

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592061

研究課題名（和文） 幹細胞をターゲットとする前立腺発がんにおける炎症の関与

研究課題名（英文） Analysis of the relation between prostate carcinogenesis targeted stem cells and inflammation

研究代表者

杉江 茂幸 (SUGIE SHIGEYUKI)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：60187648

研究成果の概要（和文）：

実験的に炎症の前立腺発がんへの関わりを明らかにすると共に、幹細胞との関わりを解明するために、前立腺発がんにおける幹細胞の役割を検討する目的で、PhIP 誘発前立腺発がんモデルをもとに行った。その結果、前立腺腫瘍は、非去勢群にのみ認め、去勢した群には発生しなかった。これらの結果から、去勢によって癌の発生母地が消失した可能性が考えられる。去勢により幹細胞のみになるという仮説は、否定され、幹細胞から前立腺癌になるという仮説は否定された。炎症が発生した葉と PIN の発生した葉は異なったことから、炎症による腫瘍への修飾作用については、不明である。さらなる検討が必要と考える。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the relation between prostate carcinogenesis and stem cell or inflammation is analysed in animal experimental carcinogenesis model targeted stem cells associated with prostatitis. Any prostate neoplasma were not found in any castrated rats, although prostate neoplasms were observed only in non-castration groups. From these results, the origin of cancer was assumed to be lost by castration. TP had a suppressive effect in PhIP prostate carcinogenesis. The hypothesis which Prostate cancer originated from stem cell. The lobes with inflammation were different the lobes with PIN. The modifying effect of inflammation for prostate carcinogenesis is not clear, yet. Further consideration will be necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、近年、高齢化社会となった我が国で急速に増加を認め、国民の多くの注目を浴びる疾患となってきている。その原因は、不明の点が多く、特に、本邦の前立腺癌増加の原因は不明である。しかし、病理学的知見から前立腺癌の発生に前立腺炎が関与すると言う報告があり、疫学的にも肯定する報告もある。実験動物を用いた研究では、いまだ炎症の前立腺発がんへの関与は、明らかとなっていない。また、近年、癌の幹細胞起源説が提唱され、報告されている。

2. 研究の目的

近年、癌の幹細胞起源説が提唱され、報告されている。今回、幹細胞をターゲットとする発がんモデルを応用した前立腺炎実験モデルを用い、前立腺癌誘発癌原物質による発がんへの修飾作用を検討し、実験的に炎症の前立腺発がんへの関わりを明らかにすると共に、幹細胞との関わりを解明する。

3. 研究の方法

(実験 1) 6 週齢、8 週齢オス F344 ラットに去勢を付し、1 週間後からテストステロンを持続投与開始し、テストステロン投与開始 3 日後、2 週間後の委縮、再生状況を比較検討した。6 週齢、8 週齢雄 F344 ラット各 9 匹を去勢し、6 匹に 15 mg Testosterone タブレットを皮下移植した。非処置群と共に 3 日後、2 週間後に犠牲死し、剖検、前立腺組織をホルマリン固定後、病理組織標本を作製し、合わせて細胞増殖マーカー PCNA、アポトーシスマーカー Caspase 3、幹細胞マーカー CD133 を免疫染色し、比較検討した。

(実験 2) 雄 F344 ラットに去勢、発がん剤 (PhIP) 投与し、400 ppm PhIP を混餌投与し、4 週間普通食のインターバルを置いて、2 週間 400 ppm PhIP を混餌投与を更に 2 回繰り返した。PhIP 最終投与終了 1 週間後に 50 mg Testosterone propionate (TP) タブレットを皮下移植した。各群 4 匹とし、第 1 群：無処置群、第 2 群：去勢群。第 3 群：去勢+PhIP 投与群、第 4 群：PhIP 単独投与群、第 5 群：去勢+PhIP+テストステロン投与群とした。テストステロン投与 10 週 (40 週齢) において、ラットを犠牲死し、前立腺の状態を検討した。

(実験 3) 去勢による前立腺組織の萎縮、腺上皮の脱落、幹細胞の残存後、前立腺発がん物質 PhIP を投与、その後テストステロン持続投与し、発がん状況を検討した。5 週齢 F344 ラットを 6 群に分け、1-3 群に 5 週齢に去勢し、1, 2, 4, 5 群に 6 週齢より 2 週間、400 ppm PhIP を混餌投与し、4 週間普通食

