

「リレー・フォー・ライフ プロジェクト未来」研究助成金報告書

平成 25 年 11 月 30 日

公益財団法人日本対がん協会
理 事 長 殿

リレー・フォー・ライフ プロジェクト未来 研究助成金による研究を、下記のとおり報告
します。

所属機関 国立がん研究センター研究所 がん予防研究分野

役 職 ユニット長 氏 名 武藤 倫弘 ㊞

所属機関住所 〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

記

1. 研究課題

アスピリン等 NSAIDs による先制医療を指向したがんの予防研究

2. 研究期間

平成 24 年 12 月 ～ 平成 25 年 11 月

3. 要 約

疫学研究により肥満、脂質異常症は大腸がんのリスクであることが知られている。家族性大腸腺腫症のモデルマウスである Min マウスでは加齢に伴い血清トリグリセリド(TG)値が上昇し、高 TG 血症状態となり、腸ポリープが生成促進される。逆に TG の分解酵素であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)を発現誘導させると腸ポリープが生成抑制される。加えて、慢性炎症も大腸がんのリスクである。炎症とがんに共通する誘導因子として、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の過剰生産とその律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2 の過剰発現が知られており、COX-2 の阻害剤による発がん抑制が報告されている。しかし、COX-2 の阻害剤による副作用が報告されている。そこで本研究では、COX-2 の活性阻害剤の投与量を減らす目的で LPL の発現誘導剤との併用効果を明らかにすることを目的とした。まず、COX-2 選択的阻害剤である celecoxib と LPL の発現誘導剤である NO-1886 を併用した場合に改善される炎症・増殖関連分子を大腸がん細胞を用いてスクリーニングした。その結果、相乗的に抑制されるサイトカインとして IL-6 が見出された。次に celecoxib と NO-1886 を併用した場合に相乗的に Min マウスの腸ポリープ生成を抑制されるかを検討した。具体的には、家族性大腸腺腫症のモデルマウスである Min マウス(7 週齢雌性)に、300 ppm NO-1886 単独投与(混餌)、300 ppm celecoxib 単独投与(混餌)、両薬剤併用投与を行い、18 週齢で屠殺解剖し、生成した腸ポリープ数を測定した。その結果、celecoxib や NO-1886 の単独投与では Min マウスにおける腸ポリープ数の有意な減少は認められなかったが併用投与することにより腸ポリープ数は 51%減少し、有意な減少が観察された($p < 0.001$)。肝臓組織において mRNA 発現量を検討すると、NO-1886 による LPL の誘導と併用投与による IL-6 の発現減少が認められた。以上により、celecoxib は LPL の発現誘導剤との併用によりより高い腸発がん予防効果が期待出来ることが示唆された。

4. 目 的

我が国のがんの総死亡者数は約年間 35 万人となり、欧米型の食生活習慣の普及や高齢者の増加に伴い増加し続けている。同時に大腸がん等の罹患者数は今後も増加していくことが予想され、これらががんの予防法の確立は重要な研究課題である。疫学研究・臨床研究・動物実験のデータをもとにした包括的な調査では、がんの発生には食生活、喫煙、飲酒、運動など生活習慣が大きく影響しており、これらはがんの発生要因の 2/3 を占めていると推定されている¹⁻³⁾。また、動物発がん実験において高脂肪食は大腸発がんを明らかに促進する。また、高脂肪食により誘発される脂質異常症（特に高 TG 血症）もヒト大腸がんリスクと相関することが疫学的に示めされている⁴⁻⁶⁾。

