

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590407  
 研究課題名（和文）炎症性大腸がんにおける一酸化窒素のジェネティック作用とエピジェネティック作用  
 研究課題名（英文）Genetic and epigenetic alterations induced by nitric oxide in the inflammation-related colon carcinogenesis.  
 研究代表者  
 甲野 裕之  
 金沢医科大学・看護学部・教授  
 研究者番号：20221236

研究成果の概要：炎症を背景とする大腸がん発生および進展における一酸化窒素（NO）のジェネティック作用とエピジェネティック作用を検討する目的で研究を行った。本研究により、炎症を背景とする大腸がん発生および進展において、NOは大腸がんの発生初期段階では主にジェネティックな変化に関与し、がんの進展過程ではエピジェネティックな変化に関与する可能性が示唆された。これらの成果は炎症を背景とするがん発生へのNOの産生制御を利用した発生予防への応用に役立つものと考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症性大腸がん、ジェネティック作用、エピジェネティック作用、一酸化窒素、サイトカイン、iNOS

#### 1. 研究開始当初の背景

がんの発生、進展には複数のがん関連遺伝子の突然変異や欠失などのジェネティックな変化と、DNAメチル化をはじめとするエピジェネティックな変化が関与すると考えられている。近年急速な増加が問題となっている潰瘍性大腸炎（UC）などの炎症性腸疾患を背景とする大腸がん（colitic cancer）の発生においても、ジェネティックな変化およびエピジェネティックな変化の関与が示唆されており、これらを解析することは極めて重要な課題といえる。一方、

ヒト炎症性腸疾患では、大腸粘膜における一酸化窒素（NO）産生の増加、誘導型NO合成酵素（iNOS）遺伝子の発現増強、腸管粘膜上皮でのiNOS陽性細胞の増加など、NOの関与が報告されており、NOによるcolitic cancer発生への関わりが注目されている。

NOはその代謝過程でフリーラジカルやニトロソアミンを生成し、DNA傷害や突然変異などのジェネティックな変化を引き起こし、発がんに関与していると考えられてきたが、p53関連遺伝子であるp14<sup>ARF</sup>のメチル化亢進、CpG islandのメチル化亢進などのエピジェ

ネティックな変化にも関与することが報告されている。炎症関連大腸発がんにおいても、NOによるジェネティック作用およびエピジェネティック作用が関わっていることが考えられるが、その作用機序については未だ不明な点が多い。

我々は、ヒトの colitic cancer に類似し、短期間で高頻度に大腸がんを誘発できる、炎症を背景とした ICR マウス大腸発がんモデルおよび *Apc*<sup>Min/+</sup> (Min) マウス大腸発がんモデルを作出し、炎症反応による大腸発がんへの関わりについて解析を行ってきた。その中で、発がん初期の段階で大腸粘膜および大腸がん前駆病変部でNO損傷の指標とされるニトロチロシンの発現が著明に増加すること、また発生した大腸腫瘍において iNOS 発現が著明に増加すること、iNOS の mRNA レベルは発がんおよび進展のいずれの段階でも高く維持されていることなどを観察しており、炎症を背景とする大腸発がんにおいてNOの産生が重要な役割を担っていることを見出している。さらに、ICR マウス大腸発がんモデルで発生した腫瘍では *β-catenin* 遺伝子変異が高頻度に認められるが、Min マウス大腸発がんモデルで発生した腫瘍では発がん関連遺伝子 (*β-catenin*, *p53*, *K-ras*) の変異は認められないことから、炎症を背景とするマウス大腸発がんモデルにおいてはジェネティックな変化のみならず、エピジェネティックな変化も大腸がん発生に深く関わっている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、炎症を背景とする大腸発がんにおけるNOのジェネティック作用およびエピジェネティック作用を解明することを目的に、iNOS 欠損マウスと野生型マウスあるいは iNOS 欠損 Min マウスと Min マウスとの発がん感受性の相違を検討し、炎症を背景とする大腸発がんにおけるNOの関与を検討した。また、発生した腫瘍や非腫瘍性病変における発がん関連遺伝子 (*β-catenin*, *p53*, *K-ras*) の変異、タンパク質の発現異常、DNA メチル化を中心に病理学的、分子生物学的な解析を行い、炎症を背景とする大腸がん発生におけるNOのジェネティック作用およびエピジェネティック作用を検討した。さらに、iNOS 特異的阻害剤による炎症関連大腸がんの修飾作用を検討し、大腸発がん過程における NO の関与時期の解析、iNOS 特異的阻害剤による発がん修飾作用の可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

- (1) iNOS 欠損マウスおよび野生型マウスを用いた炎症関連大腸がんの誘発および

### 病変の解析

iNOS 欠損マウスおよび野生型 (C57BL/6J) マウス (5 週齢) に大腸がん誘発物質である Azoxymethane (AOM) 10 mg/kg 体重を単回腹腔内投与し、AOM 投与後 1 週目から 1% DSS を 1 週間飲水投与し、大腸がんを誘発した。動物は実験開始から 20 週目に屠殺し、採血、大腸の摘出等を行った。摘出した大腸組織は、病理組織化学的解析、免疫組織化学的解析、ジェネティックおよびエピジェネティックな変化の解析に供した。

- (2) iNOS 欠損マウス/Min マウスおよび Min マウスを用いた炎症関連大腸がんの誘発  
iNOS 欠損マウス/Min マウスおよび Min マウスによる発がん感受性の相違を観察するために、各マウス (7 週齢) に 1% DSS を 1 週間飲水投与した。DSS 投与後、4 週目に各マウスを屠殺し、採血後大腸を摘出し、(1)と同様の解析に供した。

- (3) AOM/DSS 誘発炎症関連大腸発がんモデルを用いた選択的 iNOS 阻害剤による修飾作用

C57BL/6J マウス (5 週齢) に AOM (10 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与し、AOM 投与後 1 週目から 1% DSS を 1 週間飲水投与し、大腸がんを誘発した。DSS 投与後 1 週から選択的 iNOS 阻害剤 1,3-phenylenedi-2,1-ethanediyl ester (1,3-PBIT) を 10 ppm または 50 ppm の濃度で混餌投与した。動物は実験開始から 20 週目に屠殺し、採血後大腸を摘出し各種解析に供した。

- (4) Min マウス炎症関連大腸がんモデルを用いた選択的 iNOS 阻害剤による修飾作用

Min マウス (7 週齢) に 2% DSS を 1 週間飲水投与し大腸がんを誘発した。DSS 投与 1 週間前から選択的 iNOS 阻害剤 (ONO-1714) を 50 ppm または 100 ppm の濃度で混餌投与した。DSS 投与開始後 4 週目に各マウスを屠殺し、採血後大腸を摘出し各種解析に供した。

## 4. 研究成果

- (1) iNOS 欠損マウスおよび野生型マウスを用いた炎症関連大腸がんの誘発および病変の解析

炎症関連大腸発がんモデルにおける一酸化窒素 (NO) の関与を検討する目的で、iNOS 欠損マウスおよび野生型マウスにおける大腸がん発生の比較検討を行った。iNOS 欠損マウスおよび野生型マウスいずれにおいても大腸腫瘍が発生したが、両マウス間に総腫瘍数、大腸腺腫数、大腸腺がん数に有意な差は認められなかった。また、野生型マウスでは、発生した腫瘍ならびに非腫瘍部

大腸粘膜において、iNOS 発現の顕著な増加が観察された。

ジェネティックな変化を検討するために、発生した腫瘍の  $\beta$ -catenin、p53、K-ras の遺伝子変異を解析したところ、すべての腫瘍において  $\beta$ -catenin 遺伝子の変異が認められたが、両マウス間の差は認められなかった。また、発生したいずれの腫瘍でも p53、K-ras の変異は観察されなかった。

一方、エピジェネティック作用を検討するために、ヒト潰瘍性大腸炎の大腸粘膜において DNA メチル化の上昇が認められる estrogen receptor 1 exon2 領域を中心に DNA メチル化の解析を行った。非腫瘍部大腸粘膜の解析では、両マウスにおいて、この領域でのメチル化に大きな変化は認められなかった。さらに、発生した大腸がんについて DNA メチル化解析を行った結果、大腸がん特異的にメチル化される候補領域が 10 領域見出された。

(2) iNOS 欠損マウス/Min マウスおよび Min マウスを用いた炎症関連大腸がんの誘発

大腸発がんとの関連が知られている APC 遺伝子に変異をもつ Min マウスと iNOS 欠損マウスを交配した iNOS 欠損マウス/Min マウスを作製し、iNOS 欠損マウス/Min マウスと Min マウスにおける大腸がん発生の比較検討を行った。Min マウスと同様に、iNOS 欠損マウス/Min マウスにおいても大腸腫瘍の発生が認められ、総腫瘍数、大腸腺腫数、大腸腺がん数に Min マウスとの差は認められなかった。

また、非腫瘍部大腸粘膜では、iNOS 欠損マウス/Min マウスと Min マウスともに炎症に関わる cyclooxygenase (COX)-2、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-1 $\beta$  の有意な発現増加が観察されたが、両マウス間に差は認められなかった。さらに、Min マウスでは腫瘍部、非腫瘍部とも iNOS の発現が亢進していた。

一方、血中 NO 濃度は、iNOS 欠損マウス/Min マウス、Min マウスとも無処置対照群に比べ著明な上昇を認めたが、両者に有意な差は認められなかった。

これらのことから、iNOS 欠損マウス/Min マウスでは iNOS の代わりに eNOS、nNOS などが誘導され、これらによる NO 産生の亢進が大腸発がんに関与している可能性が示唆された。

(3) AOM/DSS 誘発炎症関連大腸発がんモデルを用いた選択的 iNOS 阻害剤 (1,3-PBIT) による修飾作用

選択的 iNOS 阻害剤 (1,3-PBIT) によるプロモーション相への影響を検討した結果、1,3-PBIT 投与による総腫瘍数、大腸腺腫数、

大腸腺がん数の有意な抑制は観察されなかった。また、発生した腫瘍の  $\beta$ -catenin 遺伝子変異解析では、いずれの腫瘍でも変異が観察されたが、1,3-PBIT 投与群と陽性対照群間に有意な差は認められなかった。

(4) Min マウスを用いた炎症関連大腸がんモデルを用いた iNOS 選択的阻害剤 (ONO-1714) による修飾作用

Min マウスを用いた炎症関連大腸がんモデルにおける選択的 iNOS 阻害剤 (ONO-1714) の発がんへの影響を検討した結果、ONO-1714 の投与により大腸腫瘍の発生個数が有意に減少することが確認された。さらに、ONO-1714 投与群では、DSS 投与により亢進した大腸粘膜非腫瘍部の COX-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現の顕著な低下が認められた。

これらの結果から、DSS による大腸炎発生の初期段階において NO が中心的役割を担っており、NO 産生を抑制することにより COX-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの炎症関連因子の産生が抑制され、その結果、炎症反応も抑制され、さらには大腸がんのは性も抑えられる可能性が示唆された。

