

炎症関連大腸がんのアスピリンによる化学予防

— モデルマウスにおける研究 —

大西 志保

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

研究紹介

炎症関連大腸がんのアスピリンによる化学予防

— モデルマウスにおける研究 —

大西 志保

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

キーワード： がん化学予防, 炎症, DNA 損傷, 8-ニトログアニン, 抗炎症薬

要 旨

我が国では現在、大腸がんは肺がんの次に多く、予防対策が切望されている。炎症は重要な発がん要因の1つであり、抗炎症薬のアスピリンは、疫学研究で種々のがんを抑制する報告があることから、がん予防効果が期待される。一方、炎症関連発がんでは、発がん部位に炎症関連 DNA 損傷の 8-ニトログアニンが蓄積する。そこで、8-ニトログアニンを指標とし、炎症誘発性大腸発がんマウスを用いてアスピリンによる影響を解析した。その結果、アスピリンが炎症誘発性大腸発がんを抑制すること、8-ニトログアニンも減少することが、明らかとなった。発がん抑制機序として、シクロオキシゲナーゼ COX2 と誘導型一酸化窒素合成酵素 iNOS の抑制により、炎症から生じる活性種が減少し、炎症関連 DNA 損傷が減少して、発がん抑制に至ったと考えられる。

1. はじめに

がんは身近な病気であり、2人に1人はがんになるといわれている。わが国における死亡率を死因別にみると、悪性新生物（いわゆるがん）は1980年頃から死因の第1位を占めており、2020年には総死亡の27.6%にのぼる^[1]。わが国のがん死亡数の2021年推計値は37万人を超えており、なお増加傾向にある。図1に予測がん死亡数を部位別で示した。男性では、肺（24%）、大腸（13%）、胃（12%）の順、女性では、大腸（16%）、肺（14%）、膵臓（12%）の順となっている。がん罹患数は、年間100万例を超えており、部位別では、男性で前立腺（17%）、胃（16%）、大腸（15%）の順、女性で乳房（22%）、大腸（16%）、肺（10%）の順となっている。大腸がんは、肺がんに次いで男女ともに死亡数も罹患数も多いことから、予防対策が重要な課題である。非ステロイド性消炎鎮痛薬（NSAID）のアスピリンは古くから汎用され、疫学研究で種々のがんを抑制する報告があり、がん予防効果が期待されている^[2,3]。筆者らは、動物モデルとして炎症誘発性大腸がんマウスを用いて、アスピリンによるがん抑制を解析したので、ここに紹介する^[4]。

2. 発がんにおける炎症関連 DNA 損傷

2-1.8- ニトログアニン

炎症組織では、リンパ球や活性化マクロファージなどから、活性酸素種（ROS）や活性窒素種（RNS）が産生され、感染因子と異物の排除を促進している。しかし慢性炎症では、ROSやRNSが長期にわたって周囲の正常細胞にも作用し、DNAやタンパク質などの様々な生体分子を損傷し、細胞死や発がんリスク上昇に繋がる。炎症条件下では、酸化的DNA損傷8-オキシグアニンやニトロ化DNA損傷8-ニトログアニンが生成することが知られている。8-オキシグアニンや8-ニトログアニンは、DNA複製の際に相補対の誤りが起きて変異を誘発することから、発がんに関係すると考えられる。

