14)、 $\Delta$  *cagA* 株で 44% (8/18)、 $\Delta$  *cagE* 株で 5% (1/19)、発がん剤投与のみのピロリ菌非感染群で 6% (1/16) であり、野生株および  $\Delta$  *cagA* 株では  $\Delta$  *cagE* 株およびピロリ菌非感染群との間に有意差が認められたが、野生株と  $\Delta$  *cagA* 株との間には有意差が認められなかった。これらの結果より、スナネズミを用いた動物実験では、胃がん発生に対して IV 型分泌装置によって運ばれる CagA よりも IV 型分泌装置を構成している CagE の関与が重要な役割を演じている可能性が示唆された。

(3) *Hp* 感染と萎縮性胃炎の自然史

血清マーカーを使用して *Hp* 関連慢性萎縮性胃炎の自然史の解明のため、あらかじめ萎縮性胃炎の程度を評価した無症状健常人男性 (40-60 歳) 2114 人を対象に longitudinal cohort study を行なった。萎縮性胃炎の進展度評価は血清ペプシノゲン (PG) 値を用いて行い、*Hp* 感染の有無に関しては血清抗体価を測定する事で行なった。10 年間の観察期間において抗 *Hp* 抗体陽性転化が、年率 0.14% 程度生じる事、*Hp* 感染成立者の 1.53% 程度

が毎年高度萎縮性胃炎を合併し、その中で 0.18% 程度が毎年化生性胃炎を合併する事が明らかになった。次にこの対象集団について行なったアンケート結果の解析により、血清 PG 値から、喫煙により胃炎の活動性が低下し、萎縮性変化進展抑制に働くと考えられるデータが得られた。

(4) ピロリ菌除菌率と CYP2C19 遺伝子型との関連

ピロリ菌除菌に使われるランソプラゾールを代謝する CYP2C19 には G681A (\*2) と G636A (\*3) の 2 つの遺伝子多型がある。681A はスプライシングの異常を、G636A はストップコドンとなるため共に酵素活性を低下させる。酵素活性に影響する遺伝子型の間で、除菌率に違いがないかを検討した。対象は、感染が確認されランソプラゾール、クラリストマイシン、アモキシシリンの 3 剤 (ランサップ 400) の 1 週間処方を受けた 55 名である。遺伝子型は \*1\*1 型を rapid metabolizer (RM)、\*1\*2 型と \*1\*3 型を intermediate metabolizer (IM)、\*2\*2 型、\*2\*3 型、\*3\*3 型を slow metabolizer (SM) と区分した。除菌の成否については尿素呼気テストを用いた。RM は 15 人 (27.3%)、IM は 28 人 (50.9%)、SM は 12 人 (21.8%) であり、除菌率はそれぞれ 66.7%、96.4%、83.3% であった。RM と IM+SM では 10/15 対 37/40 で Fisher の直接確率で有意に除菌率が低かった ( $p=0.028$ )。除菌失敗例では、これまでランソプラゾール、メトロニダゾール、アモキシシリンの 3 剤を処方し、9 例中 7 例の除菌に成功し CYP2C19 遺伝子型を用いた個別化予防の可能性を示した。

4 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する。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する。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 を得て施行する。個人情報厳重な管理下に置く。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Maekita, T., Tatematsu, M., Ushijima, T., et al., High

- levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin. Cancer Res.*, 12: 989-995, 2006.
- Mizoshita, T., Tatematsu, M., et al., Gastric and intestinal phenotypes and histogenesis of advanced glandular stomach cancers in carcinogen-treated, *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci.*, 97: 38-44, 2006.
  - Kato, S., Tatematsu, M., et al., High salt diets dose-dependently promote gastric chemical carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells. *Int. J. Cancer*, in press.
  - Tsuda H., et al., High susceptibility of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats to carcinogenesis: a cancer-prone animal model. *Cancer Sci.*, 96: 309-316, 2005.
  - Suzuki, R., Tsuda, H., et al., An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*, 27(3):619-630, 2006.
  - Hayashi, M., Mistumori, K., et al., Different inhibitory effects in the early and late phase of treatment with KAT-681, a liver-selective thymimetic, on rat hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy after diethylnitrosamine initiation. *Toxicol. Sci.*, 84: 22-28, 2005.
  - Onose, J., Hirose, M., et al., A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoints for detection of carcinogenesis modifiers - validation with known modifiers. *Cancer Lett.*, 232(2):272-278, 2006.
  - Sugie, S., Tanaka, T., et al., Effect of  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer*, 115: 346-350, 2005.
  - Kawamori, T., Tanaka, T., et al., Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J.*, 20(2):386-388, 2006.
  - Hokaiwado, N., Asamoto, M., et al.: Transgenic disruption of gap junctional intercellular communication enhances early but no late stage hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol. Pathol.*, 33(6):695-701, 2005.
  - Uematsu, F., Nakae, D., et al., Distinct patterns of gene expression in hepatocellular carcinomas and adjacent non-cancerous, cirrhotic liver tissues in rats fed a choline-deficient, l-amino acid-defined diet. *Cancer Sci.*, 96: 414-424, 2005.
  - Ogawa K., Masutani M., et al., Parp-1 deficiency does not enhance liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in mice. *Cancer Lett.*, in press.
  - Niwa, T., Ushijima, T., et al., Whole-genome analyses of loss of heterozygosity and methylation analysis of four tumor-suppressor genes in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas. *Cancer Sci.*, 96: 409-413, 2005.
  - Miyazaki, M., Nohmi, T., et al., Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas. *Carcinogenesis*, 26: 1947-1955, 2005.
  - Shibata, A., Nohmi, T., et al., Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*, 24, 1328-1337, 2005.
  - Magari H., Ichinose M., et al., Inhibitory effect of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on stomach carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 334: 606-612, 2005.
  - Ohata H., Ichinose M., et al., Gastric cancer screening of a high-risk population in Japan using serum pepsinogen and barium digital radiography. *Cancer Sci.*, 96: 713-720, 2005.
  - Goto, Y., Hama jima, N., et al., No association if EGF gene polymorphism with gastric cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14: 2454-2456, 2005.
  - Goto, Y., Hama jima, N., et al., Association between serum pepsinogens and polymorphism of PTPN11 encoding SHP-2 among *Helicobacter pylori* seropositive Japanese. *Int. J. Cancer*, 118: 203-208, 2006.