

NADPH oxidase 阻害剤 apocynin の肝発癌抑制効果の検討

名古屋市立東部医療センター
病理診断科 部長 鈴木 周五
名古屋市立大学大学院医学研究科
実験病態病理学 教授 高橋 智

<目的>

発がんにおいて活性酸素は促進物質の一つとして注目されており(1)、ヒトにおいても H. pylori による胃炎や潰瘍性大腸炎、ウイルス性肝炎・肝硬変において炎症とともに発生する活性酸素が発がん性を促進している報告がある(2, 3)。活性酸素はミトコンドリア由来、NADPH oxidase および、その他、代謝や炎症などにより起こると考えられており(4)、その中で我々は内因性活性酸素誘導酵素である NADPH oxidase に着目した。その阻害剤である apocynin は、抗酸化物質と違い細胞内で機能的に活性酸素を低下させることが期待される。我々は以前に無機砒素による膀胱傷害において、apocynin が活性酸素発生の部分的な低下を起こすことを(5)、ラット前立腺発癌モデルにおいて、apocynin が活性酸素誘導阻害とともに発癌性の抑制することを確認した(6)。

今回、apocynin の化学予防剤としての役割が、肝臓においても期待出来るため、ラット中期肝発がん性試験法(7)を用いて、肝発癌に対する抑制効果を検討した。この試験法は、ラット肝臓における発癌性を簡便かつ定量性を持って確認出来る動物モデルである。このモデルで肝発癌性の指標として用いる glutathione-S transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢は、ラット肝臓における前癌病変として種々の実験で用いられている(8, 9)。

<方法>

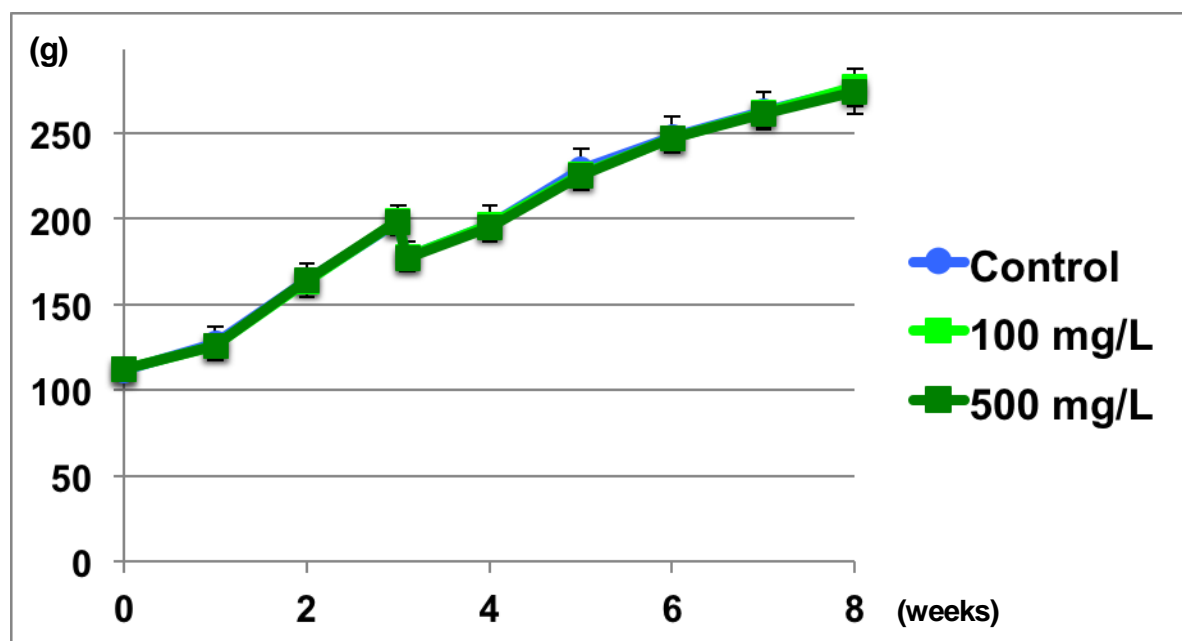
動物は、対照群、apocynin 低濃度および高濃度投与群それぞれ 15~16 匹ずつ準備した。6 週齢の F344 雄ラットに diethylnitrosamine (DEN) 200 mg/kg を腹腔内投与し、2 週間後から apocynin 100 もしくは 500 mg/L を 6 週間飲水投与した。実験開始 3 週後に肝部分切除を行い、実験期間 8 週で屠殺・剖検を行った。体重測定後、肝臓、腎および脾臓を採取し、重量測定を行った。採取した肝臓の一部を凍結し、以下の活性酸素濃度測定に用いた。残りの肝臓および他の臓器は 10%ホルマリンで固定し、標本作製した。

肝組織に対して GST-P 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、GST-P で陽性となる細胞巢の単位面積あたりの数および面積を Keyence BZ-9000 を用いて計測した。また、細胞増殖を Ki67 抗体による免疫組織化学染色で、アポトーシス細胞を TUNEL 染色法により検討した。

また、凍結肝組織を 7 μm に薄切し、5 μM dihydroethidium (DHE) 溶液に 37°C 15 分暗所で保存した後、phosphate buffered saline で洗浄、蛍光顕微鏡である Keyence BZ-9000 によりその発色を観察した。

<結果>

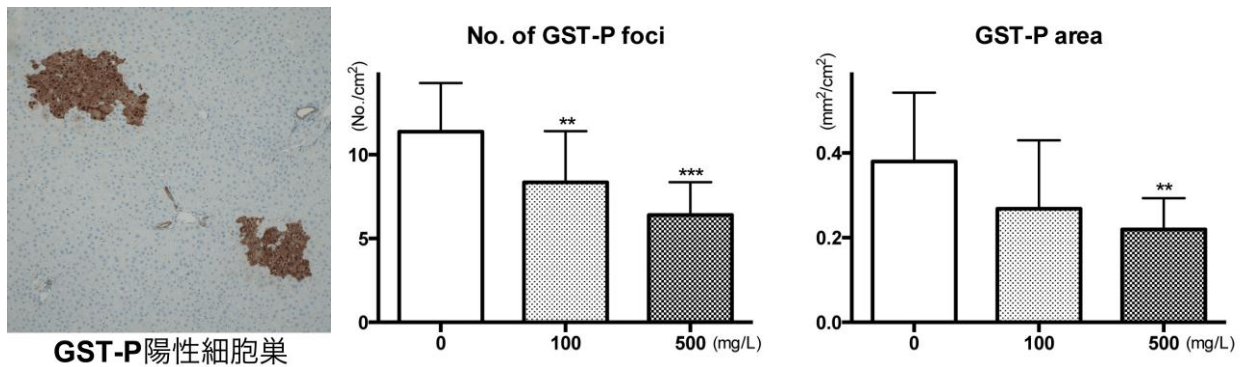
動物実験経過中の体重を下記に示す。体重は、肝部分切除により一次的に減少するものの経過中は増加した。また、群間で体重増加に差は見られなかった。



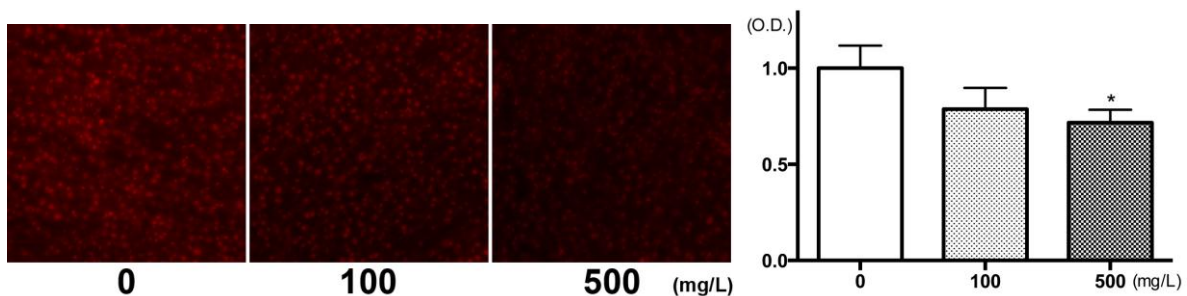
屠殺時の体重および肝重量、飲水摂取量を下記に示す。いずれの群においても差が見られなかった。また、腎臓や脾臓の臓器重量についても群間で差が認められなかった。いずれの群においても腎組織に毒性変化を認めなかった。以上、これらの所見からは apocynin の毒性は認めなかった。

Treatment	No. of rat	Body weight (g)	Liver weight (g)	Water consumption (ml/rat/day)
Control	15	276.4 ± 10.9	8.7 ± 0.3	19.2 ± 1.7
100 mg/L	15	277.0 ± 11.2	8.5 ± 0.5	19.6 ± 2.0
500 mg/L	16	274.0 ± 12.7	8.6 ± 0.8	19.3 ± 1.9

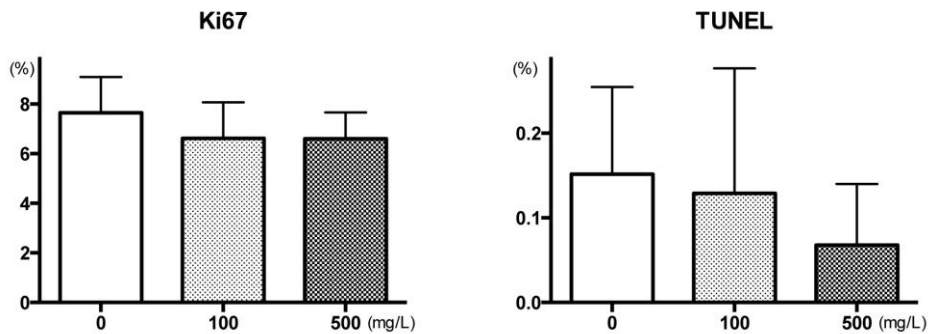
肝組織面積あたりの GST-P 陽性細胞巢の個数および面積を計測した結果を示す。数および面積いずれにおいても apocynin 濃度依存性に有意な低下を認めた。従って、apocynin は肝発癌に対して抑制作用を有することを確認した。



