

研究種目：基盤研究（B）海外

研究期間：2006～2008

課題番号：10025637

研究課題名（和文） エジプトにおける寄生虫による膀胱癌の発症の分子疫学的研究

研究課題名（英文） Molecular epidemiological study for bladder carcinogenesis induced by parasite in Egypt

研究代表者

川西 正祐（KAWANISHI SHOSUKE）

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：10025637

研究成果の概要：寄生虫のビルハルツ住血吸虫は皮膚から体内に侵入し、虫卵は膀胱で持続的な炎症を起こす。流行地エジプトでは膀胱癌の発生率が高いが、住血吸虫が膀胱癌を起こす機構は不明であった。本研究ではエジプトの住血吸虫症患者および膀胱癌患者からの標本が多数得られ、膀胱の癌細胞と炎症細胞において、炎症に関連した DNA 損傷が蓄積していることを明らかにした。住血吸虫による膀胱癌に炎症関連の DNA 損傷が関与する機構を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ビルハルツ住血吸虫・膀胱癌・8-ニトログアニン・DNA 損傷・炎症・感染・活性窒素種・誘導生 NO 合成酵素

1. 研究開始当初の背景

寄生虫感染症は世界中で数億人の人々が罹患しており、特に発展途上国において重要な健康上の問題である。ビルハルツ住血吸虫はアフリカから中東にかけて分布する寄生虫で、感染者は53ヶ国で9000万人に及ぶと推測されている。またビルハルツ住血吸虫感染と膀胱癌発症の間には強い相関関係があることが複数の疫学調査によって示されており、ビルハルツ住血吸虫感染は国際がん研究期間（IARC）によって「ヒトに対して発がん性がある（Group1）」と評価されている。

ビルハルツ住血吸虫の最も重要な流行地の一つであるエジプト国は膀胱癌の発生率が高いことが知られており、膀胱癌は全がんの中の約30%を占め、発生率の第1位となっている。ビルハルツ住血吸虫は経皮的に生体内に侵入し、虫卵は膀胱壁内の血管に沈着してその周囲に持続的な炎症を引き起こす。

近年、IARCによって感染症は全世界の発がん要因の18%を占めると推計されている。慢性感染に伴う炎症と発がんの関係に世界的な注目が集まっているが、その分子機構は未だ明らかではない。我々はこれまでに、感染・炎症関連発がんの分子機構において、活

性窒素種・活性酸素種によるニトロ化・酸化 DNA 損傷を重要視し、特に炎症による突然変異誘発性の DNA 損傷塩基として 8-ニトログアニンに注目して研究を行ってきた。その結果、肝内胆管細胞癌を引き起こすことが知られているタイ肝吸虫を感染させたハムスターにおいて、肝内胆管上皮に 8-ニトログアニンが著明に生成されることを世界で初めて明らかにした (BBRC 2003, *Carcinogenesis* 2004, *Nitric Oxide* 2004)。

2. 研究の目的

寄生虫感染による発がんは、ウイルス・細菌感染による発がんとは異なり、病原体の感染による宿主細胞のがん抑制遺伝子の不活化などが関与する遺伝子への直接的な関与が小さいため、発がんの分子機構には炎症が主たる役割を果たしていると考えられている。したがって、エジプト国におけるビルハルツ住血吸虫による膀胱癌は、ヒト集団における感染・炎症関連発がんの分子疫学的研究には極めて適した研究対象である。

また、タイにおける寄生虫による胆管細胞癌発症における 8-ニトログアニンの関与を解析し、ビルハルツ住血吸虫による膀胱癌の場合と比較する。以上の分子疫学的研究から DNA 損傷を指標とした寄生虫感染による発がんリスク評価法を確立する。

炎症の役割に着目したこの分子疫学的研究は、寄生虫発がんの予防法を確立する基盤となる知見を得て国際保健学上の重要な問題の解決につながると同時に、炎症を惹起する広汎な因子による発がん機構を解明するためにも大きな意義を持つ。

3. 研究の方法

現地調査および患者試料採取は、エジプトのマンズーラ大学と共同で行った。

(1) エジプトにおけるフィールド調査

エジプトのビルハルツ住血吸虫感染者を対象として、感染時期、感染経路、生活習慣、自覚症状などを聴取した。喫煙歴や膀胱発がん物質の暴露についてもフィールド調査を行った。

