

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591159

研究課題名(和文) PPAR アゴニストによる肺腫瘍抑制メカニズムの検索

研究課題名(英文) Suppressive effects of PPARalpha agonist against pulmonary carcinogenesis in mice

研究代表者

久野 壽也 (Kuno, Toshiya)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00345779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高脂血症薬であるPPAR アゴニスト(fenofibrate)のマウス肺腫瘍抑制効果を検討した。肥満、高脂血症を自然発症するマウスに化学物質誘発肺増殖性病変を誘発した後、fenofibrateを混餌投与し、30週間後に肺の病理学的解析を行った。混餌投与は肺増殖性病変の発生率と病変数を有意に減少させた。また、血清インシュリン、IGF-1値は混餌処置により、無処置群と比較して有意に減少した。肺腺癌におけるIGF-1R, p-Akt, p-Erk1/2の発現は混餌投与により低下した。fenofibrateはIGF-1経路の抑制を介してマウス肺増殖性病変抑制に対して効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to determine whether hypolipidemic agent fenofibrate, PPAR agonist, can suppress chemically-induced proliferative lesions in the lung of obese hyperlipidemic mice. Male Tsumura Suzuki Obese Diabetic mice were subcutaneously injected with 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) to induce lung proliferative lesions, including adenocarcinomas. They were then fed a diet containing fenofibrate for 29 weeks. At week 30, the incidence and multiplicity of pulmonary proliferative lesions were significantly lower in mice treated with 4-NQO and fenofibrate compared with those in mice treated with 4-NQO alone. Fenofibrate significantly reduced the serum insulin and insulin-like growth factor (IGF)-1 levels and decreased the immunohistochemical expression of IGF-1 receptor, p-Akt, and p-Erk1/2 in lung adenocarcinomas. Our results indicate that fenofibrate can prevent the development of 4-NQO-induced proliferative lesions in the lung by modulating the insulin-IGF axis.

研究分野：実験病理

キーワード：PPARalpha agonist lung neoplasms obese hyperlipidemia hyperinsulinemia carcinogenesis

1. 研究開始当初の背景

日本国内における糖尿病の患者数は厚生労働省の発表によると推計 950 万人程度で、境界型糖尿病を含めると 2050 万人に及ぶとされ (厚生労働省、国民健康・栄養調査、平成 24 年)、増加の一途をたどっている。全世界においても同様で、少なくとも 3 億 8000 万人以上の糖尿病患者がいるとされている (2014, International diabetes federation)。糖尿病を含むメタボリックシンドロームは肝がんや膵がんといった特定の疾患と密接な関係があることが示唆されている。ところが、肺がんと代謝性疾患との関係はタバコ、大気汚染などの要因にマスクされており、これまで相関関係は明らかにされていない。我々は以前、厚生労働省がん研究助成金高橋班 課題番号 19-2「肥満・高脂血症・糖尿病モデル動物の発がん感受性と発がん機構に関する研究」において実験動物を用いて肥満、糖尿病といったメタボリックシンドロームとがんの関係性を明らかにしてきた。単純な食餌性の肥満とタバコ由来ニトロソアミン (NNK) 誘発マウス肺がんの関連性は低く、汎用性の高いマウス種を背景にした自然発症型の肥満・糖尿病マウスは肺における発がん感受性が極めて低いことが判明した。しかしながら、糖尿病治療薬のひとつである PPAR γ agonist は NNK 誘発マウス肺腫瘍の発生率を有意に低下させることはないものの、腫瘍の増大を抑制することが明らかになり、代謝障害の改善が肺腫瘍に対し何らかの修飾作用を有するものと考えられるようになってきた。Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD) mice は ddy mouse をバックグラウンドにしたマウス種であり、肥満、2 型糖尿病、高脂血症を自然発症する。ddy mouse は発がん物質である 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) に対して感受性があり、皮下投与により肺腺腫、肺腺がんを発症する。PPAR α agonist は高脂血症薬であるが、動物実験レベルにおいて糖尿病状態の改善も報告されている。PPAR α agonist のひとつである fenofibrate はすでに人に投与されている高脂血症薬であり、安全性が担保された薬剤と考えられる。ヒト肺腺がんに対する付加的な効果が期待できることから、化学物質誘発マウス肺腫瘍に対する抗腫瘍効果と作用機序を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

肥満、糖尿病、高脂血症といったメタボリックシンドロームが肺発がんを促進することを明らかにすると同時に、肺腺がんに対するメタボリックシンドロームの影響を評価できる動物モデルを確立する。また、PPAR α アゴニストである fenofibrate 摂取がメタボリックシンドロームモデル動物の肺発がんを抑制するかどうかを評価し、抑制メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 6 週齢の雄性 TSOD マウスを 5 群に分け、1-3 群に対して 10mg/kg 体重の 4-NQO 懸濁液を皮下注射し、肺増殖性病変を誘発した。注射 1 週間後より 2, 3 群に対して PPAR α アゴニストである fenofibrate を実際のヒトへの投与量を考慮し、それぞれ 0.01, 0.05% の濃度で混餌投与した (ヒト体表面積当たり 0.3 及び 1.5 倍)。4 群には 0.05% fenofibrate のみを与え、5 群は未処置群とした。実験開始 30 週後、肺を摘出し、病理組織学的解析を行った。また、抑制メカニズムを明らかにするため、血清 insulin、IGF-1、中性脂肪、遊離脂肪酸の測定、および肺病変における Ki-67, IGF-1, p-Akt, p-Erk1/2 の免疫染色を行い、増殖抑制効果や insulin および IGF-1 経路に及ぼす影響を検討した。加えて、膵臓の病理組織標本作製し、fenofibrate がラ氏島の形態に及ぼす影響を検討した。

(2) 肥満、糖尿病、高脂血症状態が肺腫瘍発生に及ぼす影響を検討するため、TSOD の対照マウスである TSN0 マウスと TSOD マウスにおける 4-NQO 誘発肺腫瘍発生率を比較した。TSOD と TSN0 マウスをそれぞれ 4-NQO 処置群と無処置群に分け、飼育 30 週後に肺を摘出し、病理組織学的な検討を行った。4-NQO 感受性に及ぼす要因を明らかにするため、血清代謝物の測定に加えて、4-NQO の活性化に関する肝臓および肺の 4-NQO NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) 発現を定量的 real time PCR 法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) ① 4-NQO 処置により TSOD マウスに肺増殖性病変 (過形成、腺腫、腺癌) が発生した。

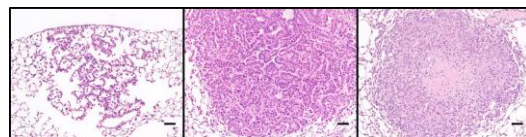


図 1 4-NQO 処置により発生した肺病変 (左) 過形成、(中) 腺腫、(右) 腺癌
Bars, 30 μ m

発生率は 33%、1 匹あたりの肺腫瘍の発生数はそれぞれ 0.42 ± 0.72 であった。0.01, 0.05% の fenofibrate 混餌投与によって肺腫瘍発生率、1 匹あたりの肺腫瘍数はそれぞれ 17 および 4%、 0.21 ± 0.51 および 0.04 ± 0.20 であり、いずれも 0.05% 群で有意に減少していた ($P < 0.05$)。

② 0.05% fenofibrate の摂取により血清中性脂肪、遊離脂肪酸値が 4-NQO 単独群に対して有意 ($P < 0.01$) に減少した。総コレステロール値と血糖値は群間に差を認めなかった。また、血清中の insulin、IGF-1 は 0.01%, 0.05% いずれの fenofibrate 処置によっても有意に

低下した ($P < 0.01$)