のインターバルを置いて、2 週間 400 ppm PhIP を混餌投与を更に 2 回繰り返した。1, 4 群には、PhIP 最終投与終了 1 週間後に 50 mg Testosterone propionate (TP) タブレットを皮下移植した。実験開始後 73 週後、実験終了、全匹犠牲死し、剖検した。

4. 研究成果

結果

(実験 1) 去勢 3 日後、著明に委縮が認められ、去勢後テストステロン投与群では、概ね委縮は抑制されていた。前立腺は、主に ventral lobe (腹葉)、lateral lobe (側葉)、dorsal lobe (背葉) に分かれているが、細胞増殖は、週齢と葉で異なり、非処置群の ventral lobe では、6 週齢で 90% 程度と非常に高く、8 週齢、10 週齢で 50% 前後に低下維持される傾向にあり、lateral lobe、dorsal lobe では、5 週齢から 9 週齢の間、30% 前後で維持されていた。これに対して、去勢群では、6 週齢から 10 週齢の間、ventral lobe で 10% 前後、lateral lobe、dorsal lobe で 1~数% 程度に維持されていた。去勢+テストステロン投与群では、6 週齢、8 週齢共にテストステロン投与開始 3 日後、1 週間後で ventral lobe は、70~80% 程度と著変がなかったのに対して、lateral lobe、dorsal lobe は、3 日後 30~40% 程度で 1 週間後は 90% 程度と著増していた。去勢群でアポトーシスは、去勢 3 日後で概ね終了し、Caspase 3 陽性細胞は、概ね陰性であった。

(実験 2) 腫瘍の発生は認めなかった。P63 は、全ての群の前立腺の基底細胞の核に染まり、2 層性が確認された。Prostate specific antigen (PSA) は、無処置群 (-)。去勢群、去勢+PhIP 群、PhIP 単独投与群では、ventral lobe、lateral lobe に細胞質が染まる上皮細胞を少数認めた。第 5 群で、ventral lobe、lateral lobe に細胞質が染まる上皮細胞を散見して認めた。Androgen receptor は、非去勢群 (第 1、第 4 群) では前立腺全葉、核が強陽性に染まったが、去勢群 (第 2、3 群) では、核の染色性が低下し、細胞質が薄く染まった。第 5 群では、ventral lobe、lateral lobe の核に強陽性。dorsal lobe では、(-) ないし弱陽性であった。アポトーシスマーカー Caspase 3 は、第 1~4 群では (-)。第 5 群のみ、lateral lobe に細胞質が染まる上皮細胞を散見して認める。ventral lobe に細胞質や核が染まる上皮細胞を散見して認める。神経内分泌細胞マーカー Synaptophysin、幹細胞マーカー CD44、CD133 は、第 1~4 群では僅か~少数基底細胞ないし上皮の細胞質に染まり、第 5 群では、lateral lobe を主体に腹

葉の一部にも細胞質が染まる上皮細胞を散見して認めた。これらのことから、去勢により幹細胞のみになるという仮説は、否定された。PSA、Synaptophysin、CD44、CD133 は、前立腺前癌性病変のマーカーになりうると推定された。

(実験 3) 体重は、去勢群は非去勢群に比べ低かったが、去勢群中では、TP 投与群は高かった。臓器重量も同様傾向にあり、前立腺+精嚢腺重量は、去勢を行った第 2, 3 群で著明に低く、次いで第 5, 6 群。TP 投与を行った第 1, 4 群が最も重量が高かった。前立腺炎症は、TP 投与群には、ほとんど見られ、第 5 群にも、一部に見られた。炎症は、大部分、lateral lobe に見られ、dorsal lobe に見られることも前立腺腫瘍は、顕微鏡的に PhIP+TP 群 (第 4 群)、PhIP 単独投与群 (第 5 群)、コントロール群 (第 6 群) のみに認め、他の群には認めなかった。前立腺腫瘍は、ventral lobe のみに認め、すべて粘膜内癌 (PIN) であった。第 4 群では、11 匹中 3 匹、第 5 群では、11 匹中 9 匹、第 6 群では、7 匹中 1 匹に認められた。PIN の平均個数は、第 4 群では、 0.45 ± 0.93 、第 5 群では、 2.00 ± 1.73 、第 6 群では、7 匹中 0.14 ± 0.38 であった。いずれも、第 5 群で有意の高値を認めた。PCNA labeling indeces では、いずれも葉も低値であったが、炎症部、PIN の腺管は上昇傾向を認めた。

Table 1. Body and organ weights in each group.

