

MNNG 誘導胃腸発癌に対する $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の 抑制効果発現過程における血管新生の阻害について

川浦昭彦* 谷田憲俊** 泉 啓介*** 秋山純一*
水谷雅年* 野中紘士**** 武田英二*****

Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibitory effect of 1α -hydroxyvitamin D₃ on
N-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced gastrointestinal carcinogenesis in Wistar rats

Akihiko KAWAURA *, Noritoshi TANIDA **, Keisuke IZUMI ***, Junichi AKIYAMA *,
Masatoshi MIZUTANI *, Kouji NONAKA ****, Eiji TAKEDA *****

要 約

MNNG 誘導のラット胃腸発癌の $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ による抑制モデルにおいて血管新生阻害の有無及び VEGF の関与を検討した。動物は 8 週令の雄性ウイスター WKY ラットを用いた。MNNG は蒸留水に溶解し、100mg/l の濃度に調節した。 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ を中鎖脂肪酸 (以下 MCT) に溶解し、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度とした。ラットに 0.01% MNNG を 24 週間飲水投与した。その後さらに 24 週間、第 1 群は無処置、第 2 群は $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の溶媒である MCT 0.2ml を、第 3 群では MCT 0.2ml あたり 0.04 μg の $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ をそれぞれ週 3 回経口投与した。投与期間中、4 週毎に体重測定を実施し、MNNG 投与 48 週目に麻酔下で屠殺した。固定された検体はパラフィンで包埋後薄切し、1 つはヘマトキシリン染色、さらに血管内皮細胞、VEGF については Streptoavidin-biotin (SAB) 法による免疫染色を行った。胃腸腫瘍の発生率は MNNG のみの対照群 (第 1 群) は 30 匹中 16 匹 (53%)、MNNG+MCT 群 (第 2 群) は 30 匹中 16 匹 (53%)、MNNG+ $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ (第 3 群) は 30 匹中 8 匹 (27%) であった。第 3 群の腫瘍発生率とラット 1 匹あたりの腫瘍の個数は第 1 群のそれに比べ有意に低下している。第 1 群の vessel count は 3.77 で、第 3 群のそれは 1.60 であり有意に減少している。また、第 1 群の VEGF 発現程度は 1.57、第 3 群のそれは 1.42 であり減少傾向であった。以上、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の経口投与により MNNG 誘導ラット胃腸発癌は抑制された。 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ は VEGF を介して血管新生を制御し、胃腸癌の発生抑制に働いたと考える。

キーワード：血管新生阻害、活性型ビタミン D、MNNG、胃腸発癌、ラット

Key words : Inhibition of angiogenesis, 1α -hydroxyvitamin D₃, *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine,
Gastrointestinal carcinogenesis, Rat

* 吉備国際大学保健科学部理学療法学科
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8
** 山口大学大学院医学系研究科医療環境学
〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1
*** 徳島大学大学院
ヘルスバイオサイエンス研究部環境病理学
〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3 丁目 18-15
**** 吉備国際大学保健福祉研究所
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8
***** 徳島大学大学院
ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学
〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3 丁目 18-15

* Department of Physical Therapy, School of Health Science, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan
** Department of Medical Humanities, Yamaguchi University Graduate School of Medicine
1-1-1, Minami-Kogushi, Ube-City, Yamaguchi, 755-8505, Japan
*** Department of Molecular and Environmental Pathology, Institute of Health
Biosciences, The University of Tokushima Graduate School
3-18-15, Kuramoto-cho, Tokushima-City, Tokushima, 770-8503, Japan
**** Research Institute of Health and Welfare, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan
***** Department of Clinical Nutrition, Institute of Health Biosciences, The
University of Tokushima Graduate School
3-18-15, Kuramoto-cho, Tokushima-City, Tokushima, 770-8503, Japan

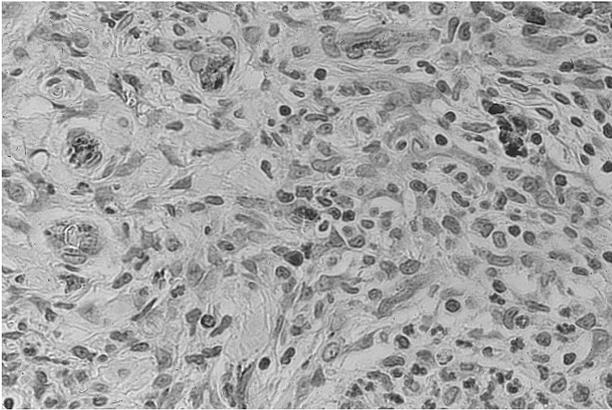


図2 腫瘍内の微小血管
(抗第Ⅷ因子抗体による免疫染色 ×400)

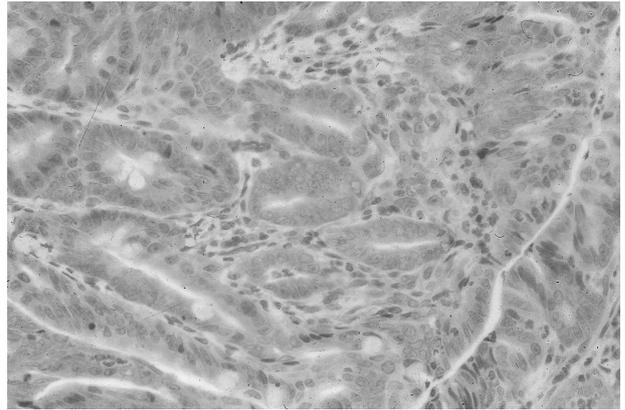


図3 腫瘍内で染色された VEGF (×400)

り、腫瘍毎に0～3+のスケールで等級化した。さらに各群で見られる腫瘍のスケールの平均値を計算し、その群の VEGF 発現程度とした。図3は VEGF は強染色されており3+と判定した。

結 果

表1は各群における腫瘍発生頻度とラット1匹あたりの腫瘍個数を示している。胃腸腫瘍の発生率

は MNNG のみの対照群 (第1群) は30匹中16匹 (53%)、MNNG+MCT 群 (第2群) は30匹中16匹 (53%)、MNNG+1α(OH)D₃ (第3群) は30匹中8匹 (27%)であった。第3群の腫瘍発生率とラット1匹あたりの腫瘍の個数は第1群のそれに比べ有意に低下している。ほとんどの腫瘍は腺癌であり漿膜下まで浸潤し3群間に差はなかった。

表2は第1群と第3群における1視野あたりの

表1 腫瘍発生率

Group	Treatment	No. of rats	Body weight(g) (mean ± SD)	No. of rats with gastrointestinal tumors (≥mm) (%)	No. of gastrointestinal tumors/rat (mean ± SD)	No. of rats with tumors	
						stomach	small intestine
1	MNNG	30	443 ± 21	16(53)	0.70±0.79	3	14 ^a
2	MNNG+MCT	30	409 ± 35	16(53)	0.67±0.71	4 ^a	12 ^a
3	MNNG +1α(OH)D ₃ in MCT	30	426 ± 22	8 (27) ^b	0.33±0.61 ^c	2	6 ^a

MCT : medium chain triglyceride

a : One of these tumors was a sarcoma of mesenchymal-cell origin

b : Significantly different from group 1 at p < 0.05 by the X²-test

c : Significantly different from group 1 at p < 0.05 (two-sided) by Student's t-test

表2 腫瘍発生率にみた VC と VEGF 発現程度の比較

Group	Treatment	No. of rats	No. of rats with gastrointestinal tumors(≥mm) (%)	Vessel count (mean± SD)	Expression (mean±SD) of VEGF
1	MNNG	30	16(53)	3.77± 3.94	1.57± 0.72
3	MNNG+1α(OH)D ₃ in MCT	30	8 (27)	1.60±2.06	1.42±0.73

* p<0.05

vessel count と VEGF 発現程度を比較した表である。第1群の vessel count は3.77で、第3群のそれは1.60であり有意に減少している。また、第1群の VEGF 発現程度は1.57、第3群のそれは1.42で減少傾向である。

考 察

1998年1 α (OH)D₃の経口投与によりMNNG誘導ラット胃腸発癌は抑制されたことを報告した⁽¹⁾。1 α (OH)D₃は肝臓で25位が水酸化され活性型ビタミンD[1 α 25(OH)₂D₃]となり癌細胞を含む⁽¹²⁾体内の受容体に対してホルモン的に作用する^(13, 14)。発癌の抑制機構にはいろいろな報告がなされている。活性型ビタミンDが癌細胞を分化誘導する説⁽²⁾、癌細胞の増殖をそれが抑制する説⁽³⁾、さらに癌細胞に対して直接毒性を発揮したり、アポトーシスを誘導する説⁽⁴⁾などである。今回、我々はIsekiの大腸癌に関する報告と同じく⁽⁷⁾、コントロール群に比べ、1 α (OH)D₃投与群で有意にvessel countの減少を認め、またVEGF発現程度の減少傾向もみられた。このことにより、1 α (OH)D₃はVEGFを介して血管新生を制御し、胃腸癌の発生抑制に働いたと考える。固形腫瘍が生体内で増殖するためには継続的に血管が新生される必要があり⁽⁶⁾、転移巣での再増殖にも血管新生が必要なことは知られている⁽¹⁵⁾。1970年以降、血管新生を阻害することにより癌の増殖、転移を抑制しようとする試みが始まっている^(9, 16)。そこで、1 α (OH)D₃は毒性が少なく、臨床的にひろく、長期的に使われている薬物⁽¹⁷⁾として今後臨床応用が期待される。

なお本研究は兵庫医科大学で施行された動物実験結果[Cancer Letters 122 (1998) : 227-230]に基づき継続したものである。

Abstract

The effect of 1 α -hydroxyvitamin D₃ (1 α (OH)D₃) on the incidence of gastrointestinal tumors induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and angiogenesis of gastrointestinal tumors were investigated in male Wistar rats. After oral treatment with 0.01%

MNNG for 24 weeks in rats, 0.04 μ g of 1 α (OH)D₃ or its vehicle were administered by gastric intubation three times a week for 24 weeks. Prolonged administration of 1 α (OH)D₃ at a non-hypercalcemic dose significantly reduced the incidence of gastrointestinal tumors in week 48. Administration of 1 α (OH)D₃ significantly decreased the intensity of immunohistochemical staining for vascular endothelial growth factor (VEGF) and vessel counts in gastrointestinal tumors. These results indicated that a non-hypercalcemic dose of 1 α (OH)D₃ had an inhibitory effect on MNNG-induced gastrointestinal carcinogenesis. A possible mechanism of inhibition of gastrointestinal carcinogenesis by 1 α (OH)D₃ is mediated by the inhibition of angiogenesis as well as an antiproliferative effects.

文 献

- 1) Kawaura A, Tanida N, Nishikawa M, Yamamoto I, Sawada K, Tsujiai T, Kang K B, Izumi K (1998) Inhibitory effect of 1 α -hydroxyvitamin D₃ on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastrointestinal carcinogenesis in Wistar rats. Cancer Letters 10 : 227-230
- 2) Zhang Y, Zhang J, Studzinski GP (2006) AKT pathway is activated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and participates in its anti-apoptotic effect and cell cycle control in differentiating HL60 cells. Cell Cycle 5 : 447-451
- 3) Hashiba H, Fukushima M, Chida K, Kuroki T (1987) Systemic inhibition of tumor promoter-induced ornithine decarboxylase in 1 α -hydroxyvitamin D₃-treated animals. Cancer Res 47 : 5031-5035
- 4) Fife RS, Sledge GW Jr, Proctor C (1997) Effects of vitamin D₃ on proliferation of cancer cells in vitro. Cancer Lett 25 : 65-69
- 5) Alini M, Marriott A, Chen T, Abe S, Poole AR (1996) A novel angiogenic molecule produced at the time of chondrocyte hypertrophy during endochondral bone formation. Dev Biol 25 : 124-132
- 6) Folkman J (1972) Anti-angiogenesis : New concept

- for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175 : 409–416
- 7) Iseki K, Tatsuta M, Uehara H, Iishi H, Yano H, Sakai N, Ishiguro S (1999) Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 α -hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats. *Int J Cancer* 81 : 730–733
- 8) Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1991) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181 : 902–906
- 9) Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, Takeda E, Okano T (2005) 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis* 26 : 429–440
- 10) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumors angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324 : 1–8
- 11) Zhang XH, Huang DP, Guo GL, Chen GR, Zhang HX, Wan L, Chen SY (2008) Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer* 8 : 4
- 12) Frampton RJ, Suva LJ, Eisman JA, Findlay DM, Moore GE, Moseley JM, Martin TJ (1982) Presence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in established human cancer cell lines in culture. *Cancer Res* 42 : 1116–1119
- 13) DeLuca HF, Schnoes HK (1983) Vitamin D : recent advances. *Annu Rev Biochem* 52 : 411–439
- 14) Minghetti PP, Norman AW (1988) 1,25(OH)₂–Vitamin D₃ receptors : gene regulation and genetic circuitry. *FASEB J* 2 : 3043–3053
- 15) Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D (2008) Copper and angiogenesis : unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23 : Epub ahead of print
- 16) Yano S, Shinohara H, Herbst RS, Kuniyasu H, Bucana CD, Ellis LM, Davis DW, McConkey DJ, Fidler IJ (2000) Expression of Vascular endothelial growth factor is necessary but not sufficient for production and growth of brain metastasis. *Cancer Res* 60 : 4959–4967
- 17) Kawaura A, Takeda E, Tanida N, Nakagawa K, Yamamoto H, Sawada K, Okano T (2006) Inhibitory effect of long term 1 α -hydroxyvitamin D₃ administration on *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Biochem Nutr* 38 : 103–106

