

## 【総説】

## 炎症を背景としたマウス大腸発癌モデルによる化学予防研究

安井 由美子

酪農学園大学 獣医学部獣医学科 生体機能教育群 獣医栄養生理学ユニット  
(〒069-8501 江別市文京台緑町582番地)

## はじめに

平成21年度の日本人の死因において、第1位は悪性新生物で34万4000人、第2位は心疾患で17万9000人、第3位は脳血管疾患で12万1000人と推計され、悪性新生物つまり「がん」が圧倒的な位置を占めている(厚生労働省)。1年間の総死亡数の約30%はがんが原因で亡くなっている現状である。

発がんに至る背景として、生活習慣による影響が大きいとされている。戦後、食生活、ライフスタイルの変化により大腸癌や肺癌を筆頭のがんの罹患率、死亡率ともに著しい増加傾向にある。このような現状の中、臨床的ながん対策として最も重点を置かれているのは、定期的な健診、早期発見、早期治療であろう。しかしながら、がん対策の究極は「がんの予防」ではないだろうか。すなわち、発がん過程でいえば、**initiation**、**promotion**の制御ということになる。がんにならないためには、まず、がんになりやすい環境を改善すること、具体的には緑黄色野菜の摂取、脂質とくに動物性脂質の摂取制限、日常的な運動、喫煙・飲酒制限などが挙げられる。そして、もう一つは、特に発がんリスクの高い環境、あるいは集団を対象とし、ターゲットを絞り込んだがんの予防であり、その中心を担っているのが「化学予防」である。1976年に Sporn が提唱したがん化学予防は、発がんを防ぐ物質を積極的に摂取するというものである。特に、消化器癌の発生は食事に密接に関連していると考えられていることから、日常の食事に含まれる天然成分が消化器癌の予防物質として注目されてきた。一方で、詳細な発がん機序の解明が進行するとともに、予防効果の特異性に主眼を置いた合成化学物質による化学予防もまた、活発に研究されている。本稿では、戦後から現在にかけて増加傾向にある大腸癌に焦点をあて、大腸発癌動物モデルの作出およびその動物モデルを用いた化学予防実験の成果について紹介したい。

## 炎症を背景とした大腸発癌モデル

多くの研究により、癌の発生に炎症、特に慢性炎症が深く関与することがわかってきている。たとえば胃癌における *H.pylori* 感染は、慢性委縮性胃炎を惹起し、胃癌発生の **co-initiator** であり **promoter** であることが判明しているが、その除菌により実験的には発癌率が減少し、臨床的にも発癌までの時間を遅らせる効果があることが示されている。一方、大腸癌に関しては、病因不明の難治性炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎 (UC) およびクローン病では、罹患期間に比例して大腸癌のリスクが高くなる統計が出ている。従来から UC を模倣する動物モデルとして大腸起炎物質である **dextran sulfate sodium (DSS)** などを用いた誘発大腸炎モデルが繁用されており、炎症を背景とした発癌モデルとして、DSS をマウスやラットに頻回 (サイクル) 投与する方法が頻用されているが、このモデルでの腫瘍発生には、長期を要する。

一方、大腸発癌モデルとして用いられている系には、大腸特異的発癌物質である **azoxymethane (AOM)**、**2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)**、**1,2-dimethylhydrazine (DMH)** などをマウスやラットに投与する実験系がある。これらの動物の大腸に発生する前癌性病変や腫瘍を指標とした発癌、発癌抑制研究が展開されており、これまでに多くの発癌抑制候補物質が見出されている。しかしながら、これらの実験系は散発性大腸癌の発生を意識したものであるが、特にマウスにおいて発癌物質の投与が複数回必要なこと、そして腫瘍の発生までに約40週という非常に長期の飼育が必要であるという問題点があった (図1(A))。

そこで、上述の問題点を改善すべく、短期間で高頻度に大腸癌を誘発できる大腸二段階発癌モデルが作出された (図1(B))。このモデルは実験開始時に発癌 **initiator** として AOM を腹腔内単回投与し、その1週間後から発癌

