

新規変異原・がん原物質の検索

研究分担者 若林 敬二 静岡県立大学環境科学研究所 教授

研究要旨

白菜等に含まれるインドール-3-アセトニトリルは、胃の酸性条件下で亜硝酸と反応し直接変異原性を示すニトロソインドール-3-アセトニトリル(NIAN)を生成する。NIAN を100mg/kgの濃度で週2回砂ネズミの胃内に投与すると、腺胃のDNA中に10⁸nucleotides当たり1.6個のDNA付加体が生成することがわかった。NIANを100mg/kgの濃度で週2回ずつ3週間(計6回)砂ネズミの胃内に投与した後、*Helicobacter pylori*を感染させ104週目で全ての動物を屠殺し解剖した。その結果、26匹中8匹(31%)の動物に腺胃がんが発生することがわかった。これらの胃がんは高分化型又は中分化型腺がんであった。一方、NIAN単独投与群22匹及び*H.pylori*単独感染群18匹には腺胃がんの発生は認められなかった。疫学調査により、日本、韓国、中国等における胃がんの発生には、*H.pylori*感染、高塩食の摂取及び白菜等の野菜に由来する硝酸塩の多量の摂取が関与することが示唆されている。以上のことより、白菜等の野菜を含め広く環境中に分布するインドール化合物のニトロソ体はヒト胃がんの発生に係っていることが推定された。

A. 研究目的

日本、韓国、中国等の東アジア諸国では胃がんの発生率は依然として高い。これら国々における胃がんの発生には、*Helicobacter pylori*感染、高塩食の摂取及び白菜等の野菜に由来する硝酸塩の多量の摂取が関与することが疫学的に示唆されている。白菜等に含まれるインドール-3-アセトニトリルは、胃の酸性条件下で亜硝酸と反応し、直接変異原性を示すニトロソインドール-3-アセトニトリル(NIAN)を生成する。直接変異原性を示すニトロソ化合物は、胃、食道等の発がんに関与することが示唆

されている。そこで、本研究では、NIANの発がん性及び作用メカニズムを調べるとともに、ヒト曝露レベルについても検討し、ニトロソインドール化合物の発がんリスク評価の基礎的資料を提出することを目的とする。

B. 研究方法

化学合成したNIANを50%DMSO溶液に溶解し、100mg/kgの濃度で週2回、3匹の砂ネズミ(雄、6週齢)の胃内にゾンデで投与した。対照群の2匹の砂ネズミには、50%DMSO(0.5ml)を投与した。投与後、8

時間後に動物を屠殺し、線胃から DNA を抽出し、³²P-ポストラベル法にて DNA 付加体を解析した。発がん実験においては、砂ネズミ（雄、6 週齢）を 4 群に分け、A 及び C 群には 50%DMSO(0.5ml)を、B 及び D 群には NIAN を 100mg/kg の濃度で週 2 回ずつ 3 週間（計 6 回）胃内に投与した。1 週間後に C 及び D 群には *H.pylori* 培養液を胃内に投与し感染させた。A 及び B 群には培養液のみ投与した。*H.pylori* 感染後 104 週目で全ての動物を屠殺し解剖した。

（倫理面への配慮）

尚、動物実験の実施に際しては、施設の動物実験倫理委員会の承認を得た後に行い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。

C. 研究結果

NIAN を 100mg/kg の濃度で週 2 回胃内に投与すると、砂ネズミの腺胃の DNA 中から、3 つの DNA 付加体スポットの生成が観察された。これら 3 つの付加体の総計レベルは $1.6/10^8$ nucleotides であった。一方、50%DMSO 投与群からは DNA 付加体生成は認められなかった。

NIAN を 100mg/kg の濃度で週 2 回ずつ 3 週間（計 6 回）砂ネズミの胃内に投与した後、*H.pylori* を感染させ 104 週目で全ての動物を屠殺し、解剖した。その結果を表 1 に示す。NIAN を投与後 *H.pylori* を感染させた砂ネズミ(D 群)26 匹中 8 匹(31%)に腺胃がんが発生することがわかった。これらの胃がんは 7 匹が高分化型で 1 匹が中分化型腺がんであった。一方、*H.pylori* 及び NIAN 非投与群(A 群)15 匹、NIAN 単独群(B 群)22 匹及び *H.pylori* 単独感染群(C

群)18 匹には胃がんの発生は認められなかった。

腺胃がん以外に、皮膚腫瘍の発生が A 群に 1 匹、B 群に 3 匹、C 群に 2 匹、D 群に 5 匹認められた。更に、D 群の 1 匹には腎臓に血管腫が観察された。しかし、これらの腫瘍の発生は A-D 群間において有意差は認められなかった。

表 1. 腺胃がんの発生率

Group	Treatment	Effective No.	No. of animals with glandular stomach adenocarcinoma (%)		
			Total	Well dif.	Moderately dif.
A	Broth	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B	NIAN + Broth	22	0 (0)	0 (0)	0 (0)
C	<i>H. pylori</i>	18	0 (0)	0 (0)	0 (0)
D	NIAN + <i>H. pylori</i>	26	8 (31)*	7 (27)	1 (4)

Well dif., well differentiated adenocarcinoma; Moderately dif., moderately differentiated adenocarcinoma.

*P<0.05 vs. group A and C, and P<0.01 vs. group B.

D. 考察

疫学調査より、日本、韓国、中国等における胃がんの発生には、*H.pylori* 感染、高塩食の摂取及び白菜等の野菜に由来する硝酸塩の多量の摂取が関与することが示唆されている。

本研究の成果から、直接変異原性を示す NIAN は腺胃に DNA 付加体を生成することがわかった。更に、NIAN は核酸塩基の脱アミノ化を起こすことも報告されている。従って、NIAN は DNA 付加体生成に加え核酸塩基の脱アミノ化等を起こし腺胃の DNA に傷害を及ぼすことが推察された。NIAN と同様、直接変異原性を示す MNNG や MNU も *H.pylori* 感染した砂ネズミに腺胃がんを誘発することが知られている。又、

環境中に広く分布する、インドール-3-アセトニトリル以外の種々のインドール化合物も酸性条件下で亜硝酸と反応して直接変異原性を示す。以上のことより、白菜等の野菜を含め、環境中に広く分布するインドール化合物のニトロソ体は東アジア諸国の胃がん発生に係っていることが示唆された。今後、ニトロソインドール化合物のヒト曝露レベルやヒト胃がんサンプル中のニトロソインドール-DNA 付加体レベルを調査し、東アジア諸国の胃がん発生要因を更に詳細に追究することが重要と思われる。

E. 結論

白菜等に含まれるインドール-3-アセトニトリルは、胃の酸性条件下で亜硝酸と反応し直接変異原性を示す NIAN を生成する。NIAN を砂ネズミの胃内に投与すると、腺胃に DNA 付加体が生成することがわかった。NIAN を砂ネズミの胃内に投与した後、*H.pylori* を感染させ 104 週目で屠殺したところ、26 匹中 8 匹の動物に腺胃がんが発生することがわかった。これらの胃がんは高分化型又は中分化型腺がんであった。疫学調査により、日本、韓国、中国等における胃がんの発生には、*H.pylori* 感染、高塩食の摂取及び白菜等の野菜に由来する硝酸塩の多量の摂取が関与することが示唆されている。以上のことより、白菜等の野菜を含め広く環境中に分布するインドール化合物のニトロソ体はヒト胃がんの発生に係っていることが推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T,

Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y, Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer*, 2011 in press.

2. Mutoh M, Teraoka N, Takasu S, Takahashi M, Onuma K, Yamamoto M, Kubota N, Iseki T, Kadowaki T, Sugimura T, Wakabayashi K, Loss of adiponectin promotes intestinal carcinogenesis in Min and wild-type mice. *Gastroenterology*, 2011 in press.
3. Ikeda K, Mutoh M, Teraoka N, Nakanishi H, Wakabayashi K, Taguchi R, Increase of oxidant-related triglycerides and phosphatidylcholines in serum and small intestinal mucosa during development of intestinal polyp formation in Min mice. *Cancer Sci*, 102:79-87, 2011.
4. Teraoka N, Mutoh M, Takasu S, Ueno T, Nakano K, Takahashi M, Imai T, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, High susceptibility to azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in obese KK-Ay mice. *Int J Cancer*, 2010, in press.
5. Kitahashi T, Mutoh M, Tsurusaki M, Iinuma G, Suzuki M, Moriyama N, Yoshimoto M, Wakabayashi K, Sugimura T, Imai T, Imaging study of pancreatic ductal adenocarcinomas in Syrian hamsters using X-ray micro-computed tomography (CT).

2.学会発表

1. 堀 美香、北橋 宗、高橋 真美、今井 俊夫、石ヶ守 里加子、高須 伸二、武藤 倫弘、杉村 隆、若林 敬二、高脂肪食によるBOP 誘発ハムスター膵管発がん促進因子の検討、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年
2. 戸塚 ゆ加里、加藤 竜也、中江 大、能美 健彦、川西 優喜、八木 浩司、市瀬 孝道、杉村 隆、若林 敬二、ナノ粒子により誘発される遺伝毒性、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年
3. 寺岡 直哉、武藤 倫弘、高須 伸二、上野 俊也、中野 勝也、高橋 真美、杉村 隆、若林 敬二、KK-A^yマウスの肥満によるアゾキシメタン誘発大腸発がんの促進、第 17 回日本がん予防学会、2010 年
4. 加藤 竜也、戸塚 ゆ加里、田里 李奈、若林 敬二、増田 修一、肥満モデルマウスにおける酸化損傷に関連する DNA 付加体生成の増加、第 39 回日本環境変異原学会、2010 年
5. 石野 孔祐、加藤 竜也、増田修一、松田 知成、杉村 隆、若林 敬二、戸塚 ゆ加里、ナノマテリアルにより誘発される DNA 付加体の解析、第 39 回日本環境変異原学会、2010 年

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業(国際医学協力研究事業))
分担研究報告書

外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価

研究分担者 渡辺 徹志 京都薬科大学 教授

研究要旨

日本における大気発がん関連物質による汚染状況を明らかにするとともに中国大陸からのそれらによる越境汚染の影響を明らかにするため、全国で2008年7月から1年間大気粉塵を捕集し、生物活性、化学成分等を調査した。ほぼすべての大気粉塵抽出物がサルモネラ YG1024 株に対して変異原性を示した。粉塵抽出物が強い変異原性を示した日は大都市において最も多く、次いで中核都市、非都市の順であり、大都市の大気ほど変異原性物質による汚染が進んでいるとことが示唆された。それぞれの地点では、春季に高い粉塵濃度が認めれた日が多くみられ、粉塵濃度と変異原性強度が相関する地点が多くみられた。後方流跡線解析の結果、春季に捕集され強い変異原性を示した大気粉塵を含む気塊の多くが中国大陸を経由して日本に移動してきたことが示唆された。糖尿病罹患患者における高発がんリスクの原因を明らかにするため、高血糖状態が進行した際に生体内で発生すると考えられる変異原物質のリスク評価を行った。すなわち、生体内モデルメイラード反応物から単離同定した新規変異原性物質 5-amino-6-hydroxy-8H-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABAQ) についてチャイニーズハムスター肺(CHL/IU)細胞を用い小核試験を行った。ABAQはS9 mix存在下において用量依存的に小核を誘発した。今後更に、ABAQの生体内での生成と糖尿病状態の進行との関係について検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