(2) 患者試料の採取

インフォームドコンセントの得られた膀胱炎、膀胱癌の患者より組織を採取した。

(3) 病理組織学的解析

膀胱炎および膀胱癌の患者より得た組織の詳細な病理組織学的解析を行った。

(4) 特異性の高い抗体の作成
抗原を注射したウサギより抗 8-ニトログアニンポリクローナル抗体を独自に作製した。

(5) 患者組織中の DNA 損傷の局在の検討
膀胱炎、膀胱癌の患者より得た組織中の 8-ニトログアニンの局在を免疫組織学的に解析した。また市販の抗体を用いて 8-oxodG の局在を解析した。

(6) DNA 損傷と患者予後との関連の解析
膀胱癌患者の癌のステージ、生存期間と患者から得た膀胱組織中の 8-ニトログアニンおよび 8-oxodG 生成量との相関を解析した。また、DNA 損傷に関わる分子の発現や活性化と、癌の進行や生存期間との相関を解析し、予後規定因子としての 8-ニトログアニンの有効性を検討した。

(7) 寄生虫による発がん機構の比較

ビルハルツ住血吸虫による発がんの分子機構を総合的に解析した。またエジプトにおける住血吸虫感染による膀胱癌と、タイにおける肝吸虫感染による胆管細胞癌について、発がん機構と 8-ニトログアニンの関与を比較解析した。

4. 研究成果

(1) エジプトにおけるフィールド調査

貝のセルカリアは、ビルハルツ住血吸虫の中間宿主である。エジプト・ルクソール市では、セルカリア陽性率がほとんどゼロであるにもかかわらず、ヒトのビルハルツ住血吸虫感染率は 1.7% である。この感染状況は、ナイル川と地域住民の生活様式に寄ることが分かった。すなわち、感染源であるナイル川の水をそのまま生活用水として用いること、ナイル川に浸かること、が感染経路となっている (図 1, 図 2)。アスワンダム建設以降、ビルハルツ住血吸虫は減少しているが、依然としてエジプトの膀胱癌患者は減少していない現状を改善するためには、健康教育を行う必要があると思われる。



↑ 図 1. ナイル川風景。素足で川に入り舟から物資を運んでいる労働者。



←図2.
ナイル川風景。
手洗い、洗濯、農
作物の洗浄などに
川の水を日常的に
使用している。

(2) 患者組織標本の免疫組織学的解析

本研究では、移行上皮癌患者45例、扁平上皮癌患者19例、ビルハルツ住血吸虫感染による膀胱炎患者17例の組織サンプルを収集した。またコントロールとして不慮の事故などによる正常組織サンプルを6例収集した。

① 8-ニトログアニンの検出

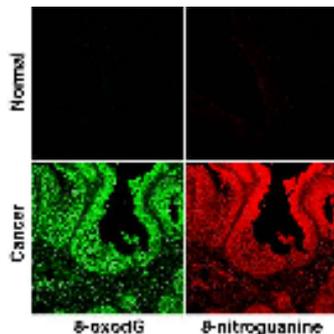


図3. 膀胱組織の免疫染色

組織サンプルの免疫組織染色を行った結果、がん細胞と炎症細胞において、明瞭な8-ニトログアニンの生成と8-oxodGの生成を認めた(図3)。誘導性NO合成酵素(iNOS)およびその転写因子であるNF- κ BとHIF-1 α の発現も同様に認められた。

以上の結果から、炎症反応によるNF- κ Bおよび組織低酸素によるHIF-1 α の両者の活性化により誘導されたiNOSを介して8-ニトログアニンが生成され、発がんに関与すると考えられる。

タイとの共同研究では、胆管癌を起こすタイ肝吸虫の感染者や癌患者で尿中の酸化的DNA損傷塩基8-oxodGの量が有意に増加し、抗寄生虫薬投与により減少した(*Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2008)。タイ肝吸虫感染動物では、抗寄生虫薬の短期投与により酸化・ニトロ化ストレスが増強し副作用に関与する可能性を示した(*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008)。今後はこのような成果を基盤とした研究をエジプトのビルハルツ住血吸虫において展開する予定である。

② 感染関連発がんにおける幹細胞の重要性

寄生虫による発がんにおいては、慢性炎症が重要な役割を果たすと考えられる。炎症条件下では活性酸素・窒素種が生成され、8-ニトログアニンなどの変異誘発性DNA損傷塩基を生成して発がんを起こすと考えられる。また最近では癌幹細胞の重要性が提唱されていることから、8-ニトログアニンと幹細胞マーカーOct3/4の発現を検討した。免疫組織染色を行った結果、癌細胞と炎症細胞で明瞭な8-ニトログアニン生成を認めた。さらに予備実験的データでは、Oct3/4の発現が8-ニトログアニンの局在と一致する細胞が観察された。以上より、炎症によって幹細胞においても8-ニトログアニンが生成され、発がんに関与すると考えられる。8-ニトログアニンは感染・炎症関連発がんのリスクを評価する有用なバイオマーカーとして期待される。