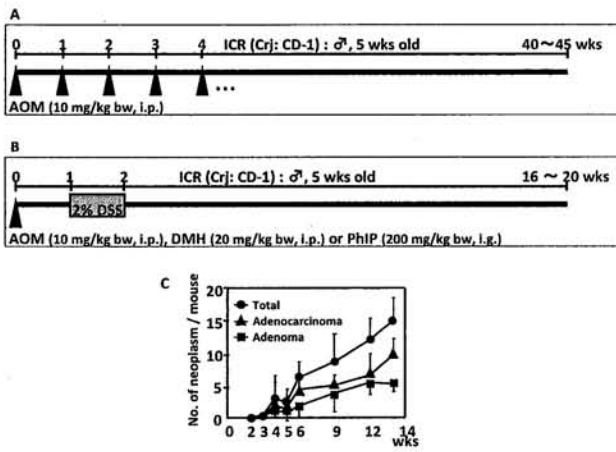


図1 (A) 従来のマウス大腸発癌プロトコール (B) 炎症関連マウス大腸発癌プロトコール (C) AOM/DSS 誘発大腸発がんモデルの腫瘍数の経時変化

promoter として DSS を 1 週間飲水投与することにより、経時的に、高率かつ腫瘍発生までの期間を 20 週までに短縮させることが可能となった<sup>[1,2]</sup> (図 1(c))。このモデルは DSS を用いている点から、炎症性腸疾患を背景にした大腸発癌モデルとしても有用であるとともに、20 週という早期に大腸癌を誘発できるので、さまざまな物質の発癌抑制および促進作用のスクリーニングモデルとして利用価値は非常に高い。

### 炎症を背景とした大腸発癌に対する化学予防実験

我々はこれまでに、上述の炎症を背景とした大腸発癌モデルマウスを用いて天然物や合成化合物による化学予防研究を行ってきた。その中から、pitavastatin およびアスタキサンチンの成果について紹介する。

・スタチン、HMG-CoA 還元酵素阻害薬は高コレステロール血症の治療薬として世界各国で使用されているが、最近の研究で、スタチンはコレステロール低下作用だけでなく様々な活性を有していることが明らかになってきており、癌の発生を抑制する働きなども報告されている。そこで抗炎症作用など多面的な生理活性が報告されている pitavastatin を用いて、炎症性大腸発癌モデルマウスに対する抑制効果を検討した。雄の 5 週齢 ICR マウスに AOM/DSS 処理後 1 週目から 1 もしくは 10 ppm の pitavastatin を 17 週間混餌投与したところ、pitavastatin 投与群において大腸の潰瘍および腺癌の発生頻度、発生個数がともに減少し、炎症についても有意な抑制が見られた。さらに腫瘍部において細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導が観察され、血清中の中性脂肪値および総コレステロール値の減少が見られた。また、nitrotyrosine 陽性細胞数の減少が観察された。以上の結果が

ら、pitavastatin は炎症を背景とした大腸発癌化学予防の標的として有望であると考えられた<sup>[3]</sup>。

・水産生物中に広く分布するアスタキサンチンは一重項酸素の消去活性やラジカル補捉作用など、強い抗酸化作用を有するカロテノイドの一種である。これまでに、免疫賦活作用、抗炎症作用、解毒酵素活性の亢進作用の報告がされている。また、抗腫瘍効果や発癌抑制作用も報告されており、ラット大腸、舌、肝発癌、マウス膀胱発癌などに対する効果が検討されている。そこで、炎症を背景としたマウス大腸発癌に対するアスタキサンチンの混餌投与 (用量 50、100、200 ppm) による影響を検討した。その結果、大腸粘膜潰瘍と異形成陰窩 (dysplastic crypts) の発生に関して、いずれの濃度においても有意な抑制が観察された。大腸腺腫の発生に関しては抑制傾向があったものの有意な差は得られなかったが、腺癌の発生に関しては、いずれの濃度においても抑制効果が見られ、特にアスタキサンチン 200 ppm 投与群において有意な抑制が観察された。さらに、大腸粘膜における炎症・発癌関連たんぱく質 (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、interleukin (IL)-1 $\beta$ 、PCNA、survivin) の発現は、アスタキサンチン投与群において有意な減少が観察された。これらの結果は、アスタキサンチンは炎症を背景としたマウス大腸発癌に対し、強い抑制作用を有することを示唆している (執筆中)。しかしながら、カロテノイドの癌予防効果に関しては、いまだ不明な点が多い。肺癌の危険性の高い喫煙者では  $\beta$ -カロテン投与が肺癌発症や死亡率を高めるという報告もあり、効果とともに安全性の評価が重要である。臨床の場で応用する際は、被験者の健康背景やカロテノイド種を選択やその投与量など、慎重な実施が求められる。

### 炎症刺激による Min マウス大腸発癌モデルとその発癌抑制

Min マウス (Apc 遺伝子ヘテロノックアウトマウス) は、家族性大腸腺腫症 (FAP: familial adenomatous polyposis) のモデルマウスとして広く研究に用いられている。FAP はほぼ全例に腺腫性ポリープから大腸癌を合併する常染色体優性遺伝疾患で、APC 遺伝子の変異がその原因遺伝子であるが、現在のところ、発癌を回避する手段としては、癌発生母地の大腸粘膜を切除することが原則となっている。一方で、FAP の同一家系でも発癌時期やポリープの大きさに差が見られることから、大腸腫瘍の増大や癌化には遺伝子変異だけでなく、運動や食事、喫煙などの環境要因も関与していると考えられ

る。

Min マウスの特徴として加齢とともに高トリグリセリド (TG) 血症を発症することが明らかとなっている。また、Min マウスは、ヒトと同じメカニズムやプロセスを経て大腸ポリープや大腸癌を発症すると考えられている。しかしながら、Min マウスの腸管での腫瘍 (腺腫) 好発部位は主として小腸であり、大腸では腺癌の前駆病変 aberrant crypt foci (ACF) や  $\beta$ -catenin accumulated crypts (BCAC) は観察されるものの、腺癌の発生頻度は低い。Min マウスは *Apc* 遺伝子ヘテロ欠損であるから、すでに initiation を受けている状態であり、理論上、promoter 刺激を与えれば大腸発癌に至ると考えられる。そこで前述の AOM/DSS モデル同様、promoter として大腸起炎物質 DSS を *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスに 1 週間飲水投与し、大腸腫瘍の発生状況を観察した (図 2(A))。その結果、*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの 2% DSS 投与群では全例に大腸腺癌が発生し (無処置群は 20%)、その発生個数も有意に高く、大腸腺癌は免疫組織化学的に  $\beta$ -catenin、p53、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、nitrotyrosine が陽性であった。一方、経時的解析により実験開始後 2 週で腺腫、4 週で腺癌が発生し、いずれも経時的に増加することを確認された。小腸のポリープ数も DSS 投与により増加が見られた。なお、*Apc*<sup>+/+</sup> マウスに大腸腫瘍の発生はなかった。以上の結果から、*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスに DSS を飲水投与することにより、実験開始後 5 週 (DSS 投与終了 4 週後) で高率に大腸腫瘍の発生が誘発されることが明らかとなった<sup>[4]</sup>。また、大腸腫瘍の発生には、DSS 投与によって誘発された炎症により生じる oxidative/nitrosative ストレスが関与しているこ

とが示唆された。

さらに、この実験系を用いて、特異的 iNOS 阻害薬 (ONO-1714) を混餌投与 (50、10 ppm) する 5 週間の実験を行った<sup>[5]</sup>。その結果、ONO-1714 混餌投与は、大腸腺腫や大腸腺癌の発生頻度に影響しなかったが、個体あたりの腺癌の発生個数を有意に減少させた (図 2(B))。加えて、大腸粘膜における COX-2、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の発現量、および血清中の TG 値の有意な減少が観察された (図 2(B))。これらの結果から、FAP 関連大腸発癌の抑制に iNOS 阻害薬が有効である可能性が示唆された。また、その作用には、高 TG 血症の改善も重要であることが推察された。