選択的 iNOS 阻害剤は AOM 誘発大腸発がんモデルにおける大腸がん発生を抑制することが報告されており、NO が大腸発がん過程におけるジェネティックな変化に関与していると考えられてきたが、炎症を背景とする大腸がんモデルを用いた本研究により、NO が大腸発がん過程におけるエピジェネティックな変化にも関与している可能性が示唆された。これらの成果は、炎症を背景とするがん発生への NO 産生制御を利用した発がん予防への応用に役立つものとする。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Y. Yasui, S. Miyamoto, M. Kim, H. Kohno, S. Sugie, T. Tanaka: Aqueous and ethanolic extract fractions from the Brazilian propolis suppress azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Oncol. Rep.*, 20:493-499 (2008) 査読有
- ② Y. Yasui, M. Kim, T. Tanaka: PPAR Ligands for Cancer Chemoprevention. *PPAR Res*, 2008:548919 (2008) 査読有
- ③ S. Miyamoto, Y. Yasui, T. Tanaka, H. Ohigashi, A. Murakami: Suppressive effects of nobiletin on hyperleptinemia and colitis-related colon carcinogenesis in male ICR mice. *Carcinogenesis*, 29: 1057-1063 (2008) 査読有
- ④ S. Miyamoto, F. Epifano, M. Curini, S. Genovese, M. Kim, R. Ishigamori-Suzuki,

- Y. Yasui, S. Sugie, T. Tanaka: A novel prodrug of 4'-geranyloxy-ferulic acid suppresses colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Nutr. Cancer*, 60: 675-684 (2008) 査読有
- ⑤ H. Kohno, M. Takahashi, Y. Yasui, R. Suzuki, S. Miyamoto, Y. Kamanaka, M. Naka, T. Maruyama, K. Wakabayashi, T. Tanaka: A specific inducible nitric oxide synthase inhibitor, ONO-1714 attenuates inflammation-related large bowel carcinogenesis in male *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. *Int. J. Cancer*, 121:506-513 (2007) 査読有
- ⑥ H. Kohno, R. Suzuki, Y. Yasui, S. Miyamoto, K. Wakabayashi, T. Tanaka: Ursodeoxycholic acid versus sulfasalazine in colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Clin. Cancer Res.*, 13:2519-2525 (2007) 査読有
- ⑦ H. Kohno, Y. Totsuka, Y. Yasui, R. Suzuki, S. Sugie, K. Wakabayashi, T. Tanaka: Tumor-initiating potency of a novel heterocyclic amine, aminophenylnorharman in mouse colonic carcinogenesis model. *Int. J. Cancer*, 121:1659-1664 (2007) 査読有
- ⑧ K. Hayashi, R. Suzuki, S. Miyamoto, S. Yoshitani, H. Kohno, S. Sugie, S. Takashima, T. Tanaka: Citrus auraptene suppresses azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-*db/db* mice. *Nutr. Cancer*, 58:75-84 (2007) 査読有
- ⑨ Y. Yasui, R. Suzuki, S. Miyamoto, T. Tsukamoto, S. Sugie, H. Kohno, T. Tanaka: A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis, *Int. J. Cancer*, 121:2331-2339 (2007) 査読有
- ⑩ Y. Yasui, R. Suzuki, H. Kohno, S. Miyamoto, F. Beppu, M. Hosokawa, K. Miyashita, T. Tanaka: 9trans,11trans conjugated linoleic acid inhibits the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats, *Nutr. Cancer.*, 59:82-91(2007) 査読有
- [学会発表] (計14件)
- ① K. Yamaguchi, H. Kohno, K. Wakabayashi, T. Tanaka: Suppression of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by a cyclooxygenase-1 selective inhibitor. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2008年10月29日、Nagoya)
- ② S. Sugie, Y. Yasui, M. Kim, T. Oyama, H. Kohno, M. Masuda, S. Shimada, T. Tanaka: Chemopreventive effects of Zinc on AOM-induced colon carcinogenesis in rats. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2008年10月29日、Nagoya)
- ③ T. Oyama, Y. Yamada, A. Hirata, Y. Yasui, M. Kim, H. Kohno, A. Hara, S. Sugie, T. Tanaka, H. Mori: The epigenetic transcriptional repression of Wnt antagonist genes in the development of colon tumors of *Apc<sup>Min/+</sup>* mouse. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2008年10月29日、Nagoya)
- ④ 甲野裕之、田中卓二: *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスを用いた炎症関連大腸発がんモデルとその化学予防、第14回日本家族性腫瘍学会 (2008年6月20日、東京)
- ⑤ 安井由美子、甲野裕之、杉江茂幸、田中卓二: プロボリスの水抽出物およびエタノール抽出物による AOM 誘発ラット大腸 aberrant crypt foci の抑制効果、第18回日本消化器癌発生学会総会 (2007年11月9日、札幌)
- ⑥ H. Kohno, M. Takahashi, Y. Yasui, R. Suzuki, K. Yamaguchi, K. Wakabayashi, T. Tanaka: A specific iNOS inhibitor, ONO-1714 attenuates inflammation-related large bowel carcinogenesis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2007年10月3日、Yokohama)
- ⑦ T. Tanaka, R. Suzuki, S. Miyamoto, Y. Yasui, H. Kohno, S. Sugie: Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2007年10月3日、Yokohama)
- ⑧ S. Sugie, S. Miyamoto, Y. Yasui, H. Kohno, R. Suzuki, H. Nakagama, T. Tanaka: Modifying effects of NNK on AOM/DSS colon carcinogenesis model in A/J mice. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2007年10月3日、Yokohama)
- ⑨ H. Kohno, R. Suzuki, Y. Yasui, S. Miyamoto, S. Sugie, T. Tanaka:

Ursodeoxycholic acid inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. The 8th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (2007年8月10日、Gifu)

- ⑩ 甲野裕之、高橋真美、安井由美子、鈴木里加子、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二 : AOM/DSS 誘発マウス大腸発がんに対する iNOS 阻害剤 ONO-1714 による修飾効果、第 14 回日本がん予防学会 (2007年7月12日、東京)
- ⑪ 安井由美子、鈴木里加子、甲野裕之、田中卓二、細川雅史、宮下和夫: 9t, 11t-CLA の AOM 誘発ラット大腸 aberrant crypt foci に及ぼす効果、第 14 回日本がん予防学会 (2007年7月12日、東京)
- ⑫ H. Kohno, R. Suzuki, Y. Yasui, S. Miyamoto, T. Tanaka: Ursodeoxycholic acid inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice: A comparative study regarding the effect of sulphasalazine. 98th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2007年4月18日、Los Angeles)
- ⑬ Y. Yasui, R. Suzuki, H. Kohno, S. Miyamoto, T. Tanaka : A lipophilic statin, pitavastatin inhibits inflammation associated mouse colon carcinogenesis. 98th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2007年4月18日、Los Angeles)
- ⑭ S. Miyamoto, K. Hayashi, R. Suzuki, H. Kohno, S. Sugie, S. Takashima, A. Murakami, H. Ohigashi, T. Tanaka : Citrus auraptene suppresses azoxymethane-induced colonic preneoplasia in db/db mice, 98th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2007年4月18日、Los Angeles)

[図書] (計 2件)

- ① T. Tanaka, S. Miyamoto, Y. Yasui, H. Kohno, S. Sugie : Obesity: A risk for hepatocellular carcinoma. *In*: T. Tanaka (ed.), Cancer: Disease progression and chemoprevention. 57-74, Research Signpost (2007)
- ② M. Hosokawa, Y. Yasui, S. Suzuki, H. Kohno, T. Tanaka : Chemopreventive effects of conjugated linolenic acids on colon cancer. *In*: T. Tanaka (ed.), Cancer: Disease Progression and Chemoprevention. 239-254, Research Signpost (2007)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

甲野 裕之 (KOHNO HIROYUKI)  
金沢医科大学・看護学部・教授  
研究者番号 : 20221236

### (2) 研究分担者

杉江 茂幸 (SUGIE SHIGEYUKI)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 60187648

田中 卓二 (TANAKA TAKUJI)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 40126743