日本における大気発がん関連物質による汚染状況を明らかにするとともにそれらの発生源の解明を試みる。また、中国大陸からのそれらによる越境汚染の影響を明らかにすることを目的とする。糖尿病罹患患者において多くの臓器で発がん率が高いことから、同患者における高発がんリスクの原因を明らかにするため、高血糖状態が進行した際に生体内で発生する変異原物質の

構造を明らかにするとともにそのリスク評価を行う。

B. 研究方法

全国で2008年7月から2009年6月にかけて大気粉塵を捕集し、粉塵濃度、生物活性、化学成分等を調査した。生物活性として変異原性を調べた。また、化学成分として金属、イオン等を定量分析した。生体内モデルメイラード反応物から単離同定した新規変異原性物質 5-amino-6-hydroxy-

8*H*-benzo[6,7]azepino[5,4,3-*de*]quinolin-7-one (ABAQ) についてチャイニーズハムスター肺 (CHL/IU) 細胞を用い小核試験を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、京都薬科大学の動物実験委員会の承認を得た後に行い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。

C. 研究結果

全国の多くの地点において粉塵濃度は春季>冬季>夏季>秋季の順に高かった。また、ほぼすべての大気粉塵抽出物が S9 mix の有無に関わらずサルモネラ YG1024 株に対して変異原性を示し、全大気粉塵抽出物の変異原性の平均値は、S9 mix 非存在下において冬季>春季>秋季>夏季、S9 mix 存在下においては冬季>秋季>春季>夏季の順であった。S9 mix 存在下及び非存在下のいずれの場合においても、強い変異原性は非都市圏に比べて都市圏において捕集した大気粉塵に多く見られた。強い変異原性を示した大気粉塵において Pb 及び SO_4^{2-} が多く含まれている傾向がみられた。

ABAQ の合成法を確立した。S9 mix 存在下、ABAQ を 0.2~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で CHL/IU 細胞を曝露後、細胞における小核発生頻度及び細胞の生存率を調べた。ABAQ は 0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で用量依存的に小核を誘発することがわかった。50 及び 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で曝露した際に、陰性対照に比べて有意に増殖が抑制された。

D. 考察

大気粉塵捕集期間において粉塵抽出物

が強い変異原性を示した日は大都市において最も多く、次いで中核都市、非都市の順であり、大都市の大気ほど変異原性物質による汚染が進んでいると考えられた。一方、全国的に春季に高い粉塵濃度が認めれた日が多くみられ、春季においては粉塵濃度と変異原性強度が相関する地点が多くみられた。また、多くの地点において、冬季及び春季に捕集した粉塵の変異原性強度と Pb 量との間に相関性が認められた。また、後方流跡線解析の結果、冬季及び春季に捕集され強い変異原性を示した大気粉塵を含む気塊の多くが中国大陸を経由して日本に移動してきたと考えられた。

ABAQ が S9 mix 存在下において CHL/IU 細胞に対して小核誘発性を示したことから、ABAQ が哺乳類細胞に対しても遺伝毒性を示すことがわかった。その強さは加熱食品中の変異・がん原物質でありメイラード反応生成物である PhIP のそれと比較してやや弱かった。

E. 結論

日本の大気環境は都市部ほど年間を通じて変異原性物質により汚染されている日がおおいものの、春季には全国的に中国から越境輸送された物質の影響を受けており、変異原性物質を含む汚染物質も越境輸送されていることが強く示唆された。

ABAQ は哺乳類細胞に対して *in vitro* で遺伝毒性を示し、その作用発現にシトクロム P450 による代謝活性化が必要なことがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- | | |
|--|--|
| <p>1. Hasei T, Ohno A, Tsukuda R, Inoue T, <u>Watanabe T</u>, Determination of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene in tea leaves as a possible exposure source and in human hair as a biomarker using a two-dimensional HPLC system, Journal of Health Science, 57: 53-59, 2011.</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|--|--|

2. 学会発表

1. 渡辺徹志、秋山雅行、嵐谷奎一、池盛文数、稲葉洋平、穀内修、世良暢之、出口雄也、戸野倉賢一、鳥羽陽、船坂邦弘、長谷井友尋、大気粉塵の生物活性、化学成分の季節変動及び大陸からの長距離輸送による影響、第 51 回大気環境学会年会、2010 年
2. 穀内修、秋山雅行、嵐谷奎一、池盛文数、稲葉洋平、片岡洋行、岸川直哉、世良暢之、出口雄也、戸野倉賢一、鳥羽陽、船坂邦弘、山口孝子、洞崎和徳、長谷井友尋、渡辺徹志、全国 14 地点における大気粉塵の変異原性の季節変動及び中国大陸からの長距離輸送の影響、第 39 回日本環境変異原学会、2010 年
3. 小林沙衣、西崎真理奈、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、川西優喜、八木孝司、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺徹志、メイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性評価、日本環境変異原学会第 39 回大会、2010 年

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

慢性炎症に関連した疾患のバイオマーカー探索と予防

研究分担者 大島 寛史 静岡県立大学食品栄養科学部/大学院生活健康科学研究科 教授

研究要旨

国際的にも増加している生活習慣病の早期発見、診断のバイオマーカーとしての基礎データを得ることを目的に、慢性炎症部位においてコレステロールとオゾン様活性酸素種の反応により生成するコレステロール酸化物セコステロールについて、生成機構の解明、LC-MS/MSを用いる分析法の開発、開発した分析法のヒトLDLコレステロール分析への応用、細胞毒性、一酸化窒素合成酵素の阻害、などについての研究を行った。その結果、ヒト好中球は、酸化バースト状態で、ミエロパーオキシダーゼ依存的にオゾン様活性酸素を生成し、遊離あるいは脂肪酸エステル型のコレステロールを酸化して、セコステロール誘導体を生成することが明らかになった。これらのセコステロール誘導体は、ヒトLDLコレステロール中に微量ながら存在し、かつ、強い細胞毒性を示し、また、シグナル分子一酸化窒素(NO)の生成を阻害することから、動脈硬化症、アルツハイマー症、がんなど酸化ストレスの亢進と関連している疾患の発症・進展に関与している可能性がある。

A. 研究目的

慢性炎症部位において、コレステロールと活性酸素種の反応により、非常に毒性の強いコレステロール酸化物セコステロールを生成することが明らかにされている。本研究においては、国際的にも増加している生活習慣病の早期発見、診断のバイオマーカーとしての基礎データを得ることを目的に、セコステロール類の代謝物の同定と高感度・特異的分析法の開発、動物実験からの生体試料やヒト血液成分の分析への応用などの研究を行った。

B. 研究方法

合成したセコステロール類を細胞培養液

に添加すると、セコステロール類は速やかに消滅することから、何らかの代謝物に変化していることが考えられた。そこで、セコステロール類の代謝物を単離、精製し、化学構造を質量分析計、NMRなどを用いて決定した。また、生体内において、コレステロールの多くは脂肪酸エステルとして存在している。そこで、当研究室において、コレステロール脂肪酸エステルからセコステロール誘導体を新規に合成し、LC-MS/MSを用いた高感度特異的分析法を確立し、ヒト血液から調製したLDLコレステロールの分析に応用した。また、合成した脂肪酸エステルのセコステロール誘導体を用いて、細胞毒性について検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、静岡県立大学の動物委員会の承認を得て、その指針に沿って実施した。また、ヒト生体試料を分析する研究は、同倫理委員会の承認を経て、指針に従って行った。

C. 研究結果

細胞毒性の非常に強いセコステロール-A (アルデヒド基とケトン基を有するコレステロール酸化物) を細胞培養の培地に添加すると、速やかにアルドール化されて、セコステロール-B (閉環してアルデヒド基と水酸基を有するコレステロール酸化物) に変化することを見出した。さらに、セコステロール-Aと-Bの一部は、分子内のアルデヒド基が酸化されてカルボキシル基に変化したセコステロール酸化体に代謝されることが明らかになった。そこで、セコステロール類およびその酸化体の生成量をマーカーとして、フォルボールエステルで活性化したヒト好中球細胞によるコレステロール酸化物生成機構について検討を行った。セコステロール-Aは、様々な活性酸素種の中でも特にオゾン特異的なコレステロール酸化によって生成することが報告されており、また、ヒト好中球によるセコステロール-Aの生成がオゾン消去剤の存在下で阻害されることから、活性化されて酸化バースト状態にあるヒト好中球は、オゾン様活性酸素を生成していると考えられた。また、ミエロパーオキシダーゼ (MPO) 欠損マウスから調製した好中球を活性化して実験に供した場合、野生型のマウスからの好中球に比べて、セコステロール類の生成が著しく減少していた。これらの結果は、好中

球のオゾン様活性酸素によるセコステロール類の生成には、MPOが関与している可能性を示唆している。

飽和脂肪酸 (パルミチン酸C16:0) および不飽和脂肪酸 (オレイン酸C18:1, リノール酸C18:2) コレステロールエステルをオゾン酸化し、生成物を単離・構造決定したところ、飽和脂肪酸コレステロールエステルからは、5, 6位の二重結合が開裂したエステル型セコステロールが主に生成することを見出した。一方、不飽和脂肪酸 (オレイン酸C18:1, リノール酸C18:2) コレステロールエステルからは、既に報告されている9-オキシノナノイルコレステロールの他に、9-オキシノナノイルを含むセコステロール類を新規同定した。次に、当研究室において開発したダンシルヒドラジン誘導体化法を用いて、エステル型セコステロール類の新規分析法 (LC-MS/MS) を確立した。この分析法を用いて、6名の健康な男女の血液から調製したLDLの分析を行ったところ、全サンプルから9-オキシノナノイルセコステロール-Aおよび-Bを検出した。その濃度は、それぞれ平均16.5および11.3 pmol/LDL mgタンパク質であり、遊離型セコステロール-Aおよび-Bの1/2~1/5の濃度であった。

次に、9-オキシノナノイルセコステロール-Aおよび-Bの細胞毒性を検討するため、化合物をヒト白血病細胞HL-60へ曝露し、24および72時間後の細胞生存率を測定した。その結果、これらの化合物は、濃度・時間依存的に細胞生存率を減少させ、遊離型セコステロール-Aおよび-Bと同程度の強い細胞毒性を示すことが明らかにな

った。また、遊離型セコステロール-Aは、血管内皮型および神経型一酸化窒素合成酵素を強く阻害することが明らかになった。一酸化窒素の合成阻害は、動脈硬化症、心筋梗塞などを発症させる可能性がある。これらの結果は、反応性の高いセコステロールが生体成分のタンパク質や核酸と反応して、容易に付加体を生成する可能性を示している。そこで、現在、セコステロール類と核酸の反応で生じる付加体を単離・精製し、その構造の解析を行っている。また、タンパク質の付加体を認識し得るモノクローナル抗体の作成を試みている。

現在、がん、動脈硬化症、アルツハイマー症など酸化ストレスが亢進している患者からの血液について、遊離型およびエステル型セコステロールの分析を進めており、生活習慣病の早期発見、診断のバイオマーカーとしての有効性を検討するための基礎データを収集している。

D. 考察

セコステロール-Aは、様々な活性酸素種の中でも特にオゾンに特異的なコレステロール酸化によって生成することが報告されており、また、オゾン消去剤がヒト好中球によるセコステロール-Aの生成を阻害することから、酸化バースト状態にあるヒト好中球は、オゾン様活性酸素を産生していると考えられた。このオゾン様活性酸素は、遊離あるいは脂肪酸エステル型のコレステロールを酸化して、セコステロール誘導体を生成する。特に、飽和脂肪酸（パルミチン酸C16:0）および不飽和脂肪酸（オレイン酸C18:1, リノール酸C18:2）コレステロールエステルのオゾン酸化により、

9-オキシノナノイルセコステロール類を含むエステル型セコステロールを新規同定した。9-オキシノナノイルセコステロール類は、ヒトLDLコレステロール中に微量に存在するが、酸化ストレスの亢進した条件下では生成の増加が考えられる。また、セコステロール類は、細胞に対する毒性が強く、かつ、血管内皮型および神経型一酸化窒素合成酵素を強く阻害することから、動脈硬化症、アルツハイマー症、がんなど酸化ストレスの亢進と関連している疾病の発症・進展に関与している可能性がある。

E. 結論

ヒト好中球は、酸化バースト状態で、ミエロパーオキシダーゼ依存的にオゾン様活性酸素を生成し、遊離あるいは脂肪酸エステル型のコレステロールを酸化して、セコステロール誘導体を生成することを明らかにした。これらのセコステロール誘導体は、ヒトLDLコレステロール中に微量ながら存在し、かつ、強い細胞毒性を示し、また、シグナル分子NOの生成を阻害することから、今後、がん、動脈硬化症、アルツハイマー症など酸化ストレスが亢進している患者からの血液について、遊離型およびエステル型セコステロールの分析を進め、生活習慣病の早期発見、診断のバイオマーカーとしての有効性を検討していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomono S, Miyoshi N, Shiokawa H, Iwabuchi T, Aratani Y, Higashi T, Nukaya H, and Ohshima H.

- Formation of cholesterol ozonolysis products in vitro and in vivo through a myeloperoxidase-dependent pathway. *J Lipid Res*, 52: 87-97, 2011.
2. Miyoshi N, Nagasawa T, Mabuchi R, Yasui Y, Wakabayashi K, Tanaka T, Ohshima H.: Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam *sanyaku* and its constituent diosgenin. *Cancer Prev Res*, 2011, in press.
 3. Ohshima H and Miyoshi N. Ingested Nitrate and Nitrite: Beneficial to Human Health? *Genes and Environm*, 32: 43-52, 2010.
 4. Miyoshi N, Wakao Y, Tomono S, Tatemichi M, Yano T, and Ohshima H. The enhancement of the oral bioavailability of γ -tocotorienol in mice by γ -cyclodextrin inclusion. *J Nutr Biochem*, 2011, in press.
 5. Lai YL, Aoyama S, Nagai R, Miyoshi N, and Ohshima H. Inhibition of L-Arginine Metabolizing Enzymes by L-Arginine-derived Advanced Glycation End Products. *J Clin Biochem Nutr* 46: 177-85, 2010.
 6. Lai YL, Tomono S, Miyoshi N, and Ohshima H. Inhibition of endothelial- and neuronal-type, but not inducible-type, nitric oxide synthase by the oxidized cholesterol metabolite secosterol aldehyde: Implications for vascular and neurodegenerative diseases. *J Clin Biochem Nutr*, 2011, in press.
- 2.学会発表
 1. 戸井口 恭子、三好 規之、東 達也、糠谷 東雄、高橋 智、若林 敬二、大島 寛史、乳がんのリスクマーカーとしての尿中のカテコールエストロゲン-DNA 付加体の分析、第 39 回日本環境変異原学会、2010 年
 2. 三好規之、長澤友樹、安井由美子、田中卓二、大島寛史、ヤム類およびヤムイモ成分ジオスゲニンはAOM/DSS誘発マウス大腸発がんを抑制する、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年
 3. 鈴木啓子、三好規之、糠谷東雄、大島寛史、アセトアルデヒドを消去する食品及び食品成分の探索、第 54 回日本食品科学工学会、2010 年
 4. 長澤友樹、馬淵良太、三好規之、田中卓二、大島寛史、ヤムイモ成分による大腸がんの化学予防、がん予防学術大会、2010 年
 5. 岩崎希、三好規之、伴野勸、大島寛史、エステル型コレステロールのオゾン酸化物のHL-60細胞に対する細胞毒性作用、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010 年
 6. 伴野勸、三好規之、荒谷康昭、大島寛史、ミエロペルオキシダーゼによるsecosterol型コレステロール酸化物の生成、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010 年
 7. 三好規之、伊藤萌、伴野勸、東達也、大島寛史、Secosterol型コレステロール酸化物のLC-MS/MSによる高感度検出法の

