

令和元年6月13日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09077

研究課題名(和文) 胃の発癌に係るハイリスク胃炎に対するブラックラズベリーパウダーの効果の検討

研究課題名(英文) A pilot study to investigate the biological modulation of gastric carcinogenesis by lyophilized black raspberries.

研究代表者

櫻澤 信行 (SAKURAZAWA, NOBUYUKI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90328807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、成人のH. pylori除菌後の慢性胃炎に対する凍結乾燥されたブラックラズベリー(BRBs)の効果进行调查することである。患者を除菌後に4週間BRBsを摂取する群とコントロールに分けた。その後内視鏡的に慢性胃炎を評価し、また生検組織から細胞分裂と炎症のバイオマーカーを免疫染色法にて評価した。結果は内視鏡所見にてコントロール群は変化なく、BRBs群には軽度の改善傾向が見られたが統計的に有意差は無かった。免疫染色でバイオマーカーであるKi-67、ODC、COX-2とiNOSにおけるBRBs群とコントロール群で有意差は無かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はピロリ菌除菌のみでは完全に回復できない胃癌の発癌プロセスをBRBという食品を摂取することにより改善できるかを確かめる研究である。先に述べた食道や大腸ではその効果が確認されており、胃でもこの効果を確かめることは非常に重要であると考え。日本ではBRBは食品としてあまり馴染みが無いが欧米では日常によく摂取されるもので、この研究でBRBが胃癌の予防に有用であれば特別な薬剤を使用したり、病院に通院も必要とせず、自宅で簡単にできることで社会に与えるインパクトは大きい、また医療費の削減にも寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to investigate the effects of lyophilized black raspberries (BRBs) in a cohort of adult individuals who have been diagnosed as chronic gastritis after eradication of H. pylori. The patients were treated with BRBs for 4 weeks. At the end of four weeks, we endoscopically evaluated chronic gastritis and tested for changes in biomarkers of cell proliferation and inflammation by immunohistochemistry in gastric biopsy specimens sampled from premalignant metaplastic columnar epithelium and adjacent normal tissue of all berry treated and control patients. As a result, we observed mild improvement of endoscopic gastritis scoring in patients with BRBs-treatments without statistical significance, while no change was observed endoscopically in control patients. No significant changes in selected biomarkers, such as Ki-67, ODC, COX-2 and iNOS, were observed in gastric specimens from BRBs-treated patients as compared with those from pre-treatments.

研究分野：胃がん

キーワード：臨床 胃癌 ブラックラズベリーパウダー

1. 研究開始当初の背景

日本において胃癌はいまだに罹患率も高く、また死亡率の高い癌で、それを予防することは非常に重要なことであり、国民の幸福追求だけでなく大幅な医療費の削減にもつながることである。

胃癌を発症する要因として、ピロリ菌感染との関係が証明されており、ピロリ菌感染による胃粘膜の炎症が長期継続することによって、萎縮性胃炎、腸上皮化生などの慢性胃炎を引き起こし、その一部は遺伝子変化を誘導し、胃癌に進展することが明らかになっている。萎縮性胃炎を起こした胃粘膜は、発がん物質やピロリ菌の出す毒素の攻撃に弱く、これが胃癌発症に大きく関係すると考えられている。

ピロリ菌が発見された患者さんにはピロリ菌の除菌が推奨されているが、腸上皮化生を伴う萎縮性胃炎やなどのハイリスク胃粘膜は除菌後も残存することが多い。

ピロリ菌の除菌治療により、胃がんが減少する可能性が示唆されているが、発がん母地となる遺伝子変化を伴う慢性胃炎は除菌のみで改善するとは考えにくく、除菌のみで十分な胃癌の予防となるかは明らかになっていない。

一方で自然の果実であるブラックラズベリー（以下 BRB）は Chemoprevention(発癌予防)の研究領域において食道がん、大腸がんなどで多く研究され予防の可能性が示唆されている(Teel et al., 1985; Mandal et al., 1990; Kelloff, et al, 1999; Harris et al., ; Morse et al., 20012002; Wang et al., 2014)。

食道癌や大腸癌の発生機序とされる慢性炎症に伴う遺伝子変化を改善することが報告されているが、その機序としては BRB の成分の中でも高濃度にみられるアントシアニン、ポリフェノールなどの強い抗酸化物質などが注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、ピロリ菌感染によって引き起こされたハイリスク胃粘膜の慢性炎症性変化が除菌後さらに BRB を摂取することにより改善し、胃の発癌リスクが軽減するかどうかを明らかにすることを目標としている。そのため、ピロリ菌除去治療が必要な患者を対象に除菌後の BRB 摂取による胃の発癌リスクの軽減との関係をランダム化試験で検討する。生検組織を用いて慢性炎症反応を PCNA (proliferative cell nuclear antigen), Ki-67, ODC (ornithine decarboxylase), Cox2 (cyclooxygenase 2), iNOS (inducible nitric oxide synthase)の発現変化によって評価し、BRB 摂取による保護効果を検討する。

3. 研究の方法

[対象患者]

2015年7月から2018年6月の間に日本医科大学千葉北総病院外科にてピロリ菌感染で診療した症例を対象として、前向き観察研究を行った。

[処置グループ選定方法]

封筒法を用いて Control 群と BRB 摂取群の 2 グループのいずれかを決めた。除菌治療は、保険医療で定められた通常の薬物治療で行い、効果判定は治療が終了してから約 1 か月経過した後に便中抗原あるいは呼気試験で行った。一方、BRB の摂取は freeze-dried BRB パウダーを 1 日量 60g、朝夕 2 回に分けて摂取。BRB はパウダーのままでは摂取しにくいいため、水、ミルク、ヨーグルトなどに溶かして 4 週間摂取した。

【除外基準】

- 1) 40 歳未満の症例
- 2) 除菌治療の既往を有する症例
- 3) 出血傾向を有する症例または抗凝固治療薬を服用している症例
- 4) BRB を摂取することが不可能と思われる症例
- 5) 胃切除の既往のある症例
- 6) 薬剤あるいは食物アレルギー、過敏症を有する症例
- 7) 他の理由で医師が除外すべきと判断される症例

[内視鏡検査による慢性胃炎の診断]

[所見]: 萎縮性胃炎、腸上皮化生、発赤、出血、潰瘍など

[程度]: 所見の強さに応じて - から +++ で表現する

[範囲]: 胃体上部、中部、下部、幽門前庭部

大弯、小弯、前壁、後壁等記載

[生検] (胃粘膜採取)

所見の強い部位を主体に採取する。

原則的には、前庭部、胃体部大弯、小弯の3点生検法に順じる。

内視鏡検査は除菌治療の完了後とBRB摂取終了後に施行し効果判定する。内視鏡検査では慢性胃炎の所見を評価した上で、胃粘膜の3点生検(前庭部、胃体部大弯、胃体部小弯)を行う。

[内視鏡検査による慢性胃炎の診断]

個々の胃癌の発生リスクや除菌後胃癌の発生リスクなどの評価には、第85回日本消化器内視鏡学会総会においてシンポジウム「胃がん撲滅に向けた内視鏡的胃炎の意義」、ワークショップ「新たな内視鏡的胃炎分類「Up dated 京都分類」を目指して」の意見交換の後、作成されたH. pylori感染動態と内視鏡所見との関連を包括した分類「胃炎の京都分類」を用いた(Table1)。

Table1. 胃がんリスクの内視鏡所見スコア (胃炎の京都分類)

●萎縮：白色光とIEE観察は区別しない。 A→0 (無C0~C1), 1 (軽度C2~C3), 2 (高度O1~OP)
●腸上皮化生：白色光観察とIEE観察を区別する。 ※IEE (NBI, BLI) ではLBC, WOSの程度と範囲を評価する。 ※IEE観察は括弧内で表記するが、合計には含めない。例：IM1 (2) IM→0 (なし), 1 (前庭部), 2 (前庭部・体部)
●縦裂腫大 H→0 (なし), 1 (あり)
●高具 H→0 (なし), 1 (あり)
●びまん性発赤 (体部領域の集合細静脈の透見性)：除菌後の変化も考慮する。 DR→0 (なし), 1 (軽度：一部にRAC+), 2 (高度)
★記載方法：全因子を表示、合計スコアを最後の括弧内に示す(最小0~最大8)。 例：A1 IM1 (2) H1 N1 DR2 (6)

なお本研究では臨床情報や患者検体を利用するため、日本医科大学千葉北総病院倫理委員会の承認を得ている。

[組織学的検討]

組織学的検討用の組織採取後10%ホルマリンで固定後、パラフィンブロックを作成、シランコートされたスライドガラスに切片を接着、通常の病理標本を作成した。

HE染色にて生検より得られた標本を観察。萎縮、腸上皮生、炎症細胞浸潤の有無程度を評価した。

免疫組織染色

脱パラフィン後、3%のH₂O₂を3分、流水5分後、ブロッキング用正常血清(VECTASTAIN Elite ABC kit)を行なった。1次抗体はPCNA (proliferative cell nuclear antigen, 10205-2-AP, Pprotein Tech), Ki-67(PA5-19462, Thermo Fisher SCIENTIFIC), ODC (ornithine decarboxylase, 17003-1-AP, Pprotein Tech), Cox2 (cyclooxygenase 2, MA5-14568, Thermo Fisher SCIENTIFIC), iNOS (inducible nitric oxide synthase, PA1-036, Thermo Fisher SCIENTIFIC)抗体、1:100を4度で一晩反応させた。その後、二次抗体を室温で1時間反応。アビジン-ビオチン標識酵素複合体(VECTASTAIN Elite ABC kit)を室温で30分反応後、発色を行った。発色基質は3,3',-diaminobenzidine (以下DAB) (Nichirei, Ibkyo)を用いた。染色後、標本の写真を撮影して、免疫染色画像解析・計測ソフトウェア・WinROOF2018 Standard (三谷商事株式会社)を用いて陽性細胞をカウント、陽性細胞率の算出を行った。

[分子生物学的検討]

組織採取後、分子生物学的検討用の検体は、ただちに液体窒素で凍結した。凍結後の検体はRNA精製まで-80度のディープフリーザーで保管した。

[RNA 精製方法]

採取した組織をMaxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit (Promega, Japan)を用いてRNAの抽出を行った。RNAはQuanti-Fluor RNA sample kitで希釈した後、Quantus™ Fluorometer (Promega, Japan)でRNA濃度を測定した。

[cDNA 作成方法]

RNA 0.5 µg を鋳型として逆転写反应用プレミックス試薬 PrimeScript™ RT Master Mix (RR036A, Takara, Japan) を用いて cDNA を作成した。逆転写反応後、cDNA は-80 度のディープフリーザーで保管した。

[RealtimePCR]

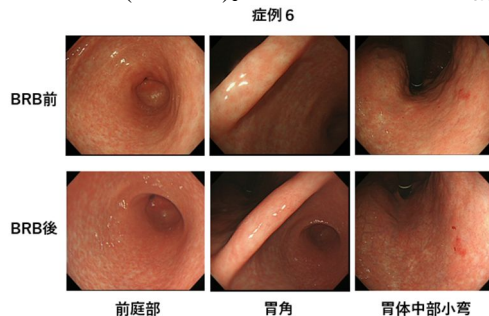
作成した cDNA を TaqMan™ Gene Expression Assay のシステムで PCNA(Hs00696862_m1) Ki-67(Hs01032443_m1) ODC1(Hs00159739_m1) COX2(Hs00153133_m1)、iNOS2(Hs01075529_m1) GAPDH(Hs99999905_m1)の遺伝子発現を調べた。計測には ABI RealTimePCR 7500 Fast (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

[統計処理]

データは、平均値 ± 標準偏差として表示し、統計学的有意差は、二元配置分散分析後、胃癌リスクの内視鏡所見スコアの解析は Wilcoxon 符号付順位和検定) で解析を行った。免疫染色は paired t 検定、Mann Whitney U により解析した。検定における有意水準は 5% とした。

4 . 研究成果

1;胃炎の内視鏡でのスコアは BRB 群で施行前に比較して施行後に軽快傾向にあったが、有意差はなかった(P=0.149)。またコントロール群では施行 後前も施行後もスコアは変化なかった。



2;組織標本の病理の免疫染色にて Ki-67 の発現頻度は BRB 群で施行前に比較して施行後も有意差は無かった(P=0.305)。同様に ODC も有意差無し(P= 0.959)。また Cox2(P=0.984)と iNOS(P=0.316)も有意差は無かった。コントロール群も同様に有意差は無かった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮下正夫

ローマ字氏名：MIYASHITA Masao

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：教授
研究者番号（8桁）：70299847

(2)研究協力者
研究協力者氏名：松田明久
ローマ字氏名：MATSUDA Akihisa

(3)研究協力者
研究協力者氏名：山田真吏奈
ローマ字氏名：YAMADA Marina

参考文献

Kelloff GJ, Sigman CC, Greenwald P. Cancer Chemoprevention: Progress and Promise. *European Journal of Cancer* 1999; 35(13), 1755-1762.

Teel RW, Dixit R, and Stoner GD. The effect of ellagic acid on uptake, persistence, metabolism and DNA-binding of benzo(a)pyrene in cultured explants of strain A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 1985; 6, 391-395, 1985

Mandal S and Stoner GD. Inhibition of N-nitrosobenzylmethylamine induced esophageal tumorigenesis in rats by ellagic acid. *Carcinogenesis* 1990; 11, 55-61, 1990.

Kresty LA, Morse MA, Morgan C, Carlton PS, Lu J, Gupta A, Blackwood M, Stoner GD. Chemoprevention of esophageal tumorigenesis by dietary administration of lyophilized black raspberries. *Cancer Res* 2001; 61:6112-6119, 2001.

Harris, GK, Gupta A, Nines RG., Kresty LA, Habib SG, Frankel WL, LaPerle K, Gallaher DD, Schwartz SJ, and Stoner GD. Effects of BRBS on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine levels in Fischer 344 rats. *Nutrition and Cancer* 2002; 40(2):125-133.

Ji YN, Wang Q, Li Y, Wang Z. Prognostic value of vascular endothelial growth factor A expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014. 35(3):2787-93.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。