

論文の内容の要旨

論文題目：Chemopreventive effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma
on gastric carcinogenesis in mice

和訳： ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) の胃発癌における化学予
防的な効果についての検討

指導教官： 上西 紀夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

学生証番号：41-17513

氏名： 呂 杰

はじめに

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) は核内ホルモン受容体スーパーファミリーの一つであり、常にRetinoid X受容体と二量体を形成し、リガンドと結合することによりPPRE(PPAR Response Element)に結合し、下流遺伝子の転写を活性化する。PPAR γ はヒトの組織に発現する一方、いくつかのヒトがん細胞にも発現している事が知られている。PPAR γ の内因性リガンドとしては15-Deoxy-12,14-prostaglandin J2、外因性のリガンドとしてはthiazolidinediones (pioglitazone, rosiglitazoneとtroglitazone)等が知られている。これらのリガンドは様々ながん細胞に対して分化誘導、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導効果を持つため、抗がん剤として利用できる可能性が報告されている。更に、これらのリガンドには大腸がん、乳がん、舌がん発癌に対する化学的予防効果があることも最近報告された。しかしながら、結腸癌に対するPPAR γ リガンドの効果は論争になっている。すなわち、いくつかの最近の研究では、PPAR γ リガンドの生物学的作用がPPAR γ に依存しないと報告された。一方、PPAR γ リガンドは胃がん培養細胞株に対する殺細胞効果が報告されていたが、PPAR γ の胃がん形成における役割、および、PPAR γ リガンドの胃がん発癌における効果については全くわかっていない。この疑問を解明するために、PPAR γ ノックアウトと野生型マウスにMNU (*N*-Methyl-*N*-nitrosourea) を10週間経口投与して胃がんを誘発し、続いてPPAR γ リガンドを1年間投与して胃発がんにおけるPPAR γ の役割及びそのリガンドの効果を検討した。今回の結果としては、PPAR γ が胃発癌に抑制的役割を果たし、PPAR γ のリガンドtroglitazoneが胃発癌に対する防御的な作用を示した。更にこの作用がPPAR γ の発現に依存することを明白に実証した。

実験方法：実験にはPPAR γ 野生型マウスとヘテロ欠損型マウスを用いた。同世代（4－7週齢）の107匹のマウス（65匹ヘテロ欠損型、42匹野生型）を8組に分けた。1,2,3,4組はヘテロ欠損型、5,6,7,8組は野生型マウスとした。2,3,6,7組のマウスに240p.p.mのMNUと蒸留水を一週間ずつ、交互に10週間自動摂水させた；1、4、5、8組のマウスには蒸留水のみを摂水させた。11週目から全てのマウスの飲用水を蒸留水に交換した。続いて3、4、7、8組に0.15%（w/w）のTroglitazoneを混ぜた粉末餌を、1、2、5、6組に粉末餌のみを42週間それぞれ自動摂食させた。52週目で全マウスを屠殺し、病理組織的検査を行った。

結果

胃粘膜でPPAR γ は明らかに発現する：PPAR γ がマウスの胃に発現することを確認するために、抗PPAR γ (H-100)抗体を使ってウエスタンブロッティングと組織免疫染色法で検討した。胃粘膜におけるPPAR γ 蛋白質の発現は、強発現する大腸に比べて低いけれども、明らかな発現が野生型マウスに検出された、PPAR γ 遺伝子のヘテロ欠損型マウス胃粘膜ではPPAR γ は弱い発現を示した。

PPAR γ の欠損は胃発癌を促進する：屠殺後、採取した胃は、4 μ m厚に薄切し、H.E.染色後病理的検査を行った。その結果MNU非摂取群（1、4、5、8組）すべてには癌は見られなかったが、PPARヘテロ欠損型マウス/MNU摂取（2組）では19匹中17匹に胃癌が誘導された（89.5%）；そのうち15匹は高分化腺がん、1匹は中分化腺癌、1匹は上皮内癌、および1匹のリンパ腫であった。しかしながら、6組（野生型/MNU摂取）では9匹のうち、胃がんは5匹にしか発生せず（55.5%）、それらはすべて高分化腺がんであった（ $p<0.05$ 、2組に比較し、有意差を認めた）。これらのデータによりPPAR γ 欠損がMNUによるマウスの胃発癌を著しく促進する事が示唆された。

TroglitazoneによるPPAR γ 活性化は胃の発癌を防ぐ：野生型マウスは、MNUで処理された9匹（6組）のうち5匹に胃がんを認めたが、troglitazoneの連続投与は著しく胃発癌の発生率を減らした（7組、11匹のうち1匹しか胃がんを認めなかった、9%）。しかしながら、troglitazoneはPPAR γ ヘテロ欠損型マウスに発癌抑制作用を示さなかった（2組、MNU 89.5%；3組、MNU+Tro 80%）。したがって、troglitazoneの抗がん作用はPPAR γ の発現量に依存すると考えられた。

PPAR γ 野生型とヘテロ欠損型マウスにおいて、胃がんの組織学上の相違は認められなかった：誘発された胃がんは、主として、幽門の粘膜、および胃底幽門境界部に認められた。胃がんの肉眼的所見と組織学上の相違は、野生型とヘテロ欠損型マウスの間で観察されなかった。マウスは発癌物質に誘導された胃癌で37週目に死に始めた。37週目から52週目の実験終了までに、8組は19匹中10匹、3組は15匹中8匹、6組は9匹中1匹、7組は11匹中1匹がそれぞれ死亡した。野生型マウスと比較して、胃癌の発生頻度の増加がPPAR γ ヘテロ欠損型マウスの生存時間を短縮する事が示唆された($p<0.01$)。

PPAR γ の発現は胃がん細胞では抑えられた：上記の結果より、PPAR γ がリガンドに応じてtumor suppressorとして働く可能性を示唆したので、癌と正常な胃粘膜でPPAR γ の発現を検討した。結果としてはPPAR γ の発現は正常な粘膜中よりがん部位で弱いことが判明した。また、troglitazone投与マウスの正常な粘膜中でより強いPPAR γ 発現が観察されたが、同粘膜内の癌細胞にもその発現が低かった。

胃粘膜におけるPPAR γ とRUNX3の発現の関連： β -cateninは大腸発癌における重要な分子である事が知られており、大腸発癌の初期段階でPPAR γ の活性化による β -cateninの安定化が重要な役割を果たすことが報告された。また、cyclin D1は、発癌におけるPPAR γ と複雑な関係をもつことが分かってきた。そこで、免疫組織化学的方法で胃癌および正常な粘膜中の β -cateninおよびcyclin D1の発現を検討した。しかしながら、癌と正常な粘膜で β -cateninあるいはcyclin D1のいずれも顕著な変化は認められなかった。

一方、RUNX3は胃の発癌に関与している事が報告され、胃癌のtumor suppressor遺伝子として考えられている。今度の実験で、PPAR γ の胃発癌の予防効果のメカニズムを解明するために、胃粘膜中のRUNX3の発現に対するPPAR γ 欠損の影響を検討した。RT-PCRとウェスタンブロッティングで検討した結果、RUNX3のmRNAとタンパク質の発現が野生型マウスと比較して、PPAR γ ヘテロ欠乏マウスで低下していることが判明した。

結論

最近、癌の予防および治療の標的としてのPPAR γ が、広く研究されている。しかしながら、大腸癌におけるPPAR γ の役割は矛盾な結果が報告されており、またPPAR γ リガンドの抗がん作用はPPAR γ と無関係であるという報告によって複雑になった。私の今回の研究結果は、胃発癌におけるPPAR γ の重要性を示す初めての明らかな証拠である。PPAR γ の欠損は発癌物質に誘導された胃発癌の感受性を著しく増大させ、野生型マウスと比較して生存率も減少させた。本研究の結果は、PPAR γ の皮膚、卵巣および乳癌のtumor

suppressorとしての役割を示唆した他のいくつかの報告に一致する。MNUで誘導された胃がんはPPAR γ の発現が抑えられたことにより、PPAR γ が発癌を抑えることを立証した。更に、本研究の結果は、胃発癌過程におけるtroglitazoneの予防作用を明白に実証した。troglitazoneは胃がんの病理学的組織像に影響せず、胃発癌に対する感受性を抑えることは明らかにした。troglitazoneの予防的な効果は、PPAR γ ヘテロ欠損型マウスでは観察されず、野生型マウスのみで観察された。また、がん細胞のPPAR γ 発現を抑えたことは、troglitazoneの働きがPPAR γ に依存することを明白に示した。PPAR γ リガンドであるtroglitazone、pioglitazoneおよびrosiglitazoneは結腸癌に対する予防効果を報告されたが、今回私の研究で観察されたように、troglitazoneの胃癌に対する予防的な効果がPPAR γ に依存すると考えられるので、pioglitazone、rosiglitazoneおよび15-PG-J2など他のリガンドの予防効果も、今後研究されなければならない。一方、RUNX3が胃癌のtumor suppressorであることが知られているが、本研究では、RUNX3の発現が、PPAR γ ヘテロ欠損型マウス胃粘膜において減少したことは、PPAR γ とRUNX3の関連が示唆された。PPAR γ ヘテロ欠損型マウス胃粘膜に抑えたRUNX3の発現は、胃発癌の感受性が高くなる原因のひとつであると考えられる。

マウスのPPAR γ 欠損が発癌物質に誘導された胃発癌の感受性を高くするという本研究の結果は、胃癌が高発生する個体群を識別する方法を提供するかもしれない。したがって、troglitazoneの癌予防的な効果は臨床において非常に重要な意味合いを持つ。

結論として、本研究でPPAR γ が胃発癌にtumor suppressorとして機能することを示し、MNUに誘導された胃発癌に対して、1) PPAR γ ヘテロ欠損型マウスが胃癌感受性を増加する、2) PPAR γ リガンドであるtroglitazoneは胃発癌に予防的な効果があり、3) 胃発癌におけるtroglitazoneの予防的な効果は、PPAR γ の発現に依存することが判明した。