開発、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010 年

8. Lai YL, Tomono S, Miyoshi N, and Ohshima H., Secosterol-A, an oxidized cholesterol metabolite, may contribute to atherosclerosis and neurodegenerative diseases through inhibition of eNOS and nNOS, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, Japan, 2010.
9. Ohata M, Lai YL, Aoyama S, Miyoshi N, Fujiwara A, Kanazawa H, and Ohshima H., Alteration in activity and expression of renal NOS and dimethylarginine dimethylaminohydrolase in type 2 diabetic rats, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, Japan, 2010.
10. 矢野友啓、若尾陽平、三好規之、太島寛史、シクロデキストリン包接によるトコトリエノールのバイオアベイラビリティ向上効果、第 62 回日本ビタミン学会、2010 年

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業(国際医学協力研究事業))
分担研究報告書

遺伝子改変マウスを用いた発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究

研究分担者 續 輝久 九州大学 大学院医学研究院 教授

研究要旨

電離放射線や環境中の化学物質および生体内での通常の代謝活動によって生じる活性酸素によって DNA やその基質であるヌクレオチドは常に酸化されている。このような酸化ストレスによって生じる酸化 DNA 損傷は生体において自然突然変異を引き起こし、自然発がんの主要な原因と考えられている。私達は酸化剤 KBrO_3 をマウスに飲水投与することにより消化管における酸化ストレス誘発発がん実験系を開発し、酸化ストレス誘発発がんを制御する(遺伝)因子の検索・同定を行っている。突然変異や自然発がんの抑制に関与している *Mutyh*, *Ogg1*, *Trp53* 遺伝子をそれぞれ欠損したマウスを用いて、酸化ストレス誘発発がん実験を行った結果、*Mutyh* 遺伝子欠損および *Trp53* 遺伝子欠損マウスでの小腸上皮性腫瘍の発生頻度は著しく上昇していたのに対し、*Ogg1* 遺伝子欠損マウスではそのような顕著な上昇は認められなかった。以前、私達は KBrO_3 誘発突然変異実験を行い、*Mutyh* および *Ogg1* 遺伝子欠損マウスではそれぞれ同程度に G:C → T:A トランスポージョン型変異が顕著に増加することを見いだしている。P53 は DNA 損傷による細胞死誘導に関与し、また MUTYH が酸化 DNA 損傷により引き起こされる細胞死に関わっていることが報告されている。これらの知見と今回の実験結果とを合わせて考えると、酸化ストレス誘発消化管発がんの抑制には、酸化 DNA 損傷に起因する突然変異の抑制よりも細胞死の制御が大きく関与していることが推測される。

A. 研究目的

遺伝子欠損マウスを用いて、これまでに *MUTYH* 遺伝子に欠損を持つ MAP 患者では酸化ストレスに起因する自然突然変異が大腸腺腫症を引き起こすことを示した。同時に、酸化剤である KBrO_3 の飲水投与による消化管での酸化ストレス誘発発がん系を確立した。本研究では、この系を展開して、p53 による酸化ストレスに起因する発がんの抑制に果たす役割を解明し、大腸がんの

発がん機序との関係を考察する。

B. 研究方法

本研究では、ゲノムの守護神としてアポトーシス誘導および修復遺伝子の発現調節に関与する p53 を欠損したマウスについて、1) KBrO_3 飲水投与による酸化ストレス誘発発がん解析、2) 酸化ストレス負荷条件下における DNA 修復関連遺伝子の発現解析、3) 酸化ストレス誘発消化管腫瘍を用

いた癌関連遺伝子の変異解析を行うことを目指す。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、九州大学動物実験委員会の承認を得て、九州大学動物実験規則に従い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。

C. 研究結果

私達は、活性酸素による DNA 損傷と自然突然変異及び発がんとの関連を調べ、その過程を分子レベルで解明するために、各種修復系遺伝子欠損マウスの消化管での酸化ストレスで誘発される突然変異・発がんの解析を進めている。今回、野生型、p53 の遺伝子のヘテロ欠損、ホモ欠損マウスそれぞれ5匹を用いて消化管での KBrO₃ で誘発される発がんの解析を行い、それぞれの遺伝子型マウス個体当りの平均腫瘍数は 1.0, 2.2, 9.2 であった。また、現在行っている p53 ホモ欠損マウスに誘発された腫瘍組織の *Cttnb1* 遺伝子の解析の結果、*Mut yh* や *Ogg1* 遺伝子欠損マウスとは異なり、これまでに G→A 変異を 2 例見いだしている。突然変異の抑制に関与している OGG1 を完全欠損したマウスにおいて KBrO₃ 誘発される平均腫瘍数は野生型の約 2 倍であり、酸化 DNA の修復酵素である OGG1 よりも p53 の方が、酸化ストレス誘発発がんの抑制に大きな役割を果たしている可能性を示唆する結果を得た。

D. 考察

突然変異や自然発がんの抑制に関与している *Mut yh*, *Ogg1*, *Trp53* 遺伝子をそれぞれ欠損したマウスを用いて、KBrO₃ 誘発発

がん実験を行った結果、*Mut yh* および *Trp53* 遺伝子欠損マウスでの小腸上皮性腫瘍の発生頻度は著しく上昇していたのに対し、*Ogg1* 遺伝子欠損マウスではそのような顕著な上昇は認められなかった。KBrO₃ 誘発突然変異実験の結果では、*Mut yh* および *Ogg1* 遺伝子欠損マウスではそれぞれ同程度に G→T 変異が顕著に増加するが、これまでのところ *Trp53* 欠損マウスで G→T 変異の上昇は認められていない。p53 は DNA 損傷による細胞死誘導に関与し、また MUTYH は酸化 DNA 損傷により引き起こされる細胞死に関わっていることが報告されている。これらの知見と今回の実験結果とを合わせて考えると、酸化ストレス誘発消化管発がんの抑制には、酸化 DNA 損傷による突然変異の抑制よりも細胞死誘導が大きく関与していることが推測される。

E. 結論

酸化剤 KBrO₃ をマウスに飲水投与することにより消化管における酸化ストレス誘発発がん感受性を検討する実験系を用いて、*Trp53* 遺伝子を欠損したマウスを用いて酸化ストレス誘発発がん実験を行った結果、*Trp53* 遺伝子欠損マウスでの小腸上皮性腫瘍の発生頻度は著しく上昇していた。従って、ゲノムの守護神としてアポトーシス誘導および修復遺伝子の発現調節に関与する p53 は酸化ストレスによる消化管発がんの抑制に重要な働きをしていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuzuki T, Piao J, Isoda T, Sakumi K,

- Nakabeppu Y, Nakatsu Y. Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice (Abstract). *Health Physics*, 100: 293-294, 2011.
2. Sagata N, Iwaki A, Aramaki T, Takao K, Kura S, Tsuzuki T, Kawakami R, Ito I, Kitamura T, Sugiyama H, Miyakawa T, Fukumaki Y. Comprehensive behavioral study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function. *Genes, Brain Behavior*, 9: 899-909, 2010.
3. Nakamura T, Meshitsuka S, Kitagawa S, Abe N, Yamada J, Ishino T, Nakano H, Tsuzuki T, Doi T, Kobayashi Y, Fujii S, Sekiguchi M, Yamagata Y. Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base. *J. Biol. Chem.*, 285: 444-452, 2010.
2. 学会発表
1. Tsuzuki T, Piao J, Isoda T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nakatsu Y, Prevention of Oxidative Mutagenesis by DNA Repair Enzymes: Implication in Human Cancer, 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens (ACEM): Harmonize Gene & Environment, Pattaya, Thailand, 2010.
2. 大野みずき, 作見邦彦, 續 輝久, 中別府雄作, 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010 年
3. 中西恵美, 大野みずき, 中津可道, 續 輝久, 腸管と精巣における放射線誘発 DNA 損傷とその修復機構の解析, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010 年
4. 大野みずき, 中西恵美, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作, 續 輝久, 酸化損傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響, 日本環境変異学会第 39 回大会, 2010 年
5. 大野みずき, 中西恵美, 中津可道, 續 輝久, 低 LET 放射線による核酸の損傷とその修復機構: 腸管と精巣における解析, 日本放射線影響学会第 53 回大会, 2010 年
6. 高橋富美, 吉原達也, 中津可道, 續 輝久, 中別府雄作, 笹栗俊之, 酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年
7. 日高真純, 高木康光, Teik-How Lim, 中津可道, 續 輝久, 佐野しおり, 坂上竜資, 関口睦夫, 哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死, 日本遺伝学会第 82 回大会, 2010 年
8. Tsuzuki T, Piao J, Isoda T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nakatsu Y, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, Workshop: Biological effects of low-level exposure to ionizing radiation, health risks and clinical consequences, Richland, WA,

USA, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

がん高頻度発生地での分子疫学

研究分担者 梶村春彦 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨

ヒト組織中に変異や細胞死を起こす可能性のある修飾核酸について、どのようなものが、どのくらいあるのかについての基礎 data を得るために、ヒト剖検時に得られた各種臓器、心、肺、肝、腎、腸などから DNA を抽出し、マイクロコッカスの nuclease で処理後、LC-MSMS により、m/z 別に化合物種を分離した。標準品として、既知の DNA 付加体を、また量的妥当性については、生成機序の似ている付加体同士の相関、あるいは広く存在し、量的な情報も多い付加体 (8-OHdG) の bp あたりの個数などを比較勘案した。標準品がないものが多く、多数あるピークのうち同定できている付加体はごく一部であるが、過酸化由来と思われる DNA 付加体を同定することが可能であった。これらの一部、4-ONE と 4-OHE に関連する付加体 HεdC, HεdG, BεdC, BεdG については合成して、oligonucleotide の中に 1 塩基導入できた。これを基質として 8 種類の塩基除去修復酵素 OGG1, NTH1, MUTYH, NEIL1, MPG, UNG, TDG, SMUG1 について大腸菌でタンパクを作成し、上記基質に対し、修復能があるかどうかをゲルシフトアッセイで検討した。

A. 研究目的

環境中に存在する化学物質は、種々の経路によって人体にはいり、とくに DNA と共有結合をした場合、変異、細胞死など種々の変化をきたし、結果としてがんをはじめとする多くの疾患の原因となる。したがって、ヒトの側からみると、もっとも近位にある ultimate, proximal lesion は核酸に起こる傷ということになる。本研究は、人体に存在する、種々の DNA 付加体をできるだけ定量的に網羅的に同定し、その生物学的性格たとえば変異原性、生体の側からは

その修復担当分子や修復の個体差などを明らかにする。

B. 研究方法

剖検組織から、酸化防止剤 Deferoxamine Mesylate 存在下で DNA を抽出する。2-propanol1 で沈殿させ、また、クロロホルムで除タンパク、酢酸ナトリウムとエタノールで沈殿させる。DNA を micrococcal nuclease と phosphodiesterase で処理後、さらに alkaline phosphatase 処理を行い、Quattro

Ultima Pt triple stage 4 重極 mass spectrometer と LC system を用いて adductome 解析を行う。陽イオン化した付加体から、2'デオキシリボースをのぞいたものを m/z 別に peak をみていく。また、陽性コントロールとして、種々の過酸化脂質由来化合物から合成した付加体を同時に流して、のちに、概量に比例した直径の円を、m/z を縦軸に、LC の retention time を横軸にしたグラフをつくり、adductome map を作成し、臓器別の adductome profile をつくってみた。

さらに、合成可能であると判断された H_{ed}C, H_{ed}G, B_{ed}C, B_{ed}G 付加体については、アミダイト化合物のかたちで、自ら化学合成を行い、20bp のオリゴヌクレオチドのなかに一つを挿入して基質とした。

塩基除去修復酵素は、MutYH の既知の mis-sense 変異 product の大腸菌による作成、精製、kinetics を含む機能解析を行いそのシステムを点検したあと(Goto M et al. Hum Mut 2010)、OGG1, NTH1, MUTYH, NEIL1, MPG, UNG, TDG, SMUG1 について、タンパクを精製し、まず、いくつか修復についての論文のある ethenoadduct, (εdA, ethenodeoxy adenine など)について、修復されるかどうかを検討した。

修復の gel shift assay は、付加体を sense に入れたものと anti-sense に入れたものを基質として用意し、放射性ラベルは sense のほうに入れた。εdA や εdC は既報どおり、MPG や TDG などによって修復をみること

ができ、方法論を確立することができた。

(倫理面の配慮)

これらのヒト検体を扱う研究に関しては、浜松医科大学ゲノム解析倫理委員会、医の倫理委員会にて、ヒト固形腫瘍の遺伝環境表現系相関として審議のうえ承認されている。

C. 研究結果

ヒトの体内には、多数の DNA 付加体が存在し、未知のものも多い。とくに今回は脂質過酸化由来の付加体が同定され、その一部にはすでに変異原性が証明されているものもある。また、一部は今回はじめて同定されたものもある。これらの変異原性については、がんをはじめとする DNA の変異に由来する疾患の発生機序の解明につながると国際誌の editorial にも論評されている。

いっぽう、ヒト個体の側でこれらの付加体がどのようにあつかわれるか(修復、細胞の壊死など)ほとんどわかっておらず、塩基除去修復酵素の一部がこれらの修復に関与することがはじめて示された。

D. 考察

Adductome map はひろく世界の種々の場所でおこる疾患の背景となる組織を用いることにより、その地域の疾病の原因や予防へのつながりとなるものである。実際にわれわれは、中国における胃粘膜組織と本邦の胃粘膜組織(ともに胃がん発症例)の adductome map も作成、検証しつつあり、

共通したあるいは独特の DNA 付加体の同定をめざしている。

E. 結論

多数の DNA 付加体の同定と環境要因との関連付けは、環境によるヒト疾病の原因や、予防に重要な作業であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Goto M, Shinmura K, Nakabeppu Y, Tao H, Yamada H, Tsuneyoshi T, and Sugimura H. Adenine DNA glycosylase activity of 14 Human MutY homolog (MUTYH) variant proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer. Hum Mutat, 31:E1861-E1874, 2010.
2. Chou PH, Kageyama S, Matsuda S, Kanemoto K, Sasada Y, Oka M, Shinmura K, Mori H, Kawai K, Kasai H, Sugimura H, and Matsuda T. Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissues. Chem Res Toxicol, 23: 1442-1448, 2010.

2. 学会発表

1. 梶村春彦、五十嵐久喜、名倉聖子、山田英孝、清瀬慎一郎、陶 弘、谷岡書彦、前多松喜、新村和也、森 弘樹、小澤亨

史、病理組織標本を用いたFISH-CHIP解析、第69回日本癌学会学術総会、2010年

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Tsuzuki T, Piao JS, Isoda T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nakatsu Y	Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of DNA repair-deficient mice	Nishimura S, Loeb LA, Masutani M, Nakagama H, Sekiya T	International Proceedings: The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "DNA Repair and Cancers"	Princess Takamatsu Cancer Research Fund	Tokyo	2010	28-34

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuchiya N, Nakagama H	MicroRNA, SND1, and alterations in translational regulation in colon carcinogenesis.	Mutat Res	693	94-100	2010
Matsubara S, Takasus S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y	Induction of glandular stomach cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile.	Int J Cancer	In press		2011
Hasei T, Ohno A, Tsukuda R, Inoue T, Watanabe T,	Determination of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene in tea leaves as a possible exposure source and in human hair as a biomarker using a two-dimensional HPLC system	J Health Sci	57	53-59	2011
Tomono S, Miyoshi N, Shiokawa H, Iwabuchi T, Aratani Y, Higashi T, Nukaya H, Ohshima H	Formation of cholesterol ozonolysis products in vitro and in vivo through a myeloperoxidase-dependent pathway	J Lipid Res	52	87-97	2011
Tsuzuki T, Piao J, Isoda T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nakatsu Y	Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice.	Health Phys	100	293-294	2011