

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3月31日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700935

研究課題名（和文）齧歯類モデルを用いたヘリコバクター・ピロリ除菌後胃癌の化学予防法の検討

研究課題名（英文）Investigation of gastric cancer chemoprevention after *Helicobacter pylori* eradication using rodent models

研究代表者

豊田 武士（TOYODA TAKESHI）

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官

研究者番号：50443453

研究成果の概要（和文）：ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）の除菌は胃癌予防に一定の効果を示すが完全な抑制には至らず、除菌後胃癌の予防法開発が求められている。本研究は齧歯類モデルを用いて、除菌後胃癌に対するアスピリンの化学予防効果検証を目的として行った。ピロリ菌感染モデルとしては新規となる、MON/Jms 系統のスナネズミにピロリ菌が感染し、強い慢性胃炎が惹起されることが確認された。同系統を用いて、ピロリ菌感染、発癌物質投与による1年間の胃発癌実験を開始し、36週の時点で除菌およびアスピリンの混餌投与を実施した。今後、52週経過後に解剖し、アスピリンの予防効果の有無について検討を加える予定である。

研究成果の概要（英文）：Although eradication therapy of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) has been shown to be effective for the prevention of stomach cancer, the prevention method of gastric carcinogenesis after eradication remains to be developed. In this study, we investigated the inhibitory effect of aspirin on gastric cancer after eradication using *H. pylori*-infected Mongolian gerbil model. We confirmed that MON/Jms strain is susceptible to *H. pylori* and develops severe chronic gastritis. As the long-term experiment, the MON/Jms gerbils were intra-gastrically infected with *H. pylori*, treated with chemical carcinogen, eradication at 36th week, and fed diet containing aspirin. Further examinations are planned to examine the chemopreventive effects of aspirin on the incidence of gastric tumor after eradication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	0	3,000,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、がん疫学・予防

キーワード：化学予防、ヘリコバクター・ピロリ

1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本で最も発生頻度の高い癌の一

つで、国内における癌死の原因の上位を占めている。多くの疫学的知見と実験病理学的研

究により、その発癌過程にはヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）による慢性胃炎が重要な役割を持つことが明らかになっている。

ピロリ菌関連疾患への対応として、プロトンポンプ阻害薬と抗生物質2剤（アモキシシリン、クラリスロマイシンなど）を用いた3剤併用療法による除菌治療が行われている。除菌は胃癌の予防効果も期待されるが、除菌後における胃癌の発生も臨床的にしばしば経験され、その対応が問題となっている。通常の胃癌の発生はピロリ菌感染に伴う慢性胃炎の程度に密接に関連していると考えられることから、除菌治療を含めたこれまでの胃癌化学予防の多くは炎症反応の抑制に主眼が置かれてきた。しかし、除菌後における胃癌の進展には、ピロリ菌の存在、またそれによって引き起こされる炎症は直接的に関与しない。このため、除菌後胃癌の予防には、既に存在する前癌病変または微小癌が、臨床的に問題となる癌に進展する過程をいかに抑制するかが重要となってくる。

除菌後に胃癌の発生が抑制されるか、実際の予防効果を検討した疫学報告は非常に少ない。日本と同じく、胃癌の多発国である中国で実施された報告（Wong et al., *JAMA*, 2004）では、7年半の追跡期間中、除菌群とプラセボ群の間で胃癌の発生頻度に有意差はみられなかった。しかし、萎縮性胃炎などの前癌病変を伴わないグループに限れば有意な抑制が認められ、病変がある程度進行した症例に対しては除菌による胃癌予防効果が低い可能性が示唆された。

一方で、2008年には本邦から、胃癌内視鏡切除後の患者を対象とした試験が報告されている（Fukase et al., *Lancet*, 2008）。この調査では3年の経過観察中、二次癌の発生が除菌によって有意に抑制され、前癌病変を有する高リスク群においても除菌治療は一定の予防効果をもつことが示された。ただし、除菌群においても異所性胃癌の発生は一定の割合で認められており、除菌のみでの完全な抑制が難しいことも同時に示唆されている。以上のような疫学的背景から、除菌後胃癌（特に早期胃癌切除後、あるいは高度の萎縮性胃炎を示す高リスク群）に対して効果を発揮し得る、新たな化学予防法の開発が求められている。