一方、アスピリン等の非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs) が大腸がんの死亡率を 40% 減少させることが 1988 年に米国より報告されている。アジア人のエビデンスとしても、厚生労働省第 3 次対がん総合戦略研究事業の研究より、（特に家族性大腸腺腫症の患者に対する）アスピリンのがん化学予防剤としての有用性が報告されている。しかし、同時にアスピリンによる腸管出血等の副作用が臨床応用への問題点として残った。NSAIDs が活性阻害するシクロオキシゲナーゼ (COX) には、消化管の粘膜保護などに関与する COX-1 (構成酵素) と、炎症やがんに関与する COX-2 (誘導酵素) がある。Celecoxib は、COX-2 をターゲットにドラッグデザインされた、COX-2 選択的阻害剤であり、古典的 NSAID で見られる消化管障害を軽減でき、尚且つ家族性大腸腺腫症の患者に対する大腸がん化学予防剤として期待されていた。しかし、長期服用により、プロスタグランジン (PG) I₂ 産生阻害によると考えられる重篤な心血管障害が報告され、初の大腸がん化学予防剤としての候補から脱落してしまった⁷⁾。これらの結果は、NSAIDs の副作用を減らすことが NSAIDs を大腸がん化学予防剤として開発するためには必要であることを示している。

我々はこれまでに 2 種類の *Apc* 遺伝子欠損マウスの血清 TG 値が腸ポリープ生成と平行して経時的に急激に上昇することを見出している。更に、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) リガンドや NO-1886 (lipoprotein liase (LPL) 誘導剤) を用い、LPL を誘導/活性化させると *Apc* 遺伝子欠損マウスでみられる高 TG 血症状態を改善とともに、腸ポリープ生成数が減少することを見出してきた⁸⁻¹⁰⁾。他剤との併用により、NSAIDs の投与量を減らすことは副作用の抑制に繋がると考えられる。

本研究では、NSAIDs を先制医療のがん化学予防薬として用いることを目的に、NSAIDs の副作用を減らし、がん予防効果を維持もしくは増強する具体的方策を得るための基礎実験を行うことを目的とした。今回の報告書では大腸がん細胞を用いたスクリーニング検討、更には家族性大腸腺腫症のモデルマウスである *Min* マウスを用いた NO-1886 の投与群、NSAIDs であるセレコキシブの投与群、そして LPL 誘導剤と NSAIDs の併用群における腸ポリープ数の結果とそのメカニズム解析の結果に関して述べる。

5. 材料及び方法

(1) 細胞及び投与物質

ヒト大腸がん細胞株 SW48 細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) は、5% 牛胎児血清 (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA) と抗生物質を含有する DMEM 培地を用いて 37° C、5% CO₂ 培に保たれた加湿インキュベータ内にて培養した。LPL 選択的活性化剤 NO-1886 及び celecoxib は株式会社大塚製薬工場より供与を受けた。細胞に対しては 20 μM の NO-1886、2.5 μM の celecoxib をそれぞれ単独もしくは合わせて培地に添加し 24 時間暴露した。動物実験においては、それぞれ 300 ppm の濃度で粉末基礎飼料 (AIN-76A; 日本クレア株式会社) に混合して用いた。飼料の調整は週 1 回行った。

(2) 動物及び飼育環境

雌 C57BL/6-*Apc*^{Min/+} マウス (Min マウス) 及びその野生型 (C57BL/6J) マウスは The Jackson Laboratories 社 (Bar Harbor, ME, USA) より購入した。Min マウスの genotype の解析は、4 週齢の時に PCR-RFLP 法を用いて行った。Min マウス及び野生型マウスの凍結保存した尾サンプルから DNA を抽出し、The Jackson Laboratories 社によって設計されたプライマー (MAPCH3-F: 5' -TCTCG-TTCTGAGAAAGACAGAAGCT-3', MAPCH3-R: 5' -TGATACTTCTCCAAAGCTTTGGCTAT-3') を用いて PCR を行った。PCR の条件は、95° C で 1 分 30 秒間加熱後、94° C で 30 秒間、55° C で 30 秒間、72° C で 30 秒間の反応を 40 サイクル行い、最後に 72° C で 10 分間反応させた。RFLP は *Hind* III (株式会社ニッポンジーン, 東京) を用いて 37° C で 5~7 時間反応させた。Min マウスと野生型マウスに対応する各アレルの PCR 産物のサイズはそれぞれ 144 bp, 123 bp である。産物の検出は 4% アガロースゲル電気泳動で行い genotype を解析した¹¹⁾。動物はプラスチックケージ (235W x 325L x 170H mm) に 1 ケージ 4~5 匹を飼育し、温度 24 ± 2° C、湿度 55% を設定値として空調し、1 日 12 時間照明した。粉末基礎飼料 (AIN-76A, 日本クレア株式会社, 東京) 及びイオン交換水は自由に摂取させた。実験計画書は国立がん研究センター研究所実験動物倫理委員会の承認を受け、実験動物の取り扱いは「実験動物の飼育及び保管等に関する基準 (総理府)」ならびに国立がん研究センター研究所「実験動物取り扱い基準」に準じて行った。