またタイ肝吸虫感染による発がんの場合も、幹細胞マーカーGlypican3, CD133, OV6などと8-ニトログアニンの局在とが一致する細胞が、患部組織で観察された。寄生虫感染による発がんにおいて、癌幹細胞説が支持されることが分かった。この知見は、感染関連発がんの予防と治療に重要な示唆を与えると期待される。

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12件)

1. Pinlaor S, Prakobwong S, Hiraku Y, Kaewsamut B, Dechakhamphu S, Boonmars T, Sithithaworn P, Pinlaor P, Ma N, Yongvanit P, Kawanishi S. Oxidative and nitrate stress in *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters: an indirect effect after praziquantel treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(4):564-73. 査読あり
2. Thanan R, Murata M, Pinlaor S, Sithithaworn P, Khuntikeo N, Tangkanakul W, Hiraku Y, Oikawa S, Yongvanit P, Kawanishi S. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in patients with parasite infection and effect of antiparasitic drug in relation to cholangiocarcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(3):518-24. 査読あり
3. Fujita N, Sugimoto R, Ma N, Tanaka H, Iwasa M, Kobayashi Y, Kawanishi S, Watanabe S, Kaito M, Takei Y. Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic

- hepatitis B and C. *J Viral Hepat.* 2008;15(7):498-507. 査読あり
4. Ma N, Kawanishi M, Hiraku Y, Murata M, Huang GW, Huang Y, Luo DZ, Mo WG, Fukui Y, Kawanishi S. Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGFR expression. *Int J Cancer.* 2008;122(11):2517-25. 査読あり
 5. Tanaka H, Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, Horiike S, Kobayashi Y, Iwasa M, Ma N, Kawanishi S, Watanabe S, Kaito M, Takei Y. Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Br J Cancer.* 2008;98(3):580-6. 査読あり
 6. Hoki Y, Murata M, Hiraku Y, Ma N, Matsumine A, Uchida A, Kawanishi S. 8-Nitroguanine as a potential biomarker for progression of malignant fibrous histiocytoma, a model of inflammation-related cancer. *Oncol Rep.* 2007;18(5):1165-9. 査読あり
 7. Hiraku Y, Tabata T, Ma N, Murata M, Ding X, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Sci.* 2007;98(7):964-72. 査読あり
 8. Fujita N, Horiike S, Sugimoto R, Tanaka H, Iwasa M, Kobayashi Y, Hasegawa K, Ma N, Kawanishi S, Adachi Y, Kaito M. Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(3):353-62. 査読あり
 9. Tazawa H, Tatemichi M, Sawa T, Gilibert I, Ma N, Hiraku Y, Donehower LA, Ohgaki H, Kawanishi S, Ohshima H. Oxidative and nitrate stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerates sarcoma development in Trp53[±] mice. *Carcinogenesis.* 2007;28(1):191-8. 査読あり
 10. Kawanishi S, Hiraku Y. Oxidative and nitrate DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):1047-58. 査読あり
 11. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrate DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem.* 2006;387(4):365-72. 査読あり
 12. Pinlaor S, Hiraku Y, Yongvanit P, Tada-Oikawa S, Ma N, Pinlaor P, Sithithaworn P, Sripan B, Murata M, Oikawa S, Kawanishi S. iNOS-dependent DNA damage via NF-kappaB expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. *Int J Cancer.* 2006;119(5):1067-72. 査読あり
- [学会発表] (計 24 件)
1. 平工雄介: EB ウイルス感染による上咽頭癌患者におけるニトロ化 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008. 10.
 2. S. Kawanishi: The role of oxidative nitrate in inflammation-related carcinogenesis. The 5th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, 2008. 8.
 3. M. Murata: Nitrate and oxidative DNA damage via chronic inflammation by liver fluke infection; in relation to cholangiocarcinoma development. The 5th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, 2008. 8.
 4. Y. Hiraku, : Formation of 8-nitroguanine, a nitrate DNA lesion, in patients infected with oncogenic viruses, HPV and EBV. The 5th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, 2008. 8.
 5. 村田真理子: タイ肝吸虫感染者および胆管癌患者における酸化ストレスマーカー 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine の有用性の検討. 第 78 回日本衛生学会総会、2008 年 3 月 28-31 日、熊本市
 6. 平工雄介: シンポジウム「分子予防・環