肝組織内の活性酸素を解析するため、肝組織の DHE による染色した写真および、その吸光度を解析した結果を下図に示す。DHE は核に染色され、その発色は apocynin 濃度依存性に低下、500mg/L において有意な低下を認めた。



下記に肝組織における Ki67 および TUNEL 染色による核染色陽性率を示す。いずれも apocynin 投与により抑制傾向を示したが、群間では有意な差を認めなかった。



<考察>

今回、我々はラット中期肝発がん性試験法を用いて、apocynin の発癌性および発癌抑制効果を検討したが、肝組織単位面積あたりの GST-P 陽性細胞巢の数および面積を有意に低下することから、apocynin は肝発癌に対しても抑制効果をもつことが確認され、化学予防剤としての可能性が示された。また、今回用いた apocynin 投与量では、体重および各臓器重量、組織学的観察を含め、毒性作用は認められず、今後ヒトへの投与を鑑みた場合に重要な所見と考えられる。

ラット中期肝発がん性試験法は 300 以上の化学物質について検討され、既知のラット肝発がん物質の検出率は 92% で、指標としている GST-P の発現を抑制すると報告されている化学物質である peroxisome proliferator を除くと 98% 以上と高く、肝発がん性を検討するにあたり比較的短期かつ簡便なモデルである(7)。加えて、GST-P 陽性細胞巢の数や面積の抑制は、肝発がん抑制効果の可能性を示すものである。

我々は以前にヒト前立腺癌細胞株において、apocynin による活性酸素および細胞増殖抑制効果を確認した(6)。一方でラット肝癌細胞株における apocynin の効果は、活性酸素抑制を確認したものの、細胞増殖に対しては抑制効果を示さなかった(10)。今回の結果を踏まえると、前立腺においては腫瘍の発生・進展いずれの時期においても活性酸素が重要な役割を示す一方で、肝臓では癌化に対する危険因子であるものの、腫瘍内で直接的な増殖因子としての役割が乏しいことが推察される。今回、肝組織内での細胞増殖活性関連タンパク Ki67 の陽性率が低下するものの、群間では有意差が出なかった原因と推察される。

以上より、apocynin は肝組織においても発癌性を示さず、むしろ発癌抑制物質である可能性を示した。以前の結果も加えて apocynin という NADPH oxidase を特異的に阻害する化

学物質が、種々の臓器において発がん抑制や抗腫瘍効果を有することが示された。また、比較的高濃度での投与においても毒性が示されないことは、今後の治療薬としての活用に心強い。我々は前立腺癌細胞株の皮下移植モデルにおいて血管新生抑制効果も示しており(11)、今後の発がんおよび腫瘍抑制剤としての可能性を期待している。

<文献>

1. J. E. Klaunig, L. M. Kamendulis, B. A. Hocevar: Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis, *Toxicologic pathology*, 38: 96-109, 2010.
2. Y. J. Kim, E. H. Kim, K. B. Hahm: Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities, *J Gastroenterol Hepatol*, 27: 1004-1010, 2012.
3. M. R. Higgs, P. Chouteau, H. Lerat: 'Liver let die': oxidative DNA damage and hepatotropic viruses, *J Gen Virol*, 95: 991-1004, 2014.
4. S. Dikalov: Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases, *Free radical biology & medicine*, 51: 1289-1301, 2011.
5. S. Suzuki, L. L. Arnold, K. L. Pennington, S. Kakiuchi-Kiyota, S. M. Cohen: Effects of co-administration of dietary sodium arsenite and an NADPH oxidase inhibitor on the rat bladder epithelium, *Toxicology*, 261: 41-46, 2009.
6. S. Suzuki, K. Shiraga, S. Sato, W. Punfa, A. Naiki-Ito, Y. Yamashita, T. Shirai, S. Takahashi: Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis, *Cancer science*, 104: 1711-1717, 2013.
7. N. Ito, S. Tamano, T. Shirai: A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals, *Cancer Sci*, 94: 3-8, 2003.
8. K. Sato, A. Kitahara, K. Satoh, T. Ishikawa, M. Tatematsu, N. Ito: The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis, *Gann*, 75: 199-202., 1984.
9. N. Ito, R. Hasegawa, K. Imaida, T. Masui, S. Takahashi, T. Shirai: Pathological markers for non-genotoxic agent-associated carcinogenesis, *Toxicol Lett*, 64/65: 613-620, 1992.
10. S. Suzuki, P. Pitchakarn, K. Ogawa, A. Naiki-Ito, T. Chewonarin, W. Punfa, M.

- Asamoto, T. Shirai, S. Takahashi: Expression of glutathione peroxidase 2 is associated with not only early hepatocarcinogenesis but also late stage metastasis, *Toxicology*, 311: 115-123, 2013.
11. S. Suzuki, P. Pitchakarn, S. Sato, T. Shirai, S. Takahashi: Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation, *Exp Toxicol Pathol*, 65: 1035-1041, 2013.