

平成22年 5月 7日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791106

研究課題名 (和文) 前立腺炎によるマウス前立腺癌モデルの確立

研究課題名 (英文) Establishment of inflammation induced mouse prostate cancer

研究代表者

中井 康友 (Nakai Yasutomo)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20432479

研究成果の概要 (和文)：マウスに対し経尿道的に LPS を投与することによる前立腺炎の発生は認められなかったため、ラットを用い実験を行った。食肉に含まれる発癌物質である PhIP を投与したラットに、経尿道的 LPS 投与の有無での発癌の差異を検討した。LPS 投与の有無では前癌病変と考えられる萎縮性病変や異型上皮の発生率に差はなかったが、上皮内癌の発生率は LPS を投与した群で有意に高かった。この結果から、炎症の既往は前立腺発癌のイニシエーションよりもプロモーションに關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Because no mouse had prostatitis after transurethral injection of lipopolysaccharide (LPS), we changed the animal from mouse to rat. Rats were treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) intragastrically. We analyzed the difference of the incidence rate of neoplastic lesions between rats treated with transurethral instillation of LPS and control rats. The incidence rate of atrophic lesions and dysplastic lesions, those are thought to be related to prostate carcinogenesis, was similar between LPS treated group and control group, however, the incidence rate of carcinoma in situ was statistically higher in LPS treated group. From these results, it is suggested that prostatitis might related to promotion rather than initiation of prostatic carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
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：外科系臨床医学、泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、炎症、食餌、前立腺炎、PhIP

(2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine)

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はかつて欧米人に多くアジア系の人種には少ないといわれていたが、本邦では近年、罹患率、死亡率ともに急激に上昇しており、2008年の統計では、死亡率は10万人あたり16.3人にまでなっており、男性の癌による死亡原因の第6位になっている。(国立がん研究センターがん対策情報センターより)。このように近年増加している前立腺癌の発生メカニズムに関する研究は、前立腺癌の予防につながる知見となり、医療経済を考えた上でも重要な研究課題である。

前立腺癌の発生には生活習慣などの環境因子が強く関与していることがハワイへ移住した日本人の発癌率の変化を調べた研究で明らかになっている(Kolonel et al. Nat Rev Cancer 2004)。環境因子の中でも食生活と炎症が前立腺発癌に関与している可能性が考えられている。

様々な癌腫で発癌に炎症が関与していることが知られているが、前立腺の発癌においても近年、炎症が関与している可能性が疫学的な研究や、前立腺癌の手術標本を用いた分子生物学的な研究から考えられるようになってきている(DeMarzo et al. Nat Rev Cancer 2006)。特に炎症を伴った萎縮性病変である proliferative inflammatory atrophy (PIA) と呼ばれる病変が発癌過程の中の重要な病変であると考えられている(DeMarzo et al. Am J Pathol 1999)。しかしながら、炎症が前立腺発癌に対してどのような役割を持つのか検討した動物実験はほとんどされていない。

我々は肉を高温で調理することで発生する heterocyclic amine である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) に着目した。この物質をラットに投与すると1年後には約7割の確立で前立腺癌が発生する(Shirai et al. Cancer Res 1997)。我々は、かつて PhIP によるラット前立腺癌では、ヒト前立腺癌のように炎症が関与している可能性があることを報告し、このモデルはヒト前立腺癌研究に適したモデルであることを報告している(Nakai et al. Cancer Res 2006)。また、PhIP による発癌に先立ち、ヒト前立腺癌のように萎縮性病変が広範囲に見られることからヒト前立腺癌発生の研究に適したモデルであるとされている(Borowsky et al. Neoplasia 2006)。以上のような背景で、PhIP を用いた本研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

- PhIP による発癌が炎症による促進されるかを検討すること。
- PhIP をマウスに投与しても前立腺癌は発

生しないといわれているが、前立腺に炎症を引き起こすことで PhIP によるマウス前立腺癌モデルが確立できるか検討すると。

## 3. 研究の方法

始めにマウス前立腺炎モデルを確立するため、リポポリサッカライド(LPS)を経尿道的に投与してマウス前立腺炎モデルの確立を試みた。しかしながら、この手技では前立腺炎が発生しなかった。そこで、動物をマウスからラットに変更してLPSを経尿的に投与した。すると、約80%の高率に前立腺炎を引き起こすことが可能であることが明らかになった。マウスで動物実験を進めることは様々な研究に応用ができるため、意義深いと思われるものの、マウスに固執して実験を続けることは動物愛護の観点から適切ではないと判断し、動物をラットに変更して検討を行った。