除菌後にはピロリ菌感染による炎症が消失するため、除菌後胃癌の予防に対し、炎症抑制を主眼とした化学予防法を継続する意義は低下する。前癌病変あるいは微小な癌組織が炎症という背景を失った後、除菌後胃癌として臨床的に顕在化するまでの期間は通常より延長されるものと考えられる。このため、除菌後胃癌の化学予防には炎症抑制ではなく、癌の成長・進展に直接影響し得る要因を標的とする必要がある。

シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の過剰発現は、胃癌および大腸癌の成長に重要な役割を果たすことが明らかにされている。ピロリ菌感染スナネズミモデルにおいても、エトドラク・セレコキシブなどのCOX-2阻害剤が胃癌の予防効果を示すことが報告されている（Futagami et al., *Digestion*, 2006; Magari et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2005）。また、COX阻害剤は炎症抑制作用のみならず、既に発生した初期段階の腫瘍をも退縮させる効果を有することが知られている（Chiu et al., *Cancer Res*, 1997）。さらに、これらの薬剤に加え、非特異的COX阻害剤であるアスピリンの長期服用もまた、胃癌の予防に効果があることが近年の疫学調査で明らかにされている（Cuzick et al., *Lancet Oncol*, 2009）。我々は、ピロリ菌除菌後に残された微小な癌組織を退行させ、除菌後胃癌の発生を予防する目的で、COX阻害剤の応用を検討する必要があると考え、本研究計画を企図した。

2. 研究の目的

本研究では、ピロリ菌感染スナネズミ胃癌モデルを用いて、既存の微小癌組織を退縮させる効果を持ち、近年の疫学調査で胃癌予防効果を示すことが報告されている、アスピリンによる除菌後胃癌の化学予防効果について検討する。

3. 研究の方法

本研究で使用予定であった、ピロリ菌感染胃癌モデルとして実績のあるスナネズミ系統（MGS/Sea系、九動）が生産工場での感染事故により購入不能となったため、他系統（MON/Jms系、日本エスエルシー）を用いたピロリ菌感染の確認実験を実施することとした。

5週齢、雄のMON/Jms系SPFスナネズミ24匹にピロリ菌あるいは溶媒を胃内接種した。実験開始後8週目に12匹を解剖し、ピロリ菌感染の有無および慢性胃炎の程度を病理組織学的に検索した。残る12匹にはアモキシシリン・クラリスロマイシン・ランソプラゾールの3剤併用による除菌治療を施し、除菌が可能かどうか検討した。

上記確認試験の実施後、1年間の長期実験として、5週齢・雄のMON/Jms系スナネズミ150匹にピロリ菌を感染させ、感染後2週目よりメチルニトロソウレア（MNU）を10ppmの濃度で2週間飲水投与した。対照群として無処置群およびピロリ菌感染・MNU非投与群を用意した。実験開始から36週後（MNU投与終了から14週後）、約80匹に除菌治療を実施した。除菌から1週間後、除菌群のうち半数（約40匹）に対して400ppmアスピリンの混餌投与を開始した。52週経過時に解剖

し、除菌ならびにアスピリン投与による胃癌発癌率の変化を病理組織学および分子生物学的に検索する。

4. 研究成果

これまでの胃癌化学予防に関する研究は、ピロリ菌誘発胃炎の抑制を主眼に行われてきた。しかし、除菌治療の有効性が確立されつつある近年、炎症を背景としない、除菌後に発生する胃癌に対する化学予防の重要性が高まっている。胃癌化学予防の動物モデルを用いた解析に際して、除菌後胃癌を対象を絞った報告は過去に例を見ない。

本研究で使用するスナネズミ胃癌モデル、ならびに同モデルにおける除菌プロトコルは、申請者が以前に所属した愛知県がんセンター研究所のグループにより開発された (Shimizu et al., *Cancer Res*, 2000; Tatematsu et al., *Jpn J Cancer Res*, 1998)。スナネズミにはピロリ菌感染が安定的に成立し、ヒトに極めて類似した病態が再現される。また、除菌治療によってスナネズミ胃癌の発生頻度が有意に低下することも明らかにされており、ヒト除菌後胃癌予防への基盤確立を目指す本研究に適した動物モデルと考えられる。