③4-NQO で誘発した肺増殖性病変は過形成、腺腫、腺癌のいずれも IGF-1R, p-Akt, p-Erk1/2 を高発現していた。これらの発現は fenofibrate 処置により低下した。

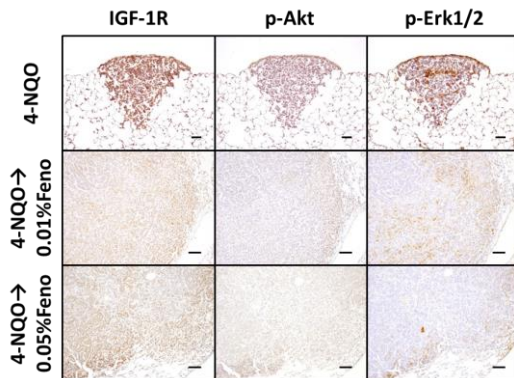


図2 肺腺腫における IGF-1R, p-Akt, p-Erk1/2 の発現
Bars, 上段 30 μ m、中下段 70 μ m

また、肺増殖性病変の Ki-67 labeling index は fenofibrate 処置により有意に低下した ($P < 0.05$)。

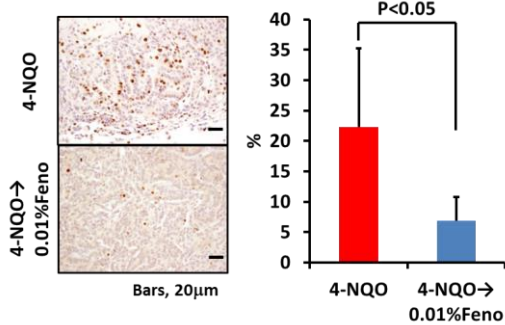


図3 Ki-67 免疫染色 (左) と陽性細胞率 (右)

④過形成、腺腫、腺癌のいずれにおいても腫瘍細胞は PPAR α を強く発現していたが、PPAR γ は過形成にのみ発現が見られ、腺腫、腺癌では明らかでなかった。

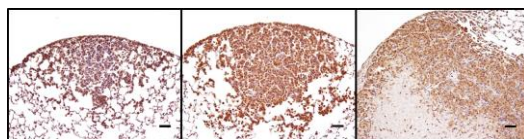


図4 PPAR α 免疫染色
(左) 過形成、(中) 腺腫、(右) 腺癌
Bars, 30 μ m

⑤4-NQO 単独処置や無処置群で膵臓ランゲルハンス島の過形成や崩壊像が見られたが、fenofibrate 処置群ではランゲルハンス島 1 個あたりの平均面積が濃度依存性に縮小し、0.05%投与群では正常の形態に近いランゲルハンス島が観察された。

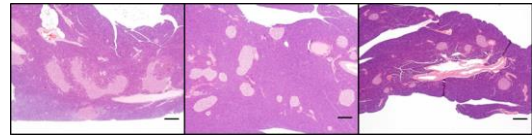


図5 膵臓ランゲルハンス島の形態的变化
(左) 4-NQO 単独、(中) 4-NQO \rightarrow 0.01% fenofibrate、(右) 4-NQO \rightarrow 0.05% fenofibrate
Bars, 200 μ m

以上の結果より、fenofibrate は肥満、高脂血症を背景とした 4-NQO 誘発マウス肺増殖性病変に対し、抑制効果を有することが明らかとなった。さらに、4-NQO 誘発肺増殖性病変は IGF-1R 経路を介して増殖シグナルを伝達していると考えられ、fenofibrate はこの経路を抑制することにより、肺腫瘍の発生を抑制すると推察された。

(2) ①4-NQO 処置により TSNO, TSOD マウスのいずれにも肺増殖性病変 (過形成、腺腫、腺癌) が発生した。発生率、1 匹あたりの肺腫瘍の発生数はそれぞれ 69%, 0.88 \pm 0.72 と 15%, 0.15 \pm 0.37 であり、いずれも TSNO マウスに有意に多かった ($P < 0.05$)。

②血清中の中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロールは TSOD マウスが TSNO マウスに比べて有意に高値であった。

③肝臓と肺の NQO-1 mRNA 発現レベルは TSOD と TSNO マウスの間に差は見られなかった。

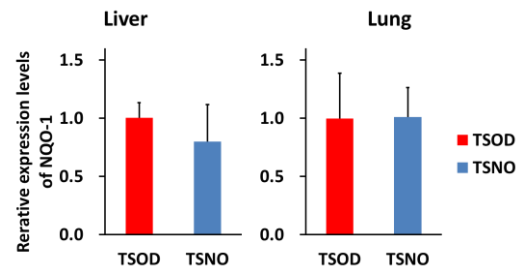


図5 肝臓、肺における NQO-1 発現レベル

肥満、糖尿病、高脂血症を自然発症するマウスはこれらを発症しない対照マウスと比較して、4-NQO の感受性は有意に低い結果となった。4-NQO の活性化に関する代謝酵素の発現量は TSOD, TSNO の肝臓、肺において差が見られなかったが、TSOD マウスにおいて増加している血中 IGF-1 あるいはインシュリンが肺増殖性病変に対して促進的に働くと考えられることから、発がんの initiation 期に感受性の差が生じているものと予想される。多数の解毒系酵素が 4-NQO の排泄に関わると推察されるが、これらの phase II enzyme の発現修飾により、感受性の差が生じていると考えられる。このような酵素の増強も、発がん予防のツールとして利用できる可能性がある。代謝異常に伴って発現が増加する解毒系

酵素の検索を今後の課題としたい。

TSOD マウスを用いた化学物質誘発肺腫瘍モデルはこれまで評価の難しかったメタボリックシンドロームと肺腫瘍との関係を明らかにできる新しい評価系と考えられる。今後、このモデルを用いて代謝を含めた多方面からの肺腫瘍抑制メカニズムが詳細に解析され、新規治療開発に役立つことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Kuno T, Hata K, Takamatsu M, Hara A, Hirose Y, Takahashi S, Imaida K, Tanaka T. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α agonist fenofibrate suppresses chemically induced lung alveolar proliferative lesions in male obese hyperlipidemic mice. *Int J Mol Sci.* 査読あり 15(5), 2014:9160-72. doi: 10.3390/ijms15059160.
- ② Hata K, Kubota M, Shimizu M, Moriwaki H, Kuno T, Tanaka T, Hara A, Hirose Y. Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 査読あり 33(3), 2012:702-7. doi: 10.1093/carcin/bgr323.

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 久野壽也、田中卓二、三輪貴生、小川博史、遠藤奨、後藤滉平、平田暁大、廣瀬善信、原明. 炎症関連 TSOD マウス大腸発癌に対する ACE 阻害薬 enalapril の修飾効果. 第 20 回日本がん予防学会. 2013 年 7 月 5-6 日. 日本薬学会長長井記念館 (東京都・渋谷)
- ② Kuno T, Tanaka T, Takamatsu M, Hatano Y, Tomita H, Hirose Y, Hirata A, Hara A. A PPAR α agonist, fenofibrate suppress 4NQO-induced pulmonary proliferative lesions in obese and hyperlipidemic mice. 71st Annual meeting of the Japanese Cancer Association. 2012 September 19-21. Royton Sapporo (Hokkaido・Sapporo)
- ③ 久野壽也、田中卓二、廣瀬善信、平田暁大、原明. Fenofibrate の 4NQO 誘発肥満、高脂血症マウス肺増殖性病変に及ぼす影響. がん予防学会. 2012 年 6 月 22-23 日. じゅうろくプラザ (岐阜県・岐阜市)

〔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

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/pathol.dir/research/index.html#prj04>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久野 壽也 (KUNO, Toshiya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00345779

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

廣瀬 善信 (HIROSE, Yoshinobu)

大阪医科大学・病理学・教授

研究者番号：20293574