## おわりに

これまでの多くの研究により、大腸癌などの癌では、発癌過程に炎症が関与していることが示されており、実際、今までに報告されてきた多くの化学予防候補物質は抗炎症作用を有するものが大半である。しかしながら、炎症反応は生体防御に必須であり、強い抗炎症作用を有する物質を安易に使用することは危険を伴う。たとえば、非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs) の大腸癌に対する予防効果が、疫学的、実験的に示されているが、その長期服用には腸管粘膜障害や出血などの副作用があった。COX-2 選択的阻害薬もまた、高危険群を対象とした臨床試験において、進行性の大腸腺腫に対する有効な結果が得られたが<sup>[6]</sup>、心血管疾患などの副作用が現れる可能性が高いことも示されており、現状においては、これらの物質を大腸癌予防のために単独で服用することは勧められないのは明白である。一方で、NSAIDs の副作用を回避する方法として、ほかの薬剤と組み合わせて使用する複合投与による化学予防が近年注目されている<sup>[7]</sup>。単独でも効果のある薬剤を併用することは、相乗効果によってより低濃度で効果を得ることが期待でき、副作用の抑制にもつながることから、複合投与による化学予防は今後さらに研究が進むものと考えられる。

戦後における食生活を筆頭としたライフスタイルの変化、そして医学の進歩による高齢化の加速により、我々は「がん」という、もはや国民病と言っても過言ではない疾病に立ち向かわなくてはならなくなった。今後は、がん発生の高リスク群の絞り込み、そしてそれらの症例における詳細な発がんメカニズムの解析とその結果に基づいた特異性の高い、個体差に応じた効果的で副作用の少ない化学予防が求められている。上述のように、化学予防物質の選択には、慎重な検討を要するが、外科的処

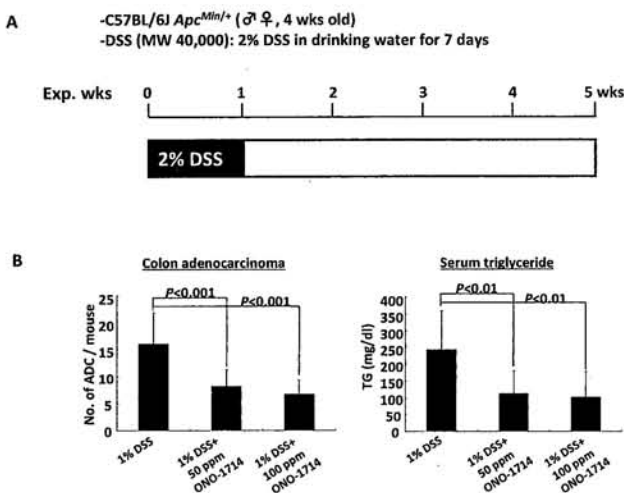


図 2 (A) *Apc*<sup>Min/+</sup> マウス大腸発癌プロトコール (B) ONO-1714 投与による大腸腺癌の発生個数および血清中の TG 値

置による QOL の低下、医療費の負担等を考えると、がんの罹患率、死亡率の増加している現在、化学予防の担うべき役割は大きいものと考ええる。

#### 参考文献

- [1] Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H : *Cancer Sci.* 94, 965-73 (2003)
- [2] Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T : *Cancer Sci.* 95, 721-7 (2004)
- [3] Yasui Y, Suzuki R, Miyamoto S, Tsukamoto T, Sugie S, Kohno H, Tanaka T : *Int J Cancer.* 121, 2331-9 (2007)
- [4] Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Hata K, Sugie S, Niho N, Sakano K, Takahashi M, Wakabayashi K : *Int J Cancer.* 118, 25-34 (2006)
- [5] Kohno H, Takahashi M, Yasui Y, Suzuki R, Miyamoto S, Kamanaka Y, Naka M, Maruyama T, Wakabayashi K, Tanaka T : *Int J Cancer.* 121, 506-13 (2007)
- [6] Rostom A, Dubé C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, Sampson M, Moher D : *Ann Intern Med.* 146, 376-89 (2007)
- [7] Reddy BS, Wang CX, Kong AN, Khor TO, Zheng X, Steele VE, Kopelovich L, Rao CV : *Cancer Res.* 66, 4542-6 (2006)