Group	No of rats	Body	Liver	Kidney	Prostate + Seminal vesicle
1	13	363+29*	14.3+1.5	3.05+0.28	4.51+1.02
2	12	345+19	8.9+0.5	2.01+0.18	1.18+0.23
3	7	351+13	9.1+0.6	2.00+0.08	1.10+0.33
4	11	389+26	14.2+2.3	3.08+0.40	4.67+0.68
5	11	422+34	14.6+1.7	2.98+0.31	3.80+0.89
6	7	439+22	15.1+1.7	3.25+0.37	3.93+0.29

*: Mean \pm SD.

Table 2. Incidence of PIN in each group

Group	No of rats	PIN				Seminal Vesicle neoplasm	Total
		Dorsal lobe	Lateral lobe	Ventral lobe	Total		
1	13	0	0	0	0	0	0
2	12	0	0	0	0	0	0
3	7	0	0	0	0	0	0

4	11	0	0	3	3	1	4
5	11	0	0	9**	9**	1	9*
6	7	0	0	0	0	0	0

**,: Significantly different from Group 4 by Fisher's exact probability test (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.02$).

Table 3. Multiplicity of PIN in each group

Group	Ventral lobe	Total
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	$0.45 \pm 0.93^*$	0.45 ± 0.93
5	$2.00 \pm 1.73^{**}$	$2.00 \pm 1.73^{**}$
6	0.14 ± 0.38	0.14 ± 0.38

*: Mean \pm SD.

**,: Significantly different from Group 4 by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

Table 4. PCNA Indexes (%) in each group

Group	Dorsal		Lateral		Ventral		Seminal Vesicle
	Normal	Inf. lesion	Normal	Inf. lesion	Normal	PIN	
1	$1.34 \pm 1.74^*$	—	0	2.60 ± 1.67	0	—	0.74 ± 1.95
2	0.64 ± 1.11	—	0.80 ± 1.39	—	0	—	0.15 ± 0.13
3	0.05 ± 0.05	—	0.32 ± 0.48	—	0.03 ± 0.06	—	0.15 ± 0.09
4	0.30 ± 0.22	4.30 ± 5.15	0.55 ± 0.64	3.92 ± 3.18	0.08 ± 0.10	12.67 ± 6.43	1.25 ± 1.05
5	0.83 ± 0.97	1.00	0.15 ± 0.19	1.55 ± 1.17	0	1.73 ± 0.80	2.43 ± 1.49
6	1.69 ± 2.01	—	0.80 ± 0.90	—	0.03 ± 0.05	9.76	0.43 ± 0.45

*: Mean \pm SD.

考案

去勢した群には、いずれも前立腺腫瘍は、発生しなかった。PhIP および TP を投与した群にも認めなかった。これに対して、去勢をしなかった群は、すべて、前立腺腫瘍の発生を認め、PhIP 単独投与群 (第 5 群) で有意に高値を示した。

これらの結果から、去勢によって、癌の発生母地が消失した可能性が考えられる。また、TP に抑制効果が示唆された。去勢によって、幹細胞のみになるかどうかは別として、少なくとも幹細胞から前立腺癌になるという仮説は否定されたといつてよい。

炎症が発生した葉と PIN の発生した葉は異なる

った。このことから、炎症による腫瘍への修飾作用については、なかったと言えなくもないが、不明であると考えられ、さらなる検討が必要と考える。

TPによって、腫瘍の減少したと思われる結果が得られた。これは、今までの報告と異なる。われわれは、通常実験で用いられる用量よりも高いものを用い、このタブレットが90日間有効とされるが、皮下移植後54週経過観察した。実験終了時の前立腺、精嚢腺の状態を見るに有効なホルモンの効果が持続していたものと思われる。この点で、TPの一時的過剰投与ないし変動が影響を及ぼした可能性が示唆される。

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)

[雑誌論文] (計 2件)

1. Oyama T, Yasui Y, Sugie S, Tanaka T. Preclinical assays for identifying natural cancer chemopreventive agents. Scholarly Research Exchange, vol. 2009, Article ID 475963, 2009. doi:10.3814/2009/475963.
2. Oyama T, Yasui Y, Sugie S, Koketsu M, Watanabe K, Tanaka T. Dietary tricetin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice. Cancer Prev Res., 2: 1031-1038, 2009.

[学会発表] (計 17件)

国際学会・外国学会

1. Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Miharuru Kamide, Sotoe Yamamoto, Shigeyuki Sugie, and Takuji Tanaka: A flavone, tricetin, suppresses colitis-associated mouse colon carcinogenesis. 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. DamYang Resort, South Korea, March 11-12, 2009.
2. Mihye Kim, Shingo Miyamoto, Yumiko Yasui, Takeru Oyama, Akira Murakami, Shigeyuki Sugie, and Takuji Tanaka: Dietary zerumbone inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. DamYang Resort, South Korea, March 11-12, 2009.

国内学会

1. 尾山 武、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二: Tricetinによる炎症関連大腸癌抑制とその機序の検討. 第98回日本病理学会総会、京都、5月1-3日、2009年
2. 尾山 武、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二: 炎症関連大腸癌におけるフラボノイド tricetin と高コレステロール血症の影響. 第24回発癌病理研究会 8月25-27日 七尾
3. 尾山 武、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二、渡邊邦友: Tricetinによる炎症関連大腸癌抑制とその分子機構の検討. がん予防大会 2009 愛知 (第16回日本がん予防学会、第32回日本がん疫学研究会、第10回日本がん分子疫学研究会)、6月16-17日、2009年.
4. Shigeyuki Sugie, Takeru Oyama, Yumiko Yasui, and Takuji Tanaka: Effect of BITC and PEITC on BBN-induced urinary bladder carcinogenesis in male F344 rats. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 1-3, 2009.
5. Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Shigeyuki Sugie, Kunitomo Watanabe, and Takuji Tanaka: Dietary flavonoid tricetin suppresses colitis-associated mouse colon carcinogenesis. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 1-3, 2009.
6. Takuji Tanaka, Yumiko Yasui, Takeru Oyama, and Shigeyuki Sugie: Colorectal cancer chemoprevention by beta-cyclodextrin inclusion compounds of auraptene and 4'-geranyloxyferulic acid. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 1-3, 2009.
7. 尾山 武、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二: 高コレステロール血症モデルマウスにおける大腸癌感受性. 第26回日本毒性病理学会、金沢、2月2-4日、2010年.
8. 尾山 武、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二: LDL受容体欠損マウスにおける大腸癌感受性. 第99回日本病理学会総会、東京、4月27-29日、2010年.

9. 杉江茂幸、尾山 武、田中卓二：TN-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (OH-BBN) 誘発ラット膀胱発がんモデルにおけるbenzylisothiocyanate (BITC)、Phenylethyl isothiocyanate (PEITC) の修飾効果。第99回日本病理学会総会、東京、4月27-29日、2010年。
10. 尾山 武、杉江茂幸、田中卓二：大腸発がんに対するLDL受容体ファミリー発現の影響、第17回日本がん予防学会、札幌、7月15-16日、2010年
11. Takeru Oyama, Yumiko Yasui, Shigeyuki Sugie, Kunitomo Watanabe, and Takuji Tanaka: Sencitivity of a hypercholesterolemic apolipoprotein E deficient mice model to AOM/DSS-induced colon carcinogenesis. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, Sep. 22-24, 2010.
12. Shigeyuki Sugie, Yumiko Yasui, Takeru Oyama, Takuji Tanaka and Hitoshi Nakagama : Reduced susceptibility to inflammation associated colon carcinogenesis model in ob/ob mice. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, Sep. 22-24, 2010.
13. 杉江茂幸、尾山武、田中卓二：炎症関連大腸発がんモデルにおけるサリシンの修飾作用、第100回日本病理学会、横浜、4月28-30日、2011
14. 杉江茂幸、尾山武、田中卓二：炎症関連大腸発がんモデルにおけるサリシンの修飾作用 第18回日本がん予防学会、京都、2011年6月20-21日、2011年
15. Shigeyuki Sugie, Takeru Oyama and Takuji Tanaka: Chemopreventive effect of bromelain derived from pineapple stem, in inflammation related colon carcinogenesis. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 3-5, 2011.

[図書] (計 1件)

杉江茂幸、田中卓二：症例 361, 362, 364, 365.

ダイナミック病理学 (監修：鈴木利光、山川光徳) pp1028-1034、pp1038-1043.

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉江 茂幸 (SUGIE SHIGEYUKI)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：60187648

(2) 研究分担者

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

(H21)

安井 由美子 (YASUI YUMIKO)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：90434472

(H21)

尾山 武 (OYAMA TAKERU)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：00515314

(H21→22)