始めにLPSによって引き起こされる前立腺炎について詳細に病理学的な検討を行った。

次に、食肉由来の発癌物質である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) による前立腺発癌が炎症により促進されるかどうか検討した。

具体的な実験方法は以下の通りである。

### 1) LPS による前立腺炎モデルの検討

10 週齢のオス F344 ラットに対して LPS(1mg/dl)600  $\mu$ l を経尿的に投与し、LPS 投与後 3 日目、2 週目、3 週目、8 週目にラットを屠殺して前立腺を採取し、経時的に組織学的な変化を検討した。

### 2) PhIP による前立腺発癌は炎症により促進されるか

7 週齢のオス F344 ラットに対して PhIP (50mg/kg) を週 2 回経口的に強制投与した。PhIP 投与開始後 10 週目に LPS(1mg/ml)600  $\mu$ l を経尿的に投与することで前立腺炎を引き起こした。PhIP および LPS のコントロールとして生食を投与する群を設定し、以下のようにラットのグループ分けを行った。

A 群 (PhIP+LPS; n=28)

B 群 (PhIP+生食; n=22)

C 群 (生食+LPS; n=11)

D 群 (生食+生食; n=5)

実験開始から 1 年後にラットを安楽死させ、組織学的な変化を検討した。検討項目はヒト前立腺癌発癌に関与していると考えられている萎縮性病変をはじめ、前癌病変、癌病変とした。

## 4. 研究成果

### (1) LPS による前立腺炎モデルの検討

LPSの経尿道的投与により約80%の発生率で前立腺腹葉に前立腺炎を引き起こすことができるが、炎症を引き起こされた後の経時的な変化は以下の通りである。

LPS投与後3日目に腺管内および間質に炎症細胞が浸潤し、サイトケラチン(CK)8陽性の前立腺上皮が炎症による酸化ストレスでアポトーシスをおこして脱落していくことが抗cleaved caspase 3抗体による免疫組織染色で明らかになった。

LPSを投与して2週間たつと、前立腺の腺管構造は破壊され、細胞成分の豊富な病変に置き換わる。この病変には前立腺幹細胞マーカーであるCD133陽性細胞が散見される。

3週間後には炎症が起こった病変にcribriformを呈する腺管が見られるようになる。この腺管は、前立腺幹細胞に近い細胞分画があると考えられている基底細胞のマーカーであるp63が陽性の細胞が多く見られ、また、細胞増殖マーカーであるki67陽性細胞も多く見られることから、炎症の後に再生していつている前立腺腺管であると考えられた。

8週経過すると、炎症が起こった病変に炎症を伴った萎縮した上皮で覆われた腺管が認められた。この病変は炎症による酸化ストレスの中で再生してきた上皮であり、ヒト前立腺に見られるPIAに相当する病変であると考えられた。

## (2) PhIPによる前立腺発癌は炎症により促進されるか

### ① PhIPを投与したラットはLPSによる急性前立腺炎で高率に死亡した。

LPSを投与した後、A群(PhIP+LPS群)では15匹、B群(PhIP+生食群)では5匹のラットが急性前立腺炎で死亡した。C群(生食+LPS群)およびD群(生食+生食群)では急性前立腺炎で死亡したラットはなかった。B群における急性前立腺炎は、尿道の最近が生食とともに前立腺に入り引き起こされたものと考えられた。

A群とC群およびB群とD群の間で前立腺炎による死亡率が有意にPhIP投与群で高かった( $P < 0.001$ )。PhIPを投与した群ではLPSを投与した場合も、生食を投与した場合も前立腺炎による死亡率が高いことが示され、PhIPは前立腺炎を促進する作用があることが考えられた。

次に前立腺炎で死亡しなかったラット(A群13匹、B群17匹、C群11匹、D群5匹)で1年後に発癌に関与すると考えられる各

種病変について検討した。

### ② PhIP投与により前立腺の広範囲に萎縮性病変が発生した。炎症は萎縮性病変の発生に関与しなかった。

萎縮性病変の範囲は前立腺のプレパラートをスキャンし、imageJにて前立腺全体に占める萎縮晴洋編の割合を検討した。萎縮性病変の割合は以下の通りであった。

A群(PhIP+LPS群)	48.3±10.4%
B群(PhIP+生食群)	44.2±10.2%
C群(生食+LPS群)	24.7±8.3%
D群(生食+生食群)	19.6±15.6%