(3) Min マウスの腸ポリープ発生に対する併用効果の検討

動物は 5 週齢の雌 Min マウスを用い、1 週間の馴化期間をおいた後、各群の体重が一定になる様に無作為に各群に振り分けた。6 週齢雌 Min マウスに 300 ppm NO-1886、300 ppm celecoxib、及び 300 ppm の用量で両剤の併用投与し、12 週間後にと殺解剖した。1 群あたりの動物数は、全て 15 匹とした。開腹後、肝臓、腎臓、脾臓及び心臓の重量を測定しホルマリンに固定した。更に、胃から肛門までを摘出し小腸中位部より肛門方向にホルマリンを注入した後、大腸及び小腸に分けて縦方向に開き、ペーパータオルに進展して挟んだ状態でホルマリン液中に固定した。小腸は近位、中位及び遠位に分けた。以上大腸も合わせ 4 部分について実体顕微鏡を用いて腸ポリープの数及びサイズ (長径、短径) を計測した。また小腸の非ポリープ部位の一部と肝の一部組織は、mRNA タンパク解析のために -80° C 凍結保存した。解剖時に採血して得た血清は -20° C または -80° C にて冷凍保存し、トリグリセリド値、総コレステロール値 (以上、酵素法) の測定を株式会社エスアールエルに依頼した。

(4) 炎症・増殖関連因子の mRNA 量の測定

小腸の正常粘膜はスライドガラスの角を使って掻き取り、それぞれ -80° C で保存した。スライドガラスを用いた場合、基底膜を残し、主に上皮細胞が回収できることを、標本切片にて、確認している。肝臓サンプルは全ての動物について尾葉を -80° C で冷凍保存し、下記に示す定量的 RT-PCR に用いた。ヒト細胞からの RNA の抽出及び定量的 RT-PCR も下記と同様な手順で行った。

RNA の抽出は ISOGEN (株式会社ニッポンジーン) を用いて行い、DNase I (Invitrogen, CA, USA) 処理を加えることにより、DNA を分解した。3 μg のトータル RNA からオリゴ (dT) プライマーと Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて cDNA を作製した。PCR 反応液

は cDNA と SYBR Green Realtime PCR Master Mix (東洋紡績株式会社) を用いて総量が 20 μ L と なるように調整した。用いた PCR プライマーの配列は以下の表にまとめる。Realtime-PCR 装置は MJ Research DNA Engine OPTICON 2 System (MJ Research, Inc., MA, USA) を用いた。94°C で 15 分間加熱し、cDNA をリニアにした後、94°C で変性を 20 秒間、60°C でアニーリング 30 秒間、72°C で合成 30 秒のサイクルを総計 39 サイクル行った。

Human 細胞に対して用いた PCR プライマーの配列を以下の表に示す。

Gene		プライマー配列
c-Myc	Forward	GCTCGCCCAAATCCTGTACCT
	Reverse	TCTCCACAGACACCACATCAATTC
COX-2	Forward	GATACTCAGGCAGAGATGATCTACCC
	Reverse	AGACCAGGCACCAGACCAAAGA
iNOS	Forward	CCGGCAAACCCAAGGTCTACGTT
	Reverse	CACATCCCGAGCCATGCGCACAT
P53	Forward	ATGTGCTGTGACTGCTTGTAGATG
	Reverse	TCAACAAGATGTTTTGCCAACTG
IL-8	Forward	CTGGCCGTGGCTCTCTTG
	Reverse	CCTTGCAAACACTGCACCTT
TNF α	Forward	AGTTCTTGGCCCACACCCTC
	Reverse	CAGGCTTGCTCACTCGAATTTTG
IL-6	Forward	AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC
	Reverse	GGTACATCCTCGACGGCATCT

