

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15242

研究課題名(和文) がん予防介入研究における喫煙による増悪機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of exacerbation by smoking in intervention study for cancer prevention

研究代表者

増田 光治 (MASUDA, Mitsuharu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：10305568

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)：アスピリンによるがん予防介入試験で、喫煙者の発がん促進が報告されている。このアスピリンと喫煙による発がん増悪現象を細胞レベルで再現することを目指して、まず、アスピリンの主要体内代謝物であるサリチル酸 +/- たばこの煙濃縮物を添加した培地で、大腸がん細胞株LIM1215を長期培養した。これら細胞を用いて、足場非依存的コロニー形成能を指標として、経時的に、増悪現象の再現について検証を行った。しかし、1年以上培養を繰り返したが、培養条件の違いによる足場非依存的増殖能に明確な差は生じなかった。今回検討した培養条件下では発がん増悪現象を再現することが出来ないと結論するに至った。

研究成果の概要(英文)：Promotion of carcinogenesis by smoking and aspirin treatment has been reported in cancer prevention intervention trials. In order to reproduce the carcinogenic exacerbation phenomenon caused by aspirin and smoking at the cell level, colon cancer cell line (LIM 1215) was cultured in a medium supplemented with salicylic acid, which is the main metabolite of aspirin, and/or cigarette smoke concentrate for more than one year. Verification of the exacerbation phenomenon of cells under each condition was performed over time, using anchorage-independent growth ability as an index. Unfortunately, although we repeated passages for one year, there was no clear difference in the anchorage-independent growth potential due to the difference in culture conditions. We concluded that it is impossible to reproduce the carcinogenic exacerbation phenomenon under the culturing conditions studied this time.

研究分野：がん予防

キーワード：がん予防 大腸がん 喫煙

1. 研究開始当初の背景

(1) がん予防パラドクス

1990年代後半、β-カロテンを用いた肺がん予防介入試験において、“予防物質が喫煙者の発がんリスクを上げる”という報告は、驚きを持って受け取られた (J Natl Cancer Inst 1996; 88 1550-1559)。

また、近年、石川らが行った日本におけるアスピリンによる大腸がん予防介入試験では、同様に喫煙者ではがん予防物質 (アスピリン) 投与による発がん頻度の増悪が示された (Gut 2014; 63 1755-1759)。

喫煙者に対しては、禁煙指導こそが最も重要な予防介入であるが、実際には地域や年代を問わず、喫煙者は存在する。また、今後行われる介入試験において、禁煙者の喫煙歴による影響も懸念される。そのため、喫煙単独では無く、喫煙+がん予防物質により発がんの増悪がおこる (がん予防パラドクス、図1) 原因を解明することはがん予防研究において重要である。

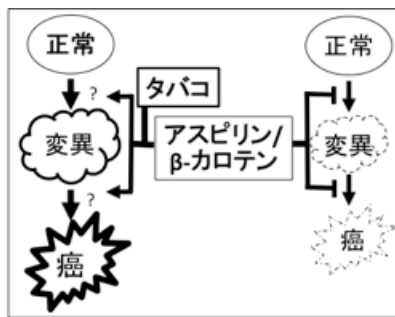


図1 がん予防パラドクス

(2) β-カロテンとアスピリン

β-カロテンは、フルーツなどに含まれる典型的なカロテノイドの一つで、栄養学的にはプロビタミン A として重要である。また、一重項酸素の消去など強力な抗酸化剤でもあり、がん予防研究において早くから着目されていた天然物の一つである。

アスピリンは、大腸がん予防にも用いる事ができると考えられている薬剤 (ドラッグリポジショニング) である。ヒトが経口投与すると、肝臓や血中で速やかに代謝されサリチル酸となる。アスピリンは COX-1/2 阻害能を有するが、サリチル酸は COX-2 を阻害し、COX-1 を阻害しないといわれている。

その他、サリチル酸は、ヒト体内では濃度的な解離はあるが、AMP 非依存性に AMPK を活性化させるメカニズムが示唆されている (Science 2012; 336 918-922)。他の AMPK の活性化能を持つメトフォルミンはがんの

発生を抑制することが示されており、アスピリンは、COX 阻害以外にも、サリチル酸による AMPK 活性化を介してがんの発症抑制に関与している可能性がある。

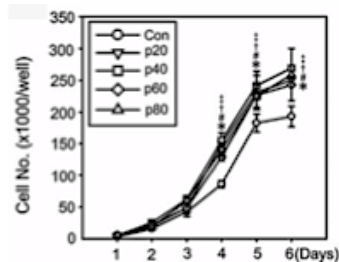
β-カロテンとアスピリン、これら 2 つの物質は、構造的にも、また現在知られている薬理作用的にもまったく異なる物質であり、介入試験での対象となる臓器やがん種も異なる。しかし、共通する特徴として、酸化ストレスを上げることが出来る。抗酸化剤である β-カロテンは条件により酸化剤として振る舞うことは良く知られており、アスピリンや非ステロイド性抗炎症剤も酸化ストレスを高めるとい報告がある (Plos One 2014 9; e89026)。

(3) 喫煙

喫煙・たばこがそれ自身直接の発がんリスク因子である事はよく知られた事実である。

喫煙で、肺はもちろん血液循環により全身が、たばこに含まれる発がん物質など種々の化学物質に曝露される。たばこに含まれる化学物質は、発がん性や変異原性が明らかなのだけでも百種類ほどが知られている。

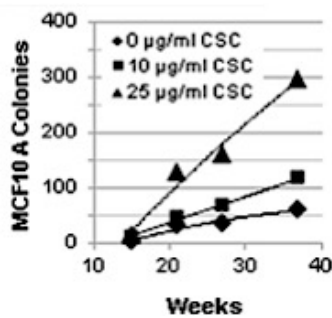
これら化学物質のうち、ニコチンの作用に関する報告について、例えば、in vitro 膀胱がん細胞株でニコチンとの長期培養で増殖速度が高まったとの報告 (Toxicological Sciences 2010; 115, 118-130) がある一方で、in vivo 肺発がん試験でニコチンは腫瘍の増殖に影響しなかったという報告がある (Cancer Rev Res 2011; 4 1743-1751)。



Toxicological Sciences 2010; 115, 118-130 より引用

また、たばこの煙濃縮物 (CSC) に曝露された乳腺上皮細胞は足場非依存的コロニー形成数が増加するという報告がある (Mol Cancer 2013; 12 90)。

これらからも分かるとおり、喫煙とがん予防物質との相互作用を考える場合、現時点ではたばこの特定の化学物質に絞り込むことの根拠は乏しい。



Mol Cancer 2013; 12 90 より引用

(4) 増悪機序

がん予防物質による酸化反応・酸化ストレスの増大は、結果としてDNAの変異やタンパク質の機能異常を引き起こし、発がんの原因となりうる。そのため、酸化ストレスの変化が、細胞の炎症反応や増殖シグナルに影響し、細胞の増殖制御異常に関係するのではないかと仮説が立てられる。

細胞内酸化還元状態をモニターし調節する仕組みとして、Nrf2-Keap1 システムと呼ばれる酸化ストレス防御機構が知られている。Nrf2-Keap1 システムは、細胞の保護に働くその機能から、正常細胞では細胞のがん化抑制に寄与するが、細胞が一旦がん化してしまうとがん細胞を細胞死から守るために機能することになる。また、Nrf2 は炎症性サイトカインの産生調節にも関与しており、増悪機序の研究においても重要であることが示唆される。

細胞増殖に関しては、研究代表者が所属する研究室では、長年、がん抑制遺伝子 RB に着目し、がん予防・治療を研究・報告している。細胞内で RB タンパクが不活性化することで、細胞周期の G1 期チェックポイントを超えて細胞腫期が進み、細胞増殖が起こる。実際に、多くのがん遺伝子の活性化変異や、がん抑制遺伝子の不活性化変異は RB タンパクの不活性化につながることで、種々低分子化合物で RB の再活性化を起こすことで細胞増殖を抑制できること、を報告してきた (日衛誌 2011; 66 3-12)。

2. 研究の目的

前述のように、がん予防パラドクス、すなわち喫煙単独では無く、喫煙+がん予防物質による発がん増悪、の原因を解明することはがん予防研究において重要である。本研究課題では、がん予防パラドクスの解明を目的とする。予防パラドクスは、生体において、細胞レベルから器官系レベルまで種々の段階でその機序に仮説を立てることが出来るが、今研究課題では細胞レベルで増悪の再現と

その機序解明を試みる。細胞レベルで再現・機序の検証が出来れば、その簡便性から、種々のがん予防物質の評価・検証が可能となるなど、メリットが大きい。

更に、予防物質が喫煙の影響を受けるかどうか事前に予測可能とし、より良い介入試験デザインに寄与し、介入試験の成功率の向上やリスク回避に貢献することを最終目的とする。

3. 研究の方法

大腸がん予防における喫煙とアスピリンの増悪をモデルケースとして、以下のような仮説 (図 2) にそって、これを検証していくこととした。

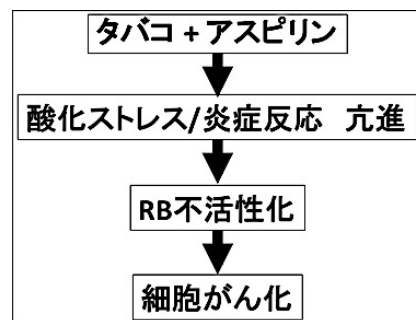


図 2 たばことアスピリンによる細胞がん化における作業仮説

仮説を検証するにあたり、まず、予防パラドクスを in vitro 細胞培養系レベルで再現することを試みる。次に、再現できた現象の原因・機序について、酸化ストレスや炎症、細胞増殖に関わる遺伝子やタンパク質を解析することで、検証する。最後に、in vivo 動物モデルを用いて、in vitro と同様の機序で同じ現象が起こるかどうかを検証する、という 3 段階の計画とした。

(1) 材料

①前述したようにたばこの個々の化学物質では相反する様な報告がある事から、たばこに含まれる特定の化学物質に絞ることはせず、喫煙の影響を検証するために、たばこの煙濃縮物 (CSC; Murty pharmaceuticals (USA)、40 mg/ mL DMSO sol.) を用いた。

②アスピリンは体内で速やかに代謝されサリチル酸になることから、今研究課題ではサリチル酸を用いた。

③検証に用いる細胞は、比較的大腸発がんの初期の遺伝子状態を反映していると考えられる大腸がん細胞株 LIM1215 (Wnt/ β -カテニン経路異常、その他主ながん遺伝子に変異が報告されていない) および、大腸正常細胞から樹立された FHC を用いる。

(2) CSC 添加濃度検討

コロニー形成抑制試験により、単独では増殖抑制効果が殆ど無い濃度を求めた。

(3) 長期継代

CSC の添加濃度を決めた後、CSC 単独、サリチル酸単独、CSC とサリチル酸併用、溶媒コントロールの4つの条件それぞれで、継代時の継代細胞数を毎回合わせるようにして長期継代を行った。各試薬や溶媒は、継代時に添加した。試薬の溶剤として用いた DMSO は終濃度 0.1% で各培養条件で統一した。

継代は、週 2 回、毎回 5×10^5 cells/10mL medium/ 10 cm dish で播種した。

サリチル酸添加濃度は、ヒト血中到達可能濃度である 40 μ M (Cmax norm からモルに概算) とした。

(4) 足場非依存的コロニー形成

4 つの条件の長期継代細胞それぞれについて、経時的に、足場非依存的コロニー形成能を比較した。

6 well plate を用いて、培地を混合した 0.8% アガーを固化化し、その上に、培地と細胞を混合した 0.3% アガーを重層し、37°C で 2-3 週間培養した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖に対する CSC の影響

コロニー形成抑制試験により、LIM1215 に対する CSC 単独の影響を確認した。

再現性を持って、終濃度 5 μ g/mL 以上の添加で用量依存的に細胞増殖を抑制したことから、長期継代での使用濃度を 1 μ g/mL とした (図 3)。

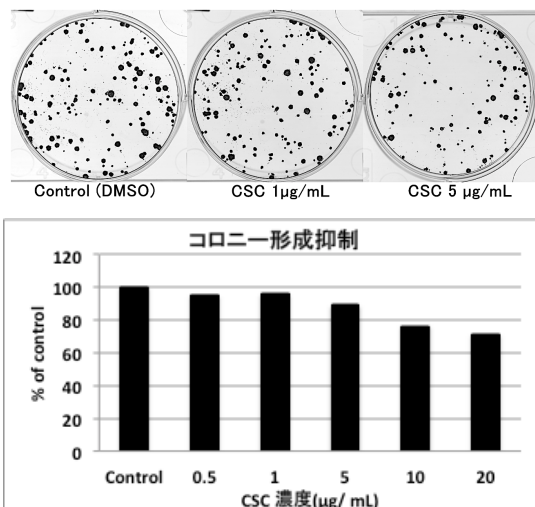


図 3 CSC によるコロニー形成への影響

(各カラムはコントロールのコロニー数の平均値を 100 として換算した相対値 (3wells の平均値))。

FHC に対しても同様に増殖抑制を確認する試験を行ったが、溶剤である DMSO が増殖に影響することが判明した (図 4)。また、増殖が遅く、形成するコロニーはサイズが揃いがかつ小さなものが多く染色性も悪いなど定量評価に不向きとの理由から使用を断念した。

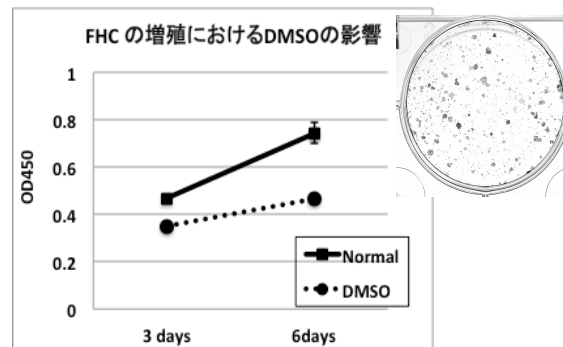


図 4 FHC の増殖における溶剤の影響と、FHC の典型的なコロニー像

(2) LIM1215 の CSC ± サリチル酸との長期継代

CSC の添加濃度を決定した後、長期継代を開始した。3 ないし 4 日おきに顕微鏡観察し、トリプシン処理で全細胞を回収後、 5×10^5 cells/10mL medium/ 10 cm dish となる様に一部の細胞を毎回新しい dish へ播種した。経時的に足場非依存的コロニー形成試験 (下記 (4)) に供しつつ、約 48 週間継代を繰り返した。長期継代の間、顕微鏡観察における形態的な変化や、増殖速度の極端な変化などは観察されなかった。

(3) 足場非依存的コロニー形成試験

未処置の LIM1215 が足場非依存的にコロニー形成するかどうか細胞密度の検討をしたところ、 1×10^4 cells/well in 6 well plate 以上の播種細胞数でコロニー形成が確認できた。写真 (図 5) に、典型的なソフトアガー中で形成されたコロニーを示す。

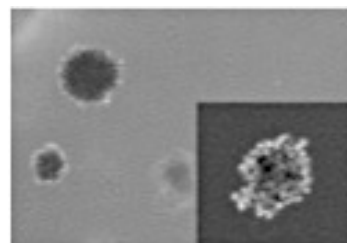


図 5 典型的なコロニー顕微鏡像 (x 100 倍、右下 x 200 倍)

この結果から、CSC +/- サリチル酸の影響を評価する実験では、播種細胞数を 5×10^3 および 1×10^4 cells/well in 6 well plate とした。

各条件で長期継代中の細胞を用いて、一定細胞数を播種し、形成されるコロニー数を比較することで細胞の増殖能の増悪度を検討した。

15 週継代した細胞で、最初の足場非依存的コロニー形成試験を行った。各条件で培養した細胞は、 1×10^4 cells/well 播種で皆コロニー形成を認めたが、サリチル酸+CSC 添加で培養した細胞は、他の 3 つの条件で培養された細胞よりも、むしろ形成するコロニー数が少なかった (図 6)。

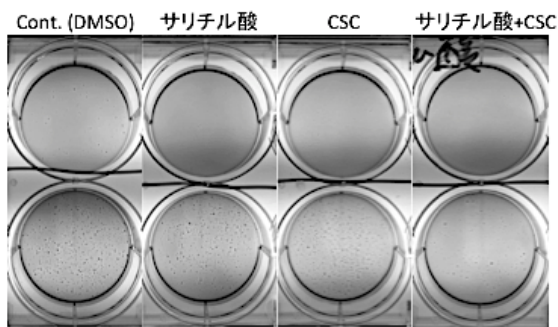


図 6 15 週継代した細胞による典型的な足場非依存的コロニー形成
上段： 5×10^3 cells/well、下段： 1×10^4 cells/well

以降、48 週間まで長期継代培養しつつ、足場非依存的コロニー形成試験 (図 7) を行った。いずれの結果も 15 週継代細胞による結果とほぼ同様であり、サリチル酸+CSC によるコロニー数の増加は認められなかった。

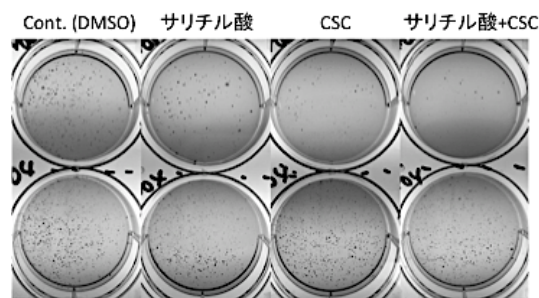


図 7 48 週継代した細胞による典型的な足場非依存的コロニー形成
上段： 5×10^3 cells/well、下段： 1×10^4 cells/well

上記のように、4 つの培養条件で長期継代した細胞に、足場非依存的コロニー形成能に明確な差は認められず、今回検討した培養条件下では疫学データが示すようなたばこサリチル酸の共存による発がん増悪現象を再現することが出来ないとの結論に至った。また、そのため、増悪現象に関係する分子や細胞内イベントの解析による機序の解析を行うことも不可能であった。

今回の研究計画においては、CSC とサリチル酸の併用における増悪現象を再現する目的で、単独で種々イベントが起こりにくいように CSC の濃度を低めに設定した。しかし、より高濃度の CSC による長期暴露が必要であった可能性は否定できない。

また、細胞単位でのイベントでも、生体には炎症に関与する免疫細胞やニッチ環境など周辺の他の細胞の影響や相互作用がある。このような環境が、たばこアスピリンによる発がん増悪にとってより重要であるのかもしれない。

今後、異なる条件で更なる可能性を検証していきたい。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 光治 (MASUDA Mitsuharu)
京都府立医科大学・医学研究科・特任助教
研究者番号：10305568

(2) 研究分担者

友杉 (堀中) 真野 (Tomosugi-Horinaka Mano)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80512037