本研究において実施した MON/Jms 系スナネズミを用いたピロリ菌感染確認実験では、MGS/Sea 系よりも感受性が低いとの情報を事前に他の研究者から私信として得ていたため、感染時期を通常よりも1週間早い5週齢に設定した。その結果、従来通り高いピロリ菌感染率(約94%)と、高度の慢性胃炎を惹起できることが確認された。感染後2ヶ月の時点で、ピロリ菌を接種したスナネズミの腺胃粘膜は高度に肥厚し、単核細胞および好中球を含む炎症性細胞の浸潤が認められた。ピロリ菌感染の成立は胃粘膜から採取した RNA を用いたリアルタイム RT-PCR 法、およびヘリコバクター選択培地による培養法によっても確認された。また、3剤併用療法による除菌治療は MON/Jms 系統においても有効であることも明らかとなった。以上の結果から、これまでピロリ菌感染モデルとしては用いられていなかった MON/Jms 系のスナネズミも、同モデルに利用できることが示された。

上記の結果を受けて、本研究では MON/Jms 系を用いて長期発癌試験を実施することとした。ピロリ菌感染、MNU 投与および除菌が終了し、現在はアスピリンを混餌投与している段階である。今後、実験開始後 52 週が経過した時点でこれらの動物を解剖し、アスピリンによる除菌後胃癌抑制効果の有無について検討を行う予定である。今後得られる結果によって、除菌後胃癌に対するアスピリンの予防効果の程度が明らかとなり、ヒト除菌後胃癌予防法確立に向けての基礎データが

得られるものと考える。

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5件)

1. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y. TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*, 209: 479-494, 2012 (査読有り)
DOI: 10.1084/jem.20111653
2. Toyoda T, Tsukamoto T, Cho YM, Onami S, Takasu S, Shi L, Saito A, Matsuo S, Tatematsu M, Nishikawa A, Ogawa K. Undifferentiated sarcoma of the salivary gland in a Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Toxicol Pathol*, 24: 173-177, 2011 (査読有り)
DOI: 10.1293/tox.24.173
3. Kadonosono T, Kuchimaru T, Yamada S, Takahashi Y, Murakami A, Tani T, Watanabe H, Tanaka T, Hirota K, Inoue M, Tsukamoto T, Toyoda T, Urano K, Machida K, Eto T, Ogura T, Tsutsumi H, Ito M, Hiraoka M, Kondoh G, Kizaka-Kondoh S. Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based *in vivo* bioluminescence imaging. *PLoS ONE*, 6: e26640, 2011 (査読有り)
DOI: 10.1371/journal.pone.0026640
4. Hur K, Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Tatematsu M, Yang HK, Ushijima T. Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction, and involvement of specific types of inflammation. *Carcinogenesis*, 32: 35-41, 2011 (査読有り)
DOI: 10.1093/carcin/bgq219
5. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res*, 70: 1430-1440,

2010 (査読有り)

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2755

[学会発表] (計 27 件)

1. Toyoda T, Tsukamoto T, Takasu S, Shi L, Cho YM, Onami S, Tatematsu M, Nishikawa A, Ogawa K: Chemoprevention of gastric cancer in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils using an NF- κ B inhibitor (caffeic acid phenethyl ester). The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Francisco, 2012. 3. 13
2. 豊田武士, 塚本徹哉, 高須伸二, 時亮, 齋藤亜弓, 齋藤典子, 立松正衛, 曹永晩, 西川秋佳, 小川久美子. *Helicobacter pylori* 感染マウスモデルを用いた胃癌関連遺伝子解析. 第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 東京, 2012 年 2 月 3 日
3. 大波冴子, 曹永晩, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子. ラットを用いた glycidol と 3-MCPD 及びこれらのエステル化合物の 28 日間反復投与試験. 第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 東京, 2012 年 2 月 3 日
4. 曹永晩, 豊田武士, 大波冴子, 高見成昭, 今井俊夫, 西川秋佳, 小川久美子. 塩酸セミカルバジドの混餌投与による B6C3F₁ マウスの慢性毒性/発がん性併合試験. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 5 日
5. 藤井万紀子, 豊田武士, 中西速夫, 谷田部恭, 佐藤鮎子, 村上秀樹, 近藤豊, 近藤英作, 樋田豊明, 辻村亨, 長田啓隆, 関戸好孝. 悪性中皮腫細胞の増殖における TGF- β シグナルと hippo pathway の役割. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 5 日
6. 豊田武士, 塚本徹哉, 高須伸二, 時亮, 齋藤亜弓, 立松正衛, 大波冴子, 曹永晩, 西川秋佳, 小川久美子. *Helicobacter pylori* 感染スナネズミ慢性胃炎に対するカプサイシンおよびピペリンの抑制効果. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 4 日
7. 曹雪源, 姜晶, 前田浩, 豊田武士, 立松正衛, 塚本徹哉. Canolol による 5-FU 耐性胃癌細胞株 SGC-7901/R への抑制効果. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 4 日
8. Cho YM, Takami S, Toyoda T, Onami S, Ogawa K, Nishikawa A. Lack of modification of tumorigenesis in the central nervous system by early-life exposure to manganese. European Congress of Toxicologic Pathology, Parris, 2011. 8. 28
9. 藤井万紀子, 豊田武士, 中西速夫, 矢田部恭, 伊藤成美, 近藤栄作, 松平康枝, 辻村亨, 関戸好孝. 悪性中皮腫細胞の増殖における CTGF (connective tissue growth factor) の役割について. 日本組織培養学会第 84 回大会, 東京, 2011 年 5 月 28 日
10. 豊田武士, 塚本徹哉, 高須伸二, 時亮, 齋藤典子, 齋藤亜弓, 立松正衛, Cho Young-Man, 小川久美子, 西川秋佳. 香辛料主成分によるヘリコバクター・ピロリ感染スナネズミ慢性胃炎に対する抑制効果. 第 27 回日本毒性病理学会, 大阪, 2011 年 1 月 28 日
11. 大波冴子, 曹永晩, 豊田武士, 小川久美子, 西川秋佳. *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) 誘発ラット中枢神経腫瘍の免疫組織化学的検討. 第 27 回日本毒性病理学会, 大阪, 2011 年 1 月 27 日
12. 豊田武士, 山本昌美, 高須伸二, 時亮, 齋藤亜弓, 立松正衛, 小川久美子, 西川秋佳, 塚本徹哉. ヘリコバクター・ピロリ感染および高食塩食投与マウス胃腫瘍モデルによる遺伝子発現解析. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 23 日
13. 丹羽透, 豊田武士, 塚本徹哉, 森明子, 許根, 立松正衛, 牛島俊和. *Helicobacter pylori* 感染関連胃がんの DNA 脱メチル化剤による予防. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 23 日
14. 山田貴宣, 魏氏, 豊田武士, 金川明裕, 仲谷慎也, 陳慶義, 鰐淵英機. ラファノブラシカにおけるピロリ菌感染胃炎の修飾作用. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 22 日
15. 曹雪源, 姜晶, 蔡洪科, 連国棟, 豊田武士, 立松正衛, 塚本徹哉. 18beta-Glycyrrhetic acid は MIP-1 α と NF- κ B の抑制によりスナネズミ *H. pylori* 感染胃炎を軽減する. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 22 日
16. 永晩, 高見成昭, 豊田武士, 小川久美子, 西川秋佳. マンガンの幼若期暴露による中枢神経発がん修飾作用. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 22 日

17. 藤井万紀子、豊田武士、長田啓隆、矢田部恭、松平康枝、村上秀樹、近藤豊、樋田豊明、関戸好孝. 悪性中皮細胞の増殖における TGF- β シグナルおよび YAP の協調的役割. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日
18. 塚本徹哉、時亮、齋藤亜弓、豊田武士、齋藤典子、高須伸二、水谷泰嘉、立松正衛. Angiotensin II 受容体拮抗薬 Losartan によるヒト大腸癌細胞株増殖抑制効果. がん予防学術大会 2010 札幌、札幌、2010 年 7 月 16 日
19. 菅永晩、今井俊夫、高見成昭、豊田武士、小川久美子、西川秋佳. F344 ラットにおけるセイヨウワサビ飲水投与による膀胱癌がん修飾作用の検討. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄（宜野湾市）、2010 年 6 月 17 日
20. 塚本徹哉、時亮、齋藤亜弓、豊田武士、田中卓二、立松正衛. COX-2 阻害剤 Etodolac による DSS 誘発 Min マウス大腸腫瘍抑制効果. 第 99 回日本病理学会総会、東京、2010 年 4 月 27 日

[図書] (計 2 件)

1. 塚本徹哉、溝下勤、豊田武士、立松正衛 *Helicobacter pylori* 研究におけるスナネズミモデルの有用性—とくに胃癌を念頭に置いて—. *Helicobacter Research*, 先端医学社, 14: 447-453, 2010.
2. 塚本徹哉、豊田武士、溝下勤、立松正衛 動物感染モデルを用いたピロリ菌発癌機構解析. *細胞工学*, 秀潤社, 29: 549-553, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 武士 (TOYODA TAKESHI)
国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任
研究官
研究者番号 : 50443453

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし