

論 文 要 旨

**Effect of Habitual Exercise on the Renal Carcinogenesis
by Ferric Nitrilotriacetate**

鉄ニトリロ三酢酸による腎発がん
及ぼす習慣的運動の影響

加藤 豊広

【序論および目的】

運動は健康の保持増進のために不可欠であると考えられる。運動は、動物実験において、乳がん、皮膚がん、肝がん、大腸がん、リンパ腫、膵臓がんなどに対して抑制効果があると報告されているが、腎がんに対する研究は行われていない。摂取カロリー制限には発がんの抑制効果があるが、運動はカロリーを消費させ、カロリー摂取量を相対的に減少させることで発がんを抑制するとも報告されている。一方運動が発がんを増大させるという報告もあり、運動によって誘発される酸化ストレスなどがその原因と指摘されている。

酸化ストレス（活性酸素種の相対的増加）は発がんの重要な危険因子である。運動により体内の活性酸素種発生量は増加し、その結果抗酸化能が誘導され増大すると考えられる。一方代表的な活性酸素発がんモデルに鉄ニトリロ三酢酸（Fe-NTA）による腎発がんがある。

我々は以前運動が発がん物質 Fe-NTA による酸化的 DNA 損傷、8 ヒドロキシデオキシグアノシンを抑制することを報告した。今回は、習慣的運動が Fe-NTA による腎発がんそのものを抑えるかどうかを検討した。

【材料および方法】

オスの F344 ラット(n=48 匹)を、生食投与非運動群、Fe-NTA 投与非運動群、生食投与の短期並びに長期運動群、Fe-NTA 投与の短期並びに長期運動群の 6 群に分けた。運動群はトレッドミルランニングを、8m/分の速度で、傾斜 0 度で 15~30 分間を週 3~5 回行なった。Fe-NTA 投与群は運動の直後に Fe-NTA(5~10mg Fe/kg body weight)を週 3 回 12 週間投与した。短期運動群は Fe-NTA 投与期間のみ運動させた。長期運動群は Fe-NTA 投与後も運動を続行した。すべての動物を実験 40 週で屠殺し、体重、腎臓、並びに副腎の重量を測定した。腎臓は病理組織学的並びに免疫組織化学的に解析した。生食投与群では腎がんが発生していなかったため、運動の影響について Fe-NTA 投与群間のみで解析した。

【結果】

剖検：ラットの体重は、長期運動群が非運動群より有意に低かったが、餌摂取量は有意な差はないものの運動群が非運動群より多かった。腎臓の重量は各群間に有意な差はなかったが、副腎重量は、長期運動群が非運動群並びに短期運動群と比較して有意に高かった。

病理組織学的検査：Fe-NTA 投与群に腎がんによる白色結節と微小浸潤、karyomegalic cell 並びに尿細管の変性が認められた。腎がんの個数には、非運動群、短期並びに長期運動群間に有意な差はなかった。しかし、微小浸潤・karyomegalic cell 並びに尿細管の変性は、非運動群に比較して短期運動群で有意に増加した。長期運動群では短期運動群と比較して微小浸潤と karyomegalic cell が有意に減少し、尿細管の変性も有意な差はなかったものの、減少が認められた。近位尿細管に、ペルリンブルーとターンブルブルー染色では陰性、PAS とシュモール染色は弱陽性の brown droplet を認めた。Fe-NTA 投与群間における brown droplet は、長期運動群が短期運動群並びに非運動群より有意に少なかった。

免疫組織化学的検査：近位尿細管におけるPCNAの陽性細胞数は、短期運動群が長期運動群より有意に多かった。アポトーシスの指標であるTUNEL陽性細胞数は、短期運動群が非運動群並びに長期運動群より有意に多かった。

【考察】

長期運動群は、餌摂取量が他の群より多かったが、体重は非運動群より低かった。このことから本研究の長期運動は、体重増加を抑制する運動量を負荷したと考えられる。また、長期運動群の副腎が増大したことから、長期間のトレッドミルランニングが精神的ストレスを負荷したと考えられる。短期運動群は非運動群より、前がん状態と考えられる微小浸潤・karyomegalic cell・尿細管の変性が多かった。運動時は腎血流量が低下し、その後血流量が回復すると報告されている。運動後腎は虚血再灌流の状態となり、活性酸素種が増加すると考えられる。Fe-NTA を投与時のみに運動をさせた短期運動群では、Fe-NTA による酸化ストレスがより増大し、発がんが亢進したと考えられる。長期運動群は微小浸潤・karyomegalic cell が短期運動群より少なかった。Fe-NTA 投与後も運動を継続することにより酸化ストレス耐性が向上し、発がんを抑制したと考えられる。さらに Fe-NTA 投与期間後の長期運動は、酸化ストレス耐性を向上させることで、アポトーシスの感受性を低下させ、細胞が増殖できるスペースを減少させることでアポトーシス細胞と PCNA 陽性細胞数を抑制したと考えられる。Brown droplet は生食投与群並びに Fe-NTA 投与群の近位尿細管に認められたが、Fe-NTA 投与群では生食投与群より brown droplet の数が有意に多かった。Brown droplet は PAS 並びにシュモール染色が弱陽性であったことから、リポフスチンだと考えられるが、長期運動群で brown droplet が少なかったことは、長期運動が酸化ストレス耐性を向上させ、脂質過酸化を抑制した可能性が示唆される。精神的ストレスはがん免疫を低下させると報告されているが、精神的ストレスの少ない自発的長期運動であれば、発がん抑制効果がさらに明確になったかも知れない。

【結論】

Fe-NTA 投与期間（イニシエーション期間）のみの運動は、Fe-NTA による腎発がんを促進させるが、イニシエーション期間後も継続する長期間の習慣的運動は活性酸素発がんを抑制し、発がん予防に有効であると考えられる。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 120 号	学位申請者	加藤豊広
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位 博士 (医学)
	副査	秋葉 澄伯	副査 中川 昌之
	副査	米澤 傑	副査 古川 龍彦
<p>Effect of habitual exercise on renal carcinogenesis by ferric nitrilotriacetate (鉄ニトリロ三酢酸による腎発がんおよび習慣的運動の影響)</p> <p>鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) は、Fenton 反応を近位尿細管の内腔で起こすことで腎がんを生じる、活性酸素種による発がんモデルとして知られている。学位申請者らは、以前、このモデルを用いて習慣的運動が、抗酸化酵素である superoxide dismutase の酵素活性を増加させ、酸化的 DNA 損傷である 8-hydroxy-deoxyguanosine の生成を抑制することを明らかにした。そこで、申請者らは習慣的運動が腎発がんを抑制するかどうかを検討した。</p> <p>オスの F344 ラット(n=48 匹)を、生食投与非運動群、Fe-NTA 投与非運動群、生食投与の短期と長期運動群および Fe-NTA 投与の短期と長期運動群の 6 群に分けた。運動群はトレッドミルランニングを、8m/分の速度で、傾斜 0 度で 15~30 分間を週 3~5 回行なった。Fe-NTA 投与群には運動の直後に Fe-NTA (5~10mg Fe/kg body weight) を週 3 回 12 週間投与した。短期運動群は Fe-NTA 投与期間のみ運動させた。長期運動群は Fe - NTA 投与後も運動を続行した。すべての動物を実験 40 週で屠殺し、体重、腎臓および副腎の重量を測定した。腎臓においては病理組織学および免疫組織化学的解析を行った。</p> <p>その結果、以下のことが明らかになった。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 短期運動群では非運動群に比して、微小がんと前がん病変と考えられる karyomegalic cell 並びに尿細管変性が有意に増加した。 2) 長期運動群では短期運動群に比して、微小がんと karyomegalic cell が有意に減少した。 3) 長期運動群では短期運動群並びに非運動群に比して、脂質過酸化により生成すると考えられる brown droplet の頻度が有意に減少した。 4) 長期運動群では短期運動群に比して、近位尿細管の proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞数が有意に減少した。 5) 長期運動群では短期運動群に比して、近位尿細管の terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 陽性細胞数が有意に減少した。 <p>これらの結果から、長期運動は、酸化ストレス並びにアポトーシスを低下させ、細胞増殖スペースを減少させることで細胞増殖を抑制し、発がんを抑制すると考えられる。本論文は、継続する習慣的運動が発がん予防に有効であることを示唆し、ヒトのがん予防に貢献すると考えられた。よって本論文は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。</p>			

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 120 号	学位申請者	加藤 豊広
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位 博士 (医学)
	副査	秋葉 澄伯	副査 中川 昌之
	副査	米澤 傑	副査 古川 龍彦
<p>主査および副査の5名は、平成23年2月7日、学位申請者 加藤 豊広 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 疫学データにもとづく運動の大腸がん及び乳がんに対する予防効果は、運動が肥満を抑えることによると考えてよいか？</p> <p>(回答) 肥満の抑制並びにカロリー消費 (相対的摂取カロリーの減少) によるがん予防効果と考える。</p> <p>質問2) 激しい運動は反対に発がんを促進するのか？</p> <p>(回答) これまでの報告でも動物実験では激しい運動は発がんを促進すると報告されている。</p> <p>質問3) Fe-NTA 投与後の長期運動群では、運動強度を減少させたのか？</p> <p>(回答) 投与後は、むしろ運動時間を15分/日から30分/日に増加した。</p> <p>質問4) Karyomegalic cell はヒトの組織では観察されないが、ラット特有のものか？</p> <p>(回答) Fe-NTA を投与したラットで認められる特有の所見である。</p> <p>質問5) Karyomegalic cell が観察されない尿細管変性の所見も前がん病変といえるか？</p> <p>(回答) Karyomegalic cell や細胞異型の認められない尿細管変性は前がん病変でないと考ええる。</p> <p>質問6) 非がん組織領域における karyomegalic cell は PCNA や TUNEL に染まり易いのか？</p> <p>(回答) 多くの karyomegalic cell は PCNA 陽性を呈したが、TUNEL はほとんどが陰性であった。</p> <p>質問7) どの Fe-NTA 投与群も、生食投与群に比して体重が減少しているが、Fe-NTA 投与非運動群と Fe-NTA 投与長期運動群との体重の差異は Fe-NTA による影響でなく運動によるものと考えてよいか？</p> <p>(回答) Fe-NTA 投与群間で有意差があることから、体重の差異は運動の影響と考える。</p> <p>質問8) 長期運動群における副腎の重量の増加は、運動負荷のストレスによるものか、それとも Fe-NTA 投与の影響なのか？ 生食投与長期運動群と Fe-NTA 投与長期運動群との間に差はないと考えてよいか？</p> <p>(回答) 生食投与長期運動群と Fe-NTA 投与長期運動群との間に有意な差はなかった。副腎重量の増加は強制運動によるストレスの影響と考える。</p> <p>質問9) 肉眼的結節所見を総合的に評価する指標として、結節のサイズと数の積による比較もできるか？</p> <p>(回答) 比較していない。</p> <p>質問10) 結節の数は、実験終了時点では各群間に差はなかったが、さらに長期間観察すれば差が生じたと考えてよいか？</p> <p>(回答) さらに時間が経過すれば群間の差が生じたと考える。</p> <p>質問11) Fe-NTA の体内での半減期は？</p> <p>(回答) Fe-NTA は投与30分後に腎臓に現われ5時間後に減少したと報告されている。本実験では投与28週後に鉄染色を行い腎臓中には鉄を検出できなかった。</p>			

質問 1 2) Fe-NTA 投与時の腎臓は虚血状態にあり、それに伴い Fe-NTA の循環量は減少するのか？

(回答) 運動後約 20 分以上経過したあと、所謂、再環流の時点で Fe-NTA を投与しているので Fe-NTA の循環量の低下はないと考えられる。活性酸素が発生しているときに Fe-NTA を投与していると考えている。

質問 1 3) 本実験条件の運動強度は、ヒトにおいては具体的にはどの程度と考えたらよいのか？

(回答) ヒトと直接比較できないが、摂食量が若干多いにも拘わらず体重増加を有意に抑制する運動量である。

質問 1 4) 発がん剤投与時は運動させないで、発がん剤投与後に運動させる群の設定を考えなかったか？

(回答) 実験開始時点では考えなかったが、そのような群を設定すべきであったと思う。

質問 1 5) 今回の実験では、運動が化学発がんを抑えたのか、それとも初期病変を除去したと考えるのか？

(回答) 長期運動群は短期運動群に比して微小がんが減少したので、長期運動群は初期病変の進展を抑制したと考える。

質問 1 6) 鉄を投与した群は体重が減少しているが、餌摂取量は減少していない。なぜ体重が減少したのか？

(回答) Fe-NTA 投与ラットでは多尿と糖尿が報告されており、これによる体重減少と考える。

質問 1 7) Fe-NTA は腎臓以外のがんを誘発しないのか？

(回答) 腎臓以外のがんは報告されていない。

質問 1 8) Fe-NTA 投与後は、腎臓や尿中には 8-hydroxy-deoxyguanosine (8OHdG) が生じるのか？

(回答) 腎臓の 8OHdG は増加するが、私が検索した限りでは、尿中の 8OHdG は検討されていない。

質問 1 9) 活性酸素種によるアポトーシスの経路は？

(回答) 活性酸素種によるアポトーシスの場合は、活性酸素種センサー分子が関与する。例えば AsK1、チオレドキシシンなどの分子が活性酸素種のセンサー分子として働き、下流の JNK 経路並びに p38 経路のシグナル伝達を制御する。

質問 2 0) トレッドミル運動で IGF1 が上昇すると考えられるが調べたか？ IGF1 が腫瘍を促進する可能性は？

(回答) トレッドミル運動で IGF1 が上昇する報告はあるが、Fe-NTA が誘発する腎臓に関する報告はない。

質問 2 1) Karyomegalic cell が前がん病変としているが、将来、がんになると考えてよいのか？

(回答) そのように考える。

質問 2 2) Brown droplet の検出率に対する運動の影響は？

(回答) 長期運動により抑制された。

質問 2 3) Fe-NTA はヒトでも腎臓を発生させるのか？

(回答) Fe-NTA に関してはそのような報告はない。

質問 2 4) 活性酸素種の指標を測定したか？

(回答) 先行研究では運動により SOD 活性が増加し 8OHdG は減少した。このことより今回は測定しなかった。

質問 2 5) 一般的にヒトのがん予防のための運動は、どの程度の運動をどれ位の期間続けると良いのか？

(回答) 軽いジョギングならば、30 分~40 分の時間で毎日継続するのが良いと考える。

質問 2 6) 運動強度の評価指標を測定したか？

(回答) トレッドミルの強度以外は測定していない。

質問 2 7) 本実験の運動は有酸素運動になるのか？

(回答) 有酸素運動になると考える。

質問 2 8) 筋肉量は測定したのか？

(回答) 筋肉量は検討していないが、ヒラメ筋の組織学的検索では群間に差異はみられなかった。

質問 2 9) Fe-NTA のようにフェントン反応で発がんを起こす物質はあるか？

(回答) アスベストが挙げられるが、他には知られていない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。