2-2. 炎症関連発がん

炎症は重要な発がん要因の1つであり、寄生虫感染や自己免疫性炎症疾患の潰瘍性大腸炎などによる慢性炎症が、発がんリスクを高めることが知られている^[5,6]。炎

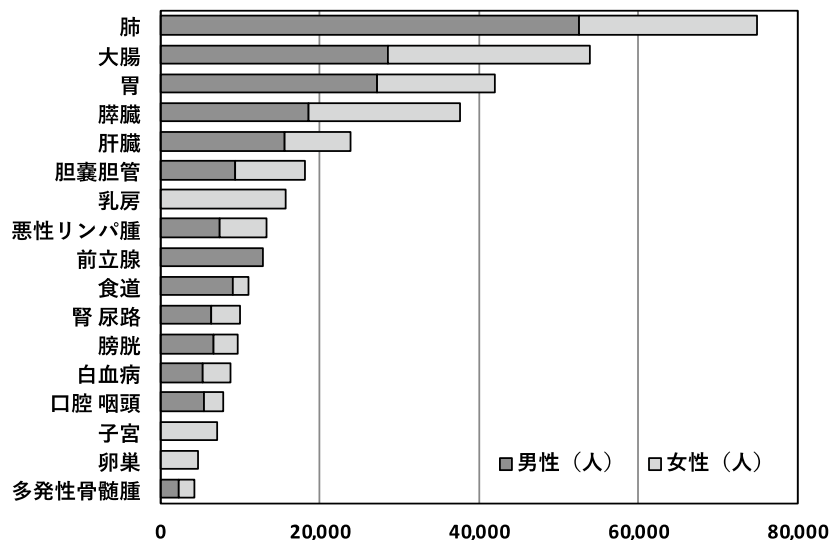


図1. 部位別予測がん死亡数
2021年における部位別予測がん死亡数を、主要部位のみ表示した。

症要因は、ウイルス、細菌、寄生虫等の持続感染、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性疾患、アスベストなど微粒子による物理的炎症など多様であるが、いずれも炎症部位でがんを発症する。これまでに、炎症関連発がんにおいて、発がん部位で 8- ニトログアニンの蓄積が観察された例を、表 1 にまとめた^[7]。さらに、8- ニトログアニンの蓄積と患者予後との相関も、報告されている^[7]。8- ニトログアニンは炎症条件下で特異的に産生されることから炎症関連発がんリスクを直接反映すると考えられる。

3. 方法

上記を踏まえ、アスピリンによるがん抑制効果を調べるために、マウスを用いた次の実験を行った。免疫システムが正常であるマウス (ICR) を、(1) 無処置、(2) アスピリン投与、(3) 発がん + 水投与、(4) 発がん + アスピリン投与、の 4 群に分けた。(3) と (4) の発がん群には、変異原物質アゾキシメタン (AOM) 10mg/kg 体重の腹腔投与と炎症誘発剤デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を含む飲水 7 日間投与により、大腸がんを誘発

させた。AOM/DSS 処理の直後は大腸がんは発生していないが、AOM/DSS 処理の後は何もしなくても数週間をかけて大腸に良性腫瘍が発生し、発がんに至る。本研究での大腸発がんと解剖のタイミングは、予備実験により判断している。また、AOM の発がんイニシエーション作用と DSS のプロモーター作用による炎症関連大腸がんモデルマウスは、確立された実験系である^[8]。アスピリンは、アセチルサリチル酸水溶液として 100mg/kg 体重を経口ゾンデにより週 3 回投与した。12 週間継続投与した後、解剖して大腸組織と血液サンプルを得た。大腸組織標本はヘマトキシリン・エオジン染色および免疫染色により、組織化学的解析を行った。血液サンプルは血漿成分に分け、ELISA キットおよび ROS/RNS 測定キットを用いて解析した。

動物実験は、「鈴鹿医療科学大学動物実験倫理委員会」の承認を得たうえで (承認番号第 71 号)、「鈴鹿医療科学大学動物実験指針」を遵守し、動物愛護と動物福祉の観点から十分に配慮して行った。

表 1 8- ニトログアニン蓄積が観察された炎症関連がん

炎症要因		がんの種類	
感染要因	細菌	ヘリコバクターピロリ菌	胃がん
	ウイルス	パピローマウイルス	子宮頸部がんなど
		B 型肝炎ウイルス, C 型肝炎ウイルス	肝がん
		エプスタインバーウイルス	リンパ腫、上咽頭がん
	寄生虫	ビルハルツ住血吸虫	膀胱がん
		タイ肝吸虫	肝内胆管がん、胆道系がん
炎症性疾患	扁平苔癬		口腔がん
	バレット食道炎		食道がん
	炎症性腸疾患		大腸がん
	悪性線維性組織球腫		軟部肉腫
微粒子	アスベスト		中皮腫、肺がん

4. 結果および考察

図2に示すように、AOMとDSSで処置した発がん群のマウスでは、大腸に腫瘍が発生した。また「発がん+水投与」群と比べて「発がん+アスピリン投与」群では、マウス1匹あたりの大腸腫瘍の数、および大腸腫瘍のうちで