A群とC群、B群とD群の間に有意差を認め( $p < 0.01$ )、PhIPにより萎縮性病変が発生していることが示された。A群とB群、C群とD群の間には有意差を認めず、炎症は萎縮性病変の発生に関与していないものと考えられた。

この結果から、萎縮性病変を発癌過程の初期の段階であるとするならば、PhIPは発癌のinitiationに関与しているが、炎症はinitiationに関与していないことが考えられた。

### ③ PhIPを投与したラットでは萎縮性病変に連続して異型腺管が発生した。炎症は異型腺管の発生に関与しなかった。

萎縮性病変の中から、前立腺関内空に向かってcribriformを呈しながら増殖していく異型腺管を認めた。一匹当たりの異型腺管の数は以下の通りであった。

A群(PhIP+LPS群)	2.15個(28個/13匹)
B群(PhIP+生食群)	1.65個(28個/17匹)
C群(生食+LPS群)	0.18個(2個/11匹)
D群(生食+生食群)	0個(0個/5匹)

A群とC群、B群とD群の間に異型腺管の発生率に有意差を認め、PhIPにより異型腺管が発生していることが示された。しかし、A群とB群、C群とD群の間には有意差を認めず、炎症は異型腺管の発生に関与していないものと考えられた。

### ④ 炎症を引き起こしたラットの異型腺管の細胞増殖は亢進していた。

上記③で検討した異型腺管の細胞増殖をki67染色で検討した。Ki67 indexは以下の

通りであった。

A 群 (PhIP+LPS 群) 13.85±3.81%  
B 群 (PhIP+生食群) 8.13 ± 2.34%

A 群と B 群の間に有意差を認めた (p=0.011)。この結果より LPS による炎症の既往があると、ひとたび発生した異型腺管の増殖が亢進することが考えられた。

⑤ LPS による炎症の既往があると上皮内癌の発生率が高かった。

今回検討したラットには明らかな浸潤癌は見られなかった。しかし b-3) で検討した異型腺管のうち、下記の診断基準を満たすものを上皮内癌 (cis) と診断すると、一匹当たりの cis 病変の数は A 群で 0.85 個 (11 個/13 匹)、B 群で 0.24 個 (4 個/17 匹) と A 群において有意に cis の発生率が高かった。

上皮内癌の定義

- ・ N/C 日が大きく不整で明瞭な核小体を有する細胞から構成される。
- ・ 基底細胞を欠如する。
- ・ 腺管構造を破壊し、隣接する腺管へ浸潤する。
- ・ 間質への微小な浸潤を認める。

以上の結果をまとめると、PhIP により萎縮性病変、異型腺管、cis が発生するが、炎症は前癌病変と考えられる萎縮性病変や異型腺管の発生には関与せず、PhIP により発生した前癌病変から cis への promotion に関与していることが考えられた。今回の炎症モデルである LPS の経尿道的投与による前立腺炎は腺管が炎症による酸化ストレスで破壊された後に再生しており、このような傷害と再生を経た腺管は mutation が蓄積しやすく、このことが promotion に関与している可能性が考えられた。今回の結果から、炎症の既往が前癌病変から癌への promotion に関与していることが示唆され、抗炎症剤などによる chemoprevention が前癌病変から発癌への promotion を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

1. 第 98 回日本泌尿器科学会総会

‘前立腺炎は PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine) による前立腺発癌を促進する’

中井康友、向井雅俊、鈴木崇、土屋睦美、房前裕順、波多野浩士、河嶋厚成、中山雅志、高山仁志、野々村祝夫、奥山明彦  
2010 年 4 月 26 日～29 日  
盛岡市民文化センター

2. 第 97 回日本泌尿器科学会総会

‘新規ラット前立腺炎モデルの確立 -発癌研究への応用に向けて-’  
中井康友、河嶋厚成、向井雅俊、永原啓、芝政宏、中山雅志、高山仁志、西村和郎、野々村祝夫、奥山明彦  
2009 年 4 月 16 日～18 日  
岡山コンベンションセンター

3. 第 69 回日本癌学会総会 (予定)

‘Prostatitis promotes prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP)’  
Yasutomo Nakai, Masatoshi Mukai, Takashi Suzuki, Mutsumi Tsuchiya, Yasuyuki Fusamae, Akira Nagahara, Masashi Nakayama, Hitoshi Takayama, Norio Nonomura

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 康友 (Nakai Yasutomo)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 20432479

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: