

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005 年～2009 年  
 課題番号：17015039  
 研究課題名（和文） ACF を標的とした大腸癌の化学予防  
 研究課題名（英文） Chemoprevention of colorectal cancer by targeting ACF  
 研究代表者 新津 洋一郎（YOSHIRO NIITSU）札幌医科大学・分子標的探索講座・特任教授  
 研究者番号：10045502

研究成果の概要（和文）：本研究ではポリープの前病変の ACF をサロゲート病巣として化学予防臨床研究を行い、わずか 2 ヶ月間のスリンダック投与で、同薬剤を年余に亘って投与した欧米の報告と同等の効果を得た。また細胞増殖活性を持つ GST- $\pi$  が ACF に発現していることを見出し、その特異的阻害剤を開発した上で、大腸発癌マウスモデルでその有効性を明らかにした。つまり ACF に発現する GST- $\pi$  を標的とした新しい大腸癌化学予防法を開発した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we conducted a chemopreventive trial on colorectal cancer, using ACF, precursors of polyps, as surrogate lesions, and results clearly indicate that administration of sulindac for 2 months gave rise to almost equal effectiveness as those of previously reported trials in which sulindac was administered for years. We also performed animal experiment using mouse colon carcinogenesis model to examine the effect of inhibitor to GST- $\pi$  which was highly expressed in ACF, and found a dramatic prevention effect on colon cancer development. Thus an approach to target GST- $\pi$  in ACF is a promising modality for chemoprevention of colorectal cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	16,300,000	0	16,300,000
2006 年度	16,500,000	0	16,500,000
2007 年度	16,500,000	0	16,500,000
2008 年度	13,200,000	0	13,200,000
2009 年度	13,200,000	0	13,200,000
総計	75,700,000	0	75,700,000

研究分野：臨床腫瘍学（消化器癌、血液悪性腫瘍）

科研費の分科・細目：

キーワード：大腸癌、予防、ACF

## 1. 研究開始当初の背景

本研究ではポリープの前病変の ACF をサロゲート病巣として化学予防臨床研究を行い、わずか 2 ヶ月間のスリンダック投与で、同薬剤を年余に亘って投与した欧米の報告と同等の効果を得た。また細胞増殖活性を持つ GST- $\pi$  が ACF に発現していることを見出し、その特異的阻害剤を開発した上で、大腸発癌マウスモデルでその有効性を明らかにした。つまり ACF に発現する GST- $\pi$  を標的とした新しい大腸癌化学予防法を開発した。

## 2. 研究の目的

(1) われわれが 1998 年に報告(New Engl J Med)した大腸癌の最も初期の病変である Aberrant Crypt Foci(ACF)を代理マーカー病巣として用い、NSAID(スリンダック)、COX-II 阻害剤(エトドラック)、プラセボ投与による大腸癌化学予防のランダム化二重盲検試験を行う。

具体的には上述の薬剤を二ヶ月間という短期間投与することにより、1 年後のポリ-

プ発生抑制率を調べる。ポリープは大腸癌の約8割の前病変であることが知られているのでポリープを抑制することは8割の大腸癌を抑制することに連なることになる。従来の大腸癌化学予防の研究は薬物を年余に亘って投与することが一般的であったが、本研究で薬剤の短期間投与の有効性を示すことができれば、化学予防のコンプライアンスを改善し、副作用を軽減する上で極めて有用な知見を提供することになるはずである。

実際われわれはすでに予備的臨床研究として、スリンダック 2 ヶ月投与することで ACF が有意に減少することを確認しているので1年後のポリープ発生は有意に抑制されることが十分予想されるところである。

2)従来開発されて来た NSAID や COX II 阻害剤に比べより特異的に大腸癌発癌過程を阻害する新規予防薬を開発することを目的に ACF に高発現している大腸癌発生過程促進因子の Glutathione-S-Transferase  $\pi$  (GST- $\pi$ ) を特異的に阻害する薬剤を合成し、大腸癌発癌マウスモデルでの予防効果を調べる。また同時に GST- $\pi$  ノックアウトマウスを用いて大腸癌の発癌率を調べることにより、GST- $\pi$  阻害剤を開発することの妥当性を別角度から検証する。さらに GST- $\pi$  が ACF においてどのような分子機構で、大腸癌発生過程を促進させるのかも同時に明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 臨床研究

選択基準：①ACF を有すること、②Clean colon(ポリペクトミーした者を含む)であること、③NSAIDs の常用者でないこと、など。

#### ②ACF の観察

ACF の観察は既報に従い、拡大内視鏡を用いて行った。

#### ③薬剤の投与

上記基準を満たす者を、スリンダック群、エトドラック群、プラセボ群の3群(合計360名)に無作為割り付けを行った。各群ではスリンダック 300mg/日、エトドラック 400mg/日、プラセボ(乳糖)300mg/日をそれぞれ2ヶ月投与した。

④2ヶ月後に ACF 数の変化を評価するとともに、一年後に ACF 数及びポリープの発生を調べた。

尚、本研究は当院の倫理委員会の承認を得て行った。

#### (2) GST- $\pi$ 阻害剤の予防効果

・GST- $\pi$  KO マウスは、Henderson らの方法(Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 5275-80)により作成した。

・大腸癌発癌マウスモデル

Balb/c マウスおよび GST- $\pi$  KO マウスに大腸発癌物質である azoxymethane を腹腔内投与し、8週後に ACF を、16週後に大腸癌発

生を確認した。

#### ・GST- $\pi$ 阻害剤の合成

GST- $\pi$  の基質である Glutathione の SH 基に Methylbenzene を付加し、C 末端に Benzene を付加して、GST- $\pi$  活性を特異的に阻害する  $\gamma$ -Glutamyl -S-(benzyl) cysteinyl phenyl glycine を作成した。さらに、この2つのカルボキシル基を ethyl 基と hexadecyl 基でエステル化することにより、生体内で安定な  $\gamma$ -Glutamyl -S-(benzyl) cysteinyl phenyl glycine hexadecylester ethylester を作成した。

### 4. 研究成果

#### (1) 臨床研究

三種の薬剤についてそれぞれ120名、合計360名(予備的実験に基づいて差異が90%パワーを確保できる人数)の患者をリクルートすることを計画したが、一方でデータ解析委員により、投薬2ヶ月後の中間解析で明確な群間差が出た場合はリクルートを中止すべしということが推奨されていたため、実際には合計189名がリクルートされた。この内15名が様々な理由で脱落し最終的に174名がエントリーし、それぞれスリンダック群58名、エトドラック群58名、プラセボ群57名と振り分けられた。

これらの各群における薬剤投与2ヶ月間の ACF 数の変化を(表1)に示した。

表1 スリンダック群及びエトドラック群における治療2ヶ月後のACF数の変化

	症例数	治療前	2ヶ月後	
プラセボ群	57	7.12 ± 4.53	6.35 ± 5.69	P<0.01
スリンダック群	58	7.15 ± 3.98	3.77 ± 2.86	
エトドラック群	58	7.01 ± 3.89	5.91 ± 4.93	P=0.73

統計学的に有意差を持って ACF が減少したのはスリンダック群のみであった。さらに、一年後のポリープの発生率(表2)および数(表3)を調べたところやはりスリンダック群でのみ有意な低下を認めた。なおこの研究でみられたスリンダックによるポリープ発生の抑制率はこれまで同薬剤を年余にわたって投与したいくつかの報告でのそれとほぼ同程度であった。

表2 スリンダック群及びエトドラック群における1年後のポリープの発生率

	症例数	ポリープ発生率	相対危険率 (95%信頼区間)	
プラセボ群	57	0.81 ± 1.01	-	P=0.04
スリンダック群	57	17/57 (29.3%)	0.44 (0.20 - 0.94)	
エトドラック群	57	26/57 (45.6%)	0.87 (0.41 - 1.81)	N.S.

表3 スリンダク群及びエトドラク群における1年後のポリープの発生率

	症例数	平均ポリープ数	
プラセボ群	57	0.81 ± 1.01	P=0.02 N.S.
スリンダク群	57	0.40 ± 0.70	
エトドラク群	57	0.68 ± 0.89	

また本試験による副作用は 4%以下に認めただのみで、コンプライアンスは 90%以上と良好であった。従って本研究の結果 ACF を代理マーカーとして、スリンダクを二ヶ月投与する試みは同薬剤を年余に亘って投与する方法にかわって有用であることが確認された。

### (2) GST- $\pi$ KO マウスにおける大腸発癌実験

GST- $\pi$  が ACF 形成あるいは大腸癌発生において促進的に働いている事を実証するため GST- $\pi$  KO マウスに大腸発癌剤 azoxymethane を投与し、8 週間後に ACF の数を、16 週後に大腸癌 (ポリープ状癌) の数をカウントした。コントロールマウスとしてリッターメイトに同様な発癌剤投与を行い、比較検討した。

結果は (図 1) に示すように GST- $\pi$  KO マウスではいずれも有意な ACF 数、大腸癌ポリープ数の減少をみとめた。

このことから GST- $\pi$  は大腸癌発癌を促進させていることが確認された。

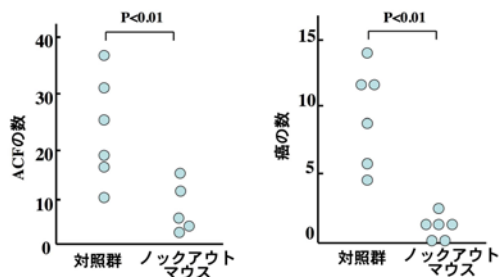


図1 GST- $\pi$ ノックアウトマウスにおけるACF及び癌の形成

### (3) 大腸発癌モデルを用いての GST- $\pi$ 阻害剤の効果

Balb/c マウスに azoxymethane を投与し、ACF が出現する時期 (3 週~5 週) にあわせて GST- $\pi$  阻害剤を投与し、ACF 形成に対する抑制効果ならびにその後に出現するはずの癌ポリープに対する抑制効果を調べた。コントロールは同マウスに発癌剤を投与し、GST- $\pi$  を投与しないまま ACF とポリープの発生を調べた。結果は、(図 2) に示すように GST- $\pi$  阻害剤で明らかに有意差を持って ACF の形成ならびにポリープの形成がみられた。

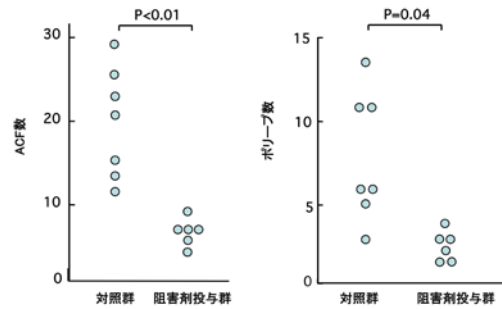


図2 GST- $\pi$ 特異的阻害剤のACF及びポリープに対する抑制効果

つまり、ACF を標的とした GST- $\pi$  阻害剤は大腸癌の化学予防に有用であることが示された。

### (4) GST- $\pi$ の細胞増殖促進作用ならびに細胞保護作用

GST- $\pi$  がどのような機序で大腸癌発生を促進させるのかを知る目的で、GST- $\pi$  KO マウスの腸管上皮および皮膚繊維芽細胞、ヒト大腸癌細胞 M7609 の GST- $\pi$  KD 細胞を用いて、細胞増殖の程度、増殖シグナルの違いをそれぞれのコントロール細胞と比較検討した。まず、GST- $\pi$  KO マウス腸上皮についてはプレパレーションが比較的困難なため、その増殖能についてのみ調べたところ、正常マウスのそれに比べて有意に低下していた。このことは繊維芽細胞についても当てはまったが、さらに興味深い知見としては GST- $\pi$  KO マウスではいわゆるオートファジーで繊維芽細胞が死滅しているのが観察された点である。

M7609 の GST- $\pi$  KD 細胞も増殖能が低下していた。しかしこの低下の原因はオートファジーではなく K-ras/cRaf/ERK シグナルを抑制しているためであることが判明した。GST- $\pi$  は C-Raf と結合し、C-Raf のプロテアゾームでの分解を阻止することにより、上述のシグナルを促進し、GST- $\pi$  KD 細胞ではその働きが失われるために増殖が低下していることが明らかとなった。以上から GST- $\pi$  は正常細胞にはオートファジーに落ち入らないように保護作用を示し、癌化が進んだ状態では増殖促進作用を示すことが明らかとなった。

### 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)

[雑誌論文] (計 27 件)

#### 1. Suppressive effect of sulindac on branch duct-intraductal papillary mucinous neoplasms.

Hayashi T, Ishiwatari H, Ihara H, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Takimoto R, Sonoda T, Takayama T, Kato J, Niitsu Y.

J Gastroenterol. 2009;44(9):964-75.査読有

2. Aberrant crypt foci as precursors of the dysplasia-carcinoma sequence in patients with ulcerative colitis.

Kukitsu T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Katsuki S, Sato Y, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Sonoda T, Sakamaki S, Niitsu Y.

Clin Cancer Res. 2008 Jan 1;14(1):48-54.査読有

3. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis.

Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y.

J Gastroenterol. 2006 Mar;41(3):185-92.査読有

4. Aberrant crypt foci: detection, gene abnormalities, and clinical usefulness.

Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Kukitsu T, Takanashi K, Ishiwatari H, Kogawa T, Abe T, Niitsu Y. Clin Gastroenterol Hepatol. 2005 Jul;3(7 Suppl 1):S42-5.査読有

[学会発表] (計2件)

1. 発表者：新津洋司郎

発表表題：Aberrant Crypt Foci:Detection, Genetic Abnormalities, and Clinical Usefulness

学会名：SIDDS

発表日：2009年11月18日

発表場所：KORIA

2.発表者：新津洋司郎

発表表題：臨床家からの Translational Research

学会名：仙台メトロポリタン講演会

発表日：2009年9月26日

発表場所：仙台

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

新津 洋司郎 (YOSHIRO NIITSU)

札幌医科大学分子標的探索講座 特任教授

研究者番号：10045502

(2)研究分担者

高山 哲治 (TETSUJI TAKAYAMA)

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス部  
教授

研究者番号：10284994