がん化した部分のサイズが、ともに統計学的有意に減少した。発がんさせずアスピリンのみ投与した群では、体重、大腸長、腫瘍などの異常は見られず、健康であった。

炎症や腫瘍に関する各種マーカーについて解析した結果を図3に示す。血漿中の炎症マーカーIL-6は、無処置群と比べて発がん+水投与群で上昇したが、アスピリ

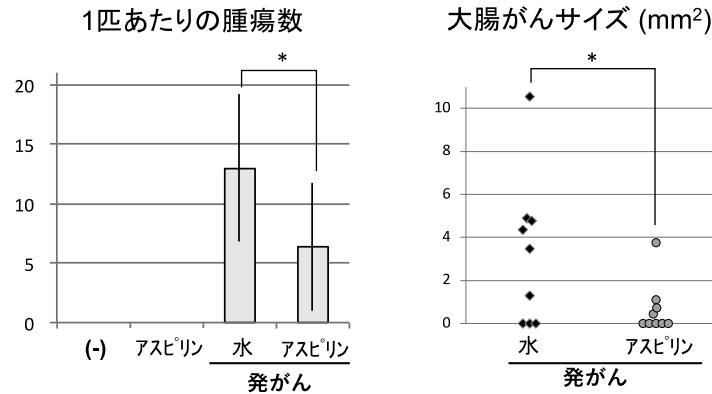


図2. マウス1匹あたりの腫瘍数(個)と大腸がんサイズ(mm²)

1匹あたりの腫瘍数には良性腫瘍を含む。大腸がんサイズは、ヘマトキシリン・エオジン染色した大腸組織標本を病理組織学的に解析し、腫瘍のうちで正常細胞とがん細胞を判別し、がん化している部分のみを1匹あたり1切片あたりの平均値としてグラフ化した。*: $p < 0.05$ (Student's t -test), 縦棒; 標準偏差, n ; 8~9。

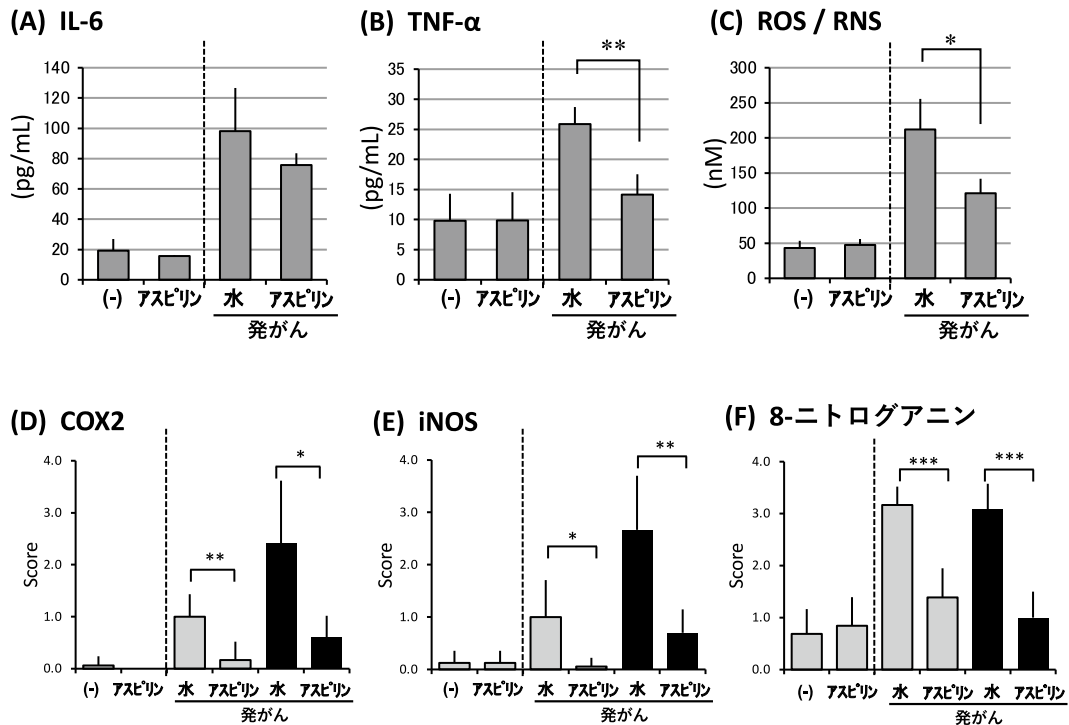


図3. アスピリンによる各種マーカーの変動

(A) 炎症マーカーIL-6, (B) 腫瘍マーカーTNF- α , (C) 活性酸素種および活性窒素種 (ROS/RNS), (D) COX2, (E) iNOS, (F) 炎症関連DNA損傷8-ニトログアニン。(A~C)は血漿サンプルをキットで解析したものの。(D~F)は大腸組織サンプルで、灰色バーは正常部位、黒色バーは腫瘍部位を組織化学的に解析したものの。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (Student's t -test), 縦棒; 標準偏差, n ; 3~8。

ン投与により抑制傾向にあった (A)。血漿中の腫瘍マーカー TNF- α および活性種 ROS/RNS は、無処置群と比べて発がん + 水投与群で上昇したが、アスピリン投与により統計学的有意に減少した (B, C)。大腸組織標本を免疫組織化学的に解析した結果、発がん群では COX2, iNOS, および 8- ニトログアニンが観察されたが、アスピリン投与によりいずれも統計学的有意に減少した (D, E, F)。アスピリンによる COX2, iNOS, 8- ニトログアニンの減少は、腫瘍部位のみでなく周辺の正常組織においても観察されたことから、発がん前に効果を発揮していると推測される。

本研究に用いた大腸がんモデルでは、AOM による変異に続いて DSS が炎症を誘発し、更なる変異が蓄積して発がんにいたる。アスピリン投与により COX2 が抑制されると、COX2/PG シグナル経路で誘導される TNF α と iNOS が抑制され、活性種 ROS/RNS の産生が減少し、DNA 損傷や変異の蓄積が回避され、発がんが抑制されたと考えられる (図 4)。

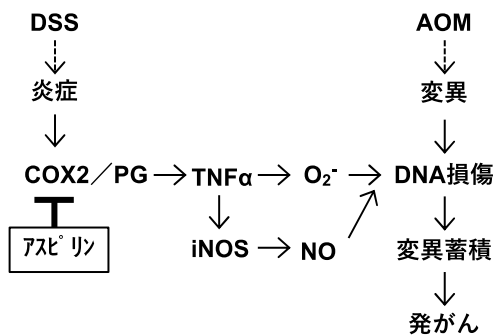


図 4. アスピリンによる発がん抑制機構

5. おわりに

本研究では、アスピリンが炎症誘発性大腸発がんを抑制することを、マウスで確認することができた。その抑制機序として、COX2/iNOS 抑制と炎症から生じる活性種が減少すること、炎症関連 DNA 損傷が減少することが示された。また、8- ニトログアニンの炎症関連発がんリスクマーカーとしての有用性が示された。ここで得られた知

見は、アスピリンをがん化学予防に用いる際の基盤となるであろう。

謝 辞

本研究に関して、多大なご協力とご指導を賜りました、鈴鹿医療科学大学 薬学科 平本恵一 助教、東洋医学研究所 有馬寧 教授ならびに薬学科 川西正祐教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. がんの統計 2022 (公益財団法人 がん研究振興財団)
2. Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet*. 2012; 379: 1591-601.
3. Drew DA, Cao Y, Chan AT. Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16: 173-186.
4. Ohnishi S, Hiramoto K, Ma N, Kawanishi S. Chemoprevention by aspirin against inflammation-related colorectal cancer in mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2021; 69 :265-271. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.20-189>
5. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. 2001; 2: 533-543.
6. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Nitrate and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. *Genes Environ*. 2017; 38: 26.
7. Ohnishi S, Ma N, Thanan R, Pinlaor S, Hammam O, Murata M, et al. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 387014.
8. Parang B, Barrett CW, Williams CS. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol*. 2016; 1422: 297-307.

— プロフィール —

大西 志保 鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科・助教
博士（医学）

〔経歴〕 2002年三重大学大学院医学研究科（社会医学）
博士課程修了，2002年世界保健機関国際がん研究機関
博士研究員，2005年国立がんセンター研究所任期付研
究員，2008年鈴鹿医療科学大学薬学部助手，2016年
より現職。〔専門〕 がん予防，DNA 損傷，炎症関連発が
ん。

Chemoprevention by aspirin against inflammation-related colorectal cancer

— Mice model —

Shiho OHNISHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Suzuka University of Medical Science

Key words: Cancer chemoprevention, inflammation, DNA damage, 8-nitroguanine, NSAID

Abstract

Colorectal cancer is the second most common cancer in Japan. Inflammation is an important risk factor for cancer. Epidemiological studies previously demonstrated that aspirin decreased the incidence of colorectal cancer. However, the molecular mechanism is not completely clarified. Therefore, it is important to investigate the mechanisms by which aspirin prevents colorectal cancer in mice. ICR mice were treated with mutagenic azoxymethane and the ulcerative colitis inducer, dextran sodium sulfate, to induce colorectal tumors. Aspirin was orally administered for 12 weeks. Aspirin significantly decreased the number and size of colorectal tumors. Aspirin also significantly reduced levels of reactive oxygen species (ROS) and tumor necrosis factor alpha in the plasma. Immunohistochemical analyses showed that aspirin clearly suppressed cyclooxygenase 2 (COX2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) at colorectal tumor sites. A marker of inflammation-related DNA damage, 8-nitroguanine, was also suppressed by aspirin in the colorectal tissues. The present results suggest that the administration of aspirin suppressed carcinogenesis caused by inflammation through decreases in COX2 and ROS levels, resulting in decrease of DNA damage.