マウスサンプルに対して用いた PCR プライマーの配列を以下の表に示す。

Gene		プライマー配列
LPL	Forward	GGATCCGTGGCCGAGCAGACGCAGGAAGA
	Reverse	GAATCCATCCAGTTGATGAATCTGGCCAC
IL-6	Forward	CTGTGACTCCAGCTTATCTG
	Reverse	CTCTGCAAGAGACTTCCATC
COX-2	Forward	GCTCGGCTTCCAGTATTGAG
	Reverse	AGAAGGAAATGGCTGCAGAA
IL-1 β	Forward	CTTCATCTTTGAAGAAGAGC
	Reverse	TGTACAAAGCTCATGGAGAA

(5) 統計学的解析

体重、摂餌、臓器重量、腸ポリープ数及び腸ポリープのサイズの統計学的解析には Student' s t-test を用いた。p < 0.05 である場合に有意であるとした。

6. 結 果

ヒト大腸がん細胞における炎症・増殖に関連する遺伝子の発現に対する NO-1886 または celecoxib の影響

NO-1886 及び celecoxib 単独投与による Min マウス腸ポリープ形成に与える抑制作用は確認されているが、NO-1886 と celecoxib を同時に作用させた時の投与による Min マウス腸ポリープ形

成に与える影響は明らかでない。NO-1886 と celecoxib の併用投与時のターゲット分子を明らかにする目的で、ヒト大腸がん細胞株 SW48 に NO-1886、celecoxib 及び NO-1886+celecoxib を投与して炎症や増殖に関わる遺伝子発現変化を RT-PCR にて検討した。検討した遺伝子は COX-2、c-Myc、IL-6、IL-8、iNOS、p53、TNF α の 7 種類である。20 μ M NO-1886 と 2.5 μ M celecoxib の併用投与後 24 時間の遺伝子発現変化で非投与群と比較し著明に抑制された分子として IL-6 が見出された。IL-6 は NO-1886 及び celecoxib の単独投与によっても mRNA 量の減少が認められたが、併用投与により明らかな相乗効果が認められた。

Min マウスの腸ポリープ発生に対する NO-1886 または celecoxib の影響

NO-1886(300 ppm)、celecoxib(300 ppm)及び NO-1886(300 ppm)+celecoxib(300 ppm)の Min マウスへの投与を 12 週間おこなったが、一般症状の異常は認められず、基礎飼料給餌群(非投与群)と薬剤投与群の摂餌量はほぼ同様であった。最終体重も薬剤投与群と非投与群との間に差は認められなかった。いずれの動物においても解剖時に胸腹部の臓器、組織に異常は認められず、肝臓、腎臓及び心臓への薬剤の影響は認められなかった。

18 週齢雄 Min マウスにおける腸ポリープはすべてのマウスに認められ、部位別では小腸の遠位の腸ポリープ数が最も多かった。大腸における腸ポリープの発生頻度は少なかった。野生型マウスにおける腸ポリープの発生は認めなかった。6 週齢雌 Min マウスに NO-1886 を 300 ppm の濃度で 12 週間混餌投与すると平均 100 個腸ポリープが生成し、非投与群において平均 122 個生成した腸ポリープ数とほぼ同様であった。また、celecoxib を 300 ppm の濃度で 12 週間混餌投与すると平均 103 個腸ポリープが生成し、こちらも非投与群とほぼ同様であった。しかしながら、NO-1886 と celecoxib を併用投与すると腸ポリープは平均 61 個生成し、非投与群の腸ポリープ数と比べ有意に少なかった($p<0.01$)。小腸部位別に検討すると NO-1886 も celecoxib も単独で小腸近位部において腸ポリープ生成抑制が認められたが、併用投与すると更に小腸遠位部においても腸ポリープ生成抑制が認められた。予想外に大腸においては celecoxib 単独投与群において腸ポリープ数の増加が認められた。血清トリグリセリド値は、NO-1886 投与によって若干の低下を認めたが、celecoxib 投与によって明らかな低下が認められた。併用投与群においては血清トリグリセリド値、血清コレステロール値、血清遊離脂肪酸値の有意な減少を認めた。

腸ポリープ抑制メカニズムの検討

Min マウスにおける腸ポリープ抑制メカニズムの検討のため、小腸の非ポリープ粘膜における COX-2 mRNA の発現量を検討したが、各投与群とも明らかな変化を認めなかった。また、PGE₂ 量 (ng/mg mucosa) を測定したが、celecoxib 投与によって非投与群の約 2 倍の PGE₂ 量が認められた。NO-1886 と併用群は非投与群とほぼ同様な値であった。NO-1886 の効果を確認する目的で肝臓組織における LPL の発現量を計測した。その結果、非投与群と比べ 3 倍近い LPL の誘導が認められた。*In vitro* の結果を確認する目的で肝臓組織における IL-6 の発現量を計測したところ、NO-1886 投与群と併用投与群において明らかな IL-6 mRNA 発現量の減少が確認できた。加えて、IL-1 β mRNA 発現量の減少も認められた。

以上のことより、NO-1886 と celecoxib との併用投与は効果的に *Apc* 欠損マウスの腸ポリープ生成を抑制することが明らかとなった。また、その抑制メカニズムとして IL-6 発現量の減少などの抗炎症作用の寄与が考えられた。

7. 考 察

NO-1886 と celecoxib の併用投与時のターゲット分子として新たに IL-6 が大腸がん細胞を用いた検討により見出された。なぜ NO-1886 や celecoxib の単独投与よりも併用投与の方が効果的に IL-6 mRNA 量を減少させたのかは現時点では不明であり、更なる検討が必要である。今回はがん細胞を用いてスクリーニングを行ったが、IL-6 がサイトカインであることを考えるとがん細胞から産生される IL-6 によるオートクラインやパラクライン作用による異常上皮細胞増殖より

も、例えばマクロファージのような炎症性細胞や間質細胞から産生される IL-6 による異常上皮細胞増殖を想定するのが論理的と考えられる。そのため今後、マクロファージのような炎症性細胞や間質細胞における NO-1886 や celecoxib の単独投与および併用投与による検討が望まれる。

これまでに我々は脂質異常症状態を呈する *Apc* 欠損マウスにおけるスタチン (pitavastatin) の腸ポリープ生成抑制作用を報告している¹¹⁾。この検討において、小腸粘膜における COX-2 をはじめ、炎症に係るアディポサイトカイン (IL-6, MCP-1 及び Pai-1) の発現が pitavastatin 投与により抑制されることを示した。この結果は IL-6 が大腸発がんにも寄与している分子であることを示している。更に、IL-6 遺伝子欠損 Min マウスを用いた検討により IL-6 欠損 Min マウスにおける腸ポリープ生成数は、IL-6 野生型の Min マウスより 32%低下したことが報告されている¹²⁾。そこで、併用投与による IL-6 の低下作用は *in vivo* の検討においても有用な成果に繋がると考えた、つまり、次に我々は、NO-1886 と celecoxib との併用投与により、より効果的に Min マウスの腸ポリープ生成を抑制出来ると考え、動物を用いた検討を実施した。

In vivo における投与量の設定には、これまで報告されている論文をもとに NO-1886 や celecoxib においてやや有効と考えられる用量を用いることとした。例えば、他剤との併用を実施している celecoxib の報告ではその用量は 300 ppm であった¹³⁾。また、400 ppm NO-1886 の投与による Min マウスの腸ポリープ生成抑制は約 50%であり、300 ppm NO-1886 ではより抑制率が低下し、併用による効果を検討できると予想された。今回の検討では、NO-1886 や celecoxib の単独投与では腸ポリープ生成抑制は若干認められたものの、併用投与では明らかな減少が認められ、予想通りの結果を得ることが出来た。また、NO-1886 は肝臓組織における LPL の誘導が確認でき、薬効が確認できた。しかし、腸粘膜における PGE₂ 量の減少は celecoxib または併用投与で認めることが出来なく、celecoxib の薬効は確認できていない。これは正常腸粘膜における PGE₂ 量は微量であるため、有効な測定が出来ていないことが理由と考えられる。興味深いのは、NO-1886 の *Apc* へ変異マウスにおける血清 TG 値の低下作用は弱く認められたが、celecoxib は著明に血清 TG 値を低下させたことである。これまでに NSAIDs であるインドメタシン、またはモフェゾラックにも血清 TG 値低下作用が報告されている¹⁴⁾。今後 NSAIDs による脂質異常症改善作用の情報を蓄積し、そのメカニズムを明らかにする必要があることであろう。以上より、NO-1886 と celecoxib との併用投与により Min マウスの腸ポリープ生成が有効に抑制されると考えられ、ヒトがん化学予防剤の投与方法として利用できる可能性が示された。

本報告はまだ中間報告の段階であり、今後さらに併用療法の詳細な機序を解明する必要がある。また、NSAIDs の服用量を減らし、他剤との併用によりがん予防効果を維持/増強する方法以外にも NSAIDs の副作用を標的とした薬剤との併用の有効と考えられる。更には家族性大腸腺腫症患者におけるアスピリン介入試験により得られた既存のサンプルを用い、エピジェネティックな変化に関連する因子およびリン酸化 AMPK の変化等を検討することにより、大腸がんの病態について新たな知見が得られるものと考えられる。

8. 参考文献

1. Stewart BW, Kleihues P, eds. (2003) World Cancer Report. Lyon: IARC Press, 12-7.
2. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN. (1998) Eating patterns and risk of colon cancer. *Am. J. Epidemiol.*, **148**, 4-16.
3. Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S. (1999) Food groups and colorectal cancer risk. *Br. J. Cancer*, **79**, 1283-1287.
4. Yamada K, Araki S, Tamura M, *et al.* (1998) Relation of serum total cholesterol, serum triglycerides and fasting plasma glucose to colorectal carcinoma *in situ*. *Int. J. Epidemiol.*, **27**, 794-798.
5. Kaye JA, Meier CR, Walker AM, Jick H. (2002) Statin use, hyperlipidaemia, and the risk of breast cancer. *Br. J. Cancer*, **86**, 1436-1439.
6. Otani T, Iwasaki M, Ikeda S, *et al.* (2006) Serum triglycerides and colorectal adenoma in a case-control study among cancer screening examinees (Japan). *Cancer Causes Control*, **17**,

1245-1252.

7. Fitzgerald GA. (2004) Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med.*, **351**, 1709-1711.
8. Niho N, Takahashi M, Kitamura T, *et al.* (2003) Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in *Apc*-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res.*, **63**, 6090-6095.
9. Niho N, Takahashi M, Shoji Y, *et al.* (2003) Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a PPAR gamma ligand. *Cancer Sci.*, **94**, 960-964.
10. Niho N, Mutoh M, Takahashi M, Tsutsumi K, Sugimura T, Wakabayashi K. (2005) Concurrent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation by NO-1886, increasing lipoprotein lipase activity in Min mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 2970-2974.
11. Teraoka N, Mutoh M, Takasu S, *et al.* (2011) Inhibition of intestinal polyp formation by pitavastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor. *Cancer Prev Res*, **4**, 445-453.
12. Baltgalvis KA, Berger FG, Pena MM, Davis JM, Muga SJ, Carson JA. (2008) Interleukin-6 and cachexia in *ApcMin/+* mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **294**, R393-R401.
13. Rao CV, Steele VE, Swamy MV, Patlolla JM, Guruswamy S, Kopelovich L. (2009) Inhibition of azoxymethane-induced colorectal cancer by CP-31398, a TP53 modulator, alone or in combination with low doses of celecoxib in male F344 rats. *Cancer Res.*, **69**, 8175-8182.
14. Niho N, Mutoh M, Komiya M, *et al.* (2007) Improvement of hyperlipidemia by indomethacin in Min mice. *Int. J. Cancer*, **121**, 1665-1669.