- 境医学への新たな挑戦」感染・炎症関連発がんにおけるニトロ化 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの役割、第 78 回日本衛生学会総会、2008 年 3 月 29-31 日、熊本市
7. 平工雄介: シンポジウム「分子予防・環境医学への新たな挑戦」感染・炎症関連発がんにおけるニトロ化 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの役割、第 78 回日本衛生学会総会、熊本市、2008. 3.
 8. 村田真理子: タイ肝吸虫感染者および胆管癌患者における酸化ストレスマーカー 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine の有用性の検討、第 78 回日本衛生学会総会、熊本市、2008. 3.
 9. 平工雄介: Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in the lung of mice exposed to asbestos (アスベスト曝露マウス肺におけるニトロ化 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成)、第 1 回アジア環境変異原学会・日本環境変異原学会第 36 回大会、2007 年 11 月 29-30 日、北九州
 10. 平工雄介: アスベスト気管内投与マウスの肺組織における DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成、日本産業衛生学会東海地方会、2007 年 11 月 17 日、名古屋
 11. 平工雄介: アスベスト気管内投与マウスの肺組織におけるニトロ化 DNA 損傷、第 7 回分子予防環境医学研究会、2007 年 10 月 26-27 日、北九州
 12. Mariko Murata: Manganese enhances oxidative damage to cellular and isolated DNA induced by a coffee polyphenol, chlorogenic acid. European Meeting 2007 of the Society for Free Radical Research, 2007 年 10 月 10-13 日, Portugal.
 13. 村田真理子: プロテオーム解析によるタイ肝吸虫関連胆管癌における cytokeratin 19 の検出、第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3-5 日 横浜
 14. 平工雄介: Nitrative DNA damage in the lung of asbestos-exposed mice (アスベスト曝露マウス肺におけるニトロ化 DNA 損傷)、第 66 回日本癌学会総会、2007 年 10 月 3-5 日、横浜
 15. 平工雄介: LPS によるニトロ化 DNA 損傷の分子機構: 感染・炎症関連発がんとの関連、第 7 回日本 NO 学会学術集会、2007 年 5 月 17-18 日、大津
 16. 竹内士紘: NO と O_2^- による 8-nitroguanine および 8-oxodG 生成の定量と塩基配列特異性の解析、第 7 回日本 NO 学会学術集会、2007 年 5 月 17-18 日、大津市
 17. 平工雄介: アスベスト曝露マウス肺における DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成、第 80 回日本産業衛生学会、2007 年 4 月 25-28 日、大阪
 18. 平工雄介: ヒトパピローマウイルス感染による子宮頸部異形成における 8-ニトログアニン生成および発がんにおける役割、第 77 回日本衛生学会総会、2007 年 3 月 25-28 日、大阪市
 19. 平工雄介: ヒトパピローマウイルス感染による子宮頸部異形成におけるニトロ化 DNA 損傷、第 6 回分子予防環境医学研究会、2006 年 12 月 1-2 日、京都市
 20. 平工雄介: ヒトパピローマウイルス感染による子宮頸部異形成における変異誘発性 DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成、日本環境変異原学会第 35 回大会、2006 年 11 月 20-21 日、堺市
 21. 平工雄介: 口腔発がんにおける iNOS 依存性 DNA 損傷の役割、第 65 回日本癌学会総会、2006 年 9 月 28-30 日、横浜市
 22. Yusuke Hiraku: 8-Nitroguanine as a biomarker for inflammation-related carcinogenesis, The 36th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society, July 2-6, 2006, Prague, Czech
 23. 平工雄介: シンポジウム「NO による発癌と感染の制御メカニズム」感染・炎症関連発がんにおける iNOS 依存性 DNA 損傷の役割、2006 年 5 月 25-26 日、第 6 回日本 NO 学会学術集会、東京都
 24. 平工雄介: ヒトパピローマウイルス感染によるニトロ化 DNA 損傷の子宮頸癌における役割、第 28 回日本フリーラジカル学会学術集会、2006 年 5 月 13-14 日、津市
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 平工雄介、川西正祐、化学同人、活性酸素・窒素種と DNA 損傷、2007、p. 89-97.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
川西 正祐 (KAWANISHI SHOSUKE)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授
研究者番号: 10025637
 - (2) 研究分担者
村田 真理子 (MURATA MARIKO)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10171141
及川 伸二 (OIKAWA SHINJI)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 10277006

平工 雄介 (HIRAKU YUSUKE)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30324510

馬 寧 (MA NEI)
鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授
研究者番号：30263015

(3) 連携研究者

なし

(4) 海外研究協力者

EL-Dosoky Ibrahim
マンスーラ大学・医学部・教授