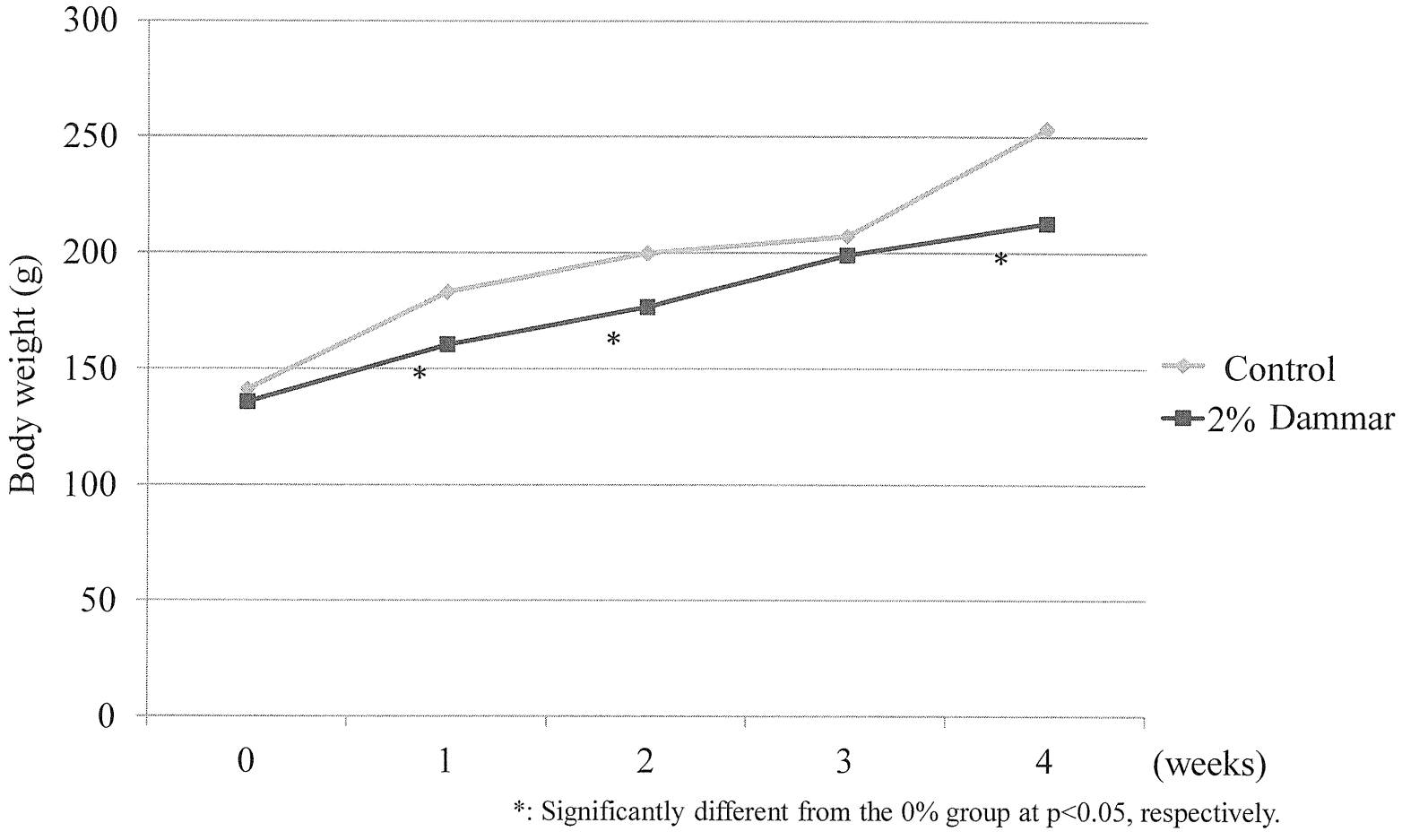

Fig.4 Body Weight Curves of Experimental 1

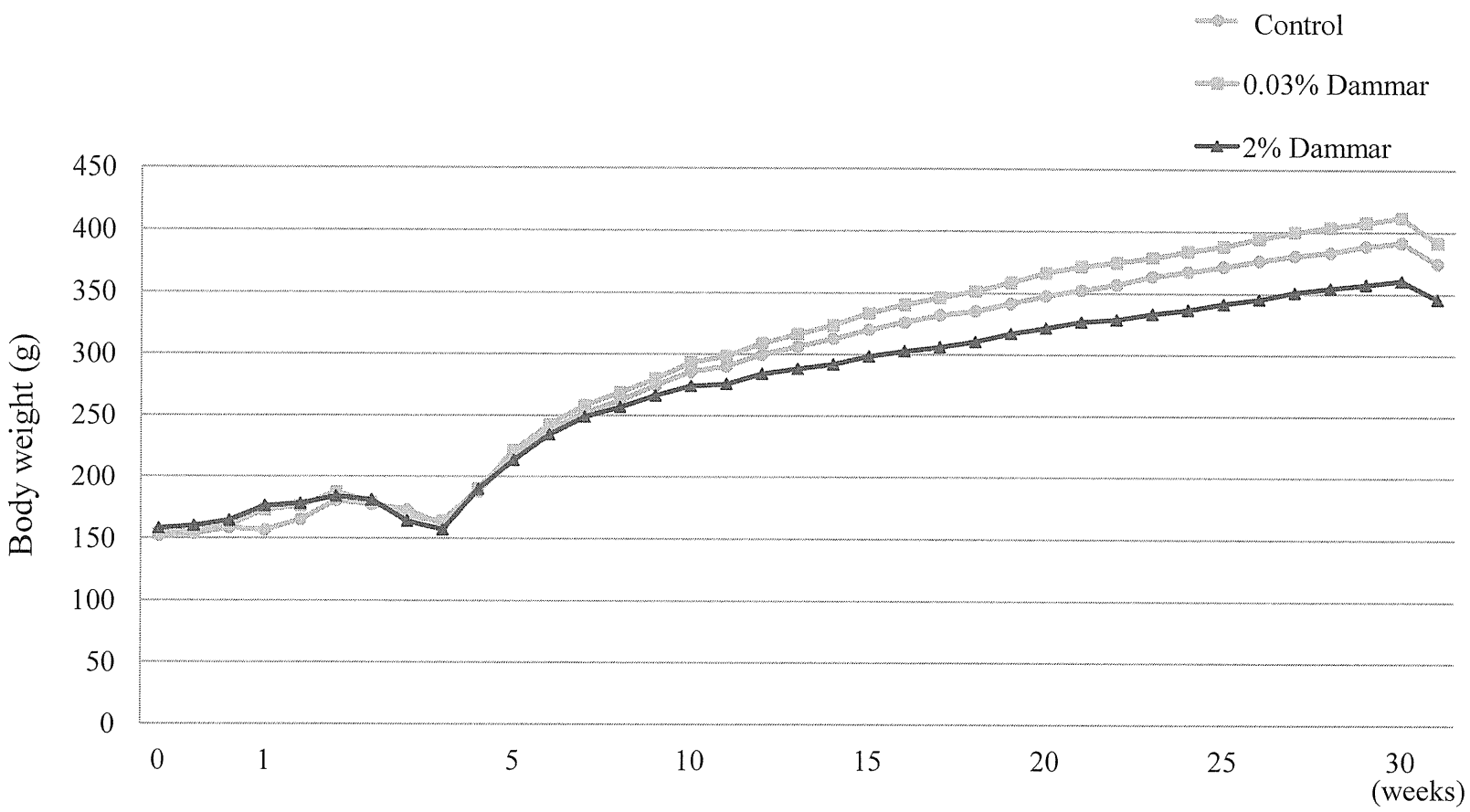

Fig.5 Body Weight Curves of Experiment 2

Table 1. Average Food Consumptions and Total Intake of Dammar Resin of Experimental 1

Group	Dammar resin	No. of rats	Food consumption (g/rat day)	Total intake of Dammar Resin (g/rat)
1	0%	5	13.69±0.77	–
2	2%	6	11.17±0.51	6.25±0.29

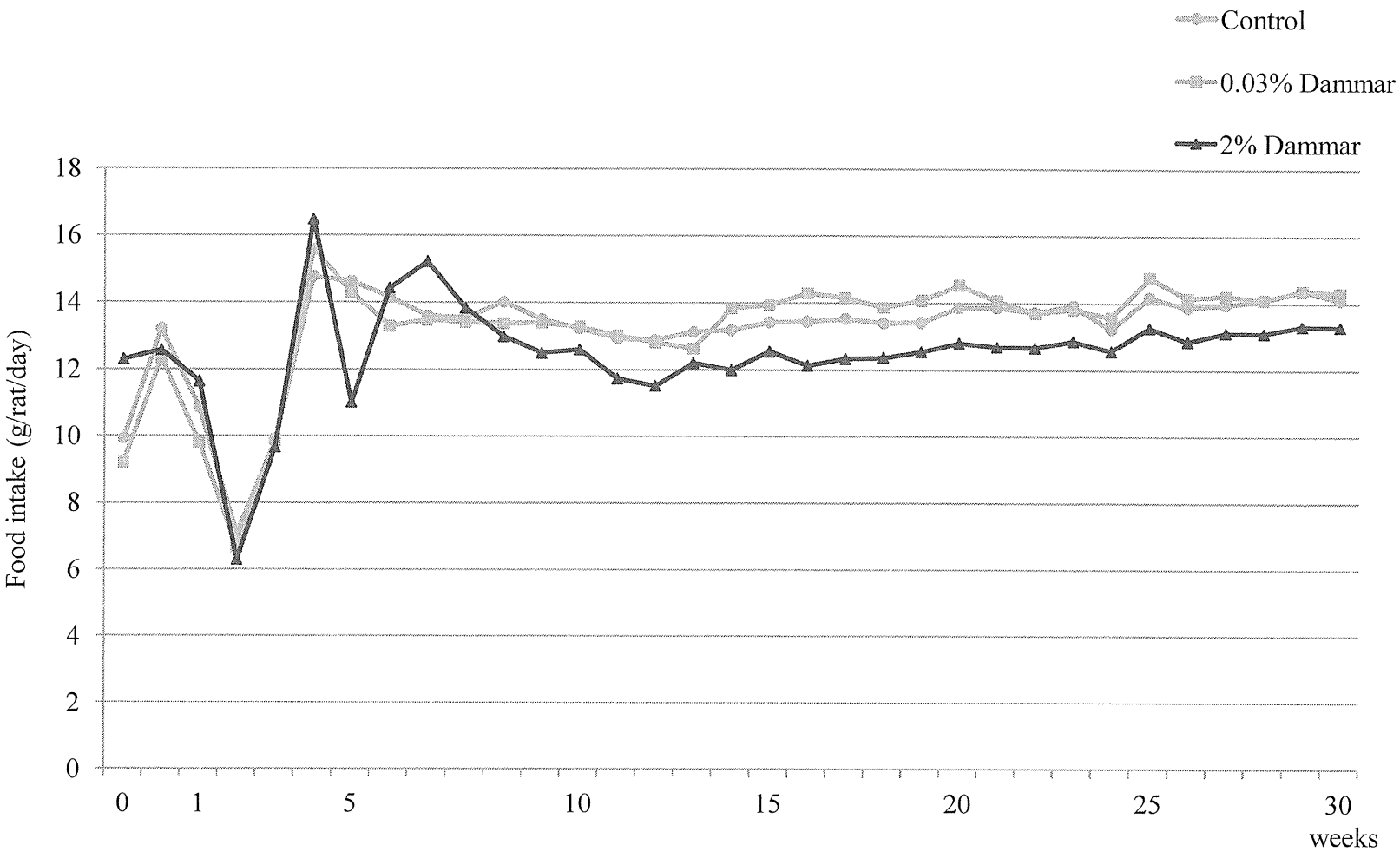

Fig.6 Food consumptions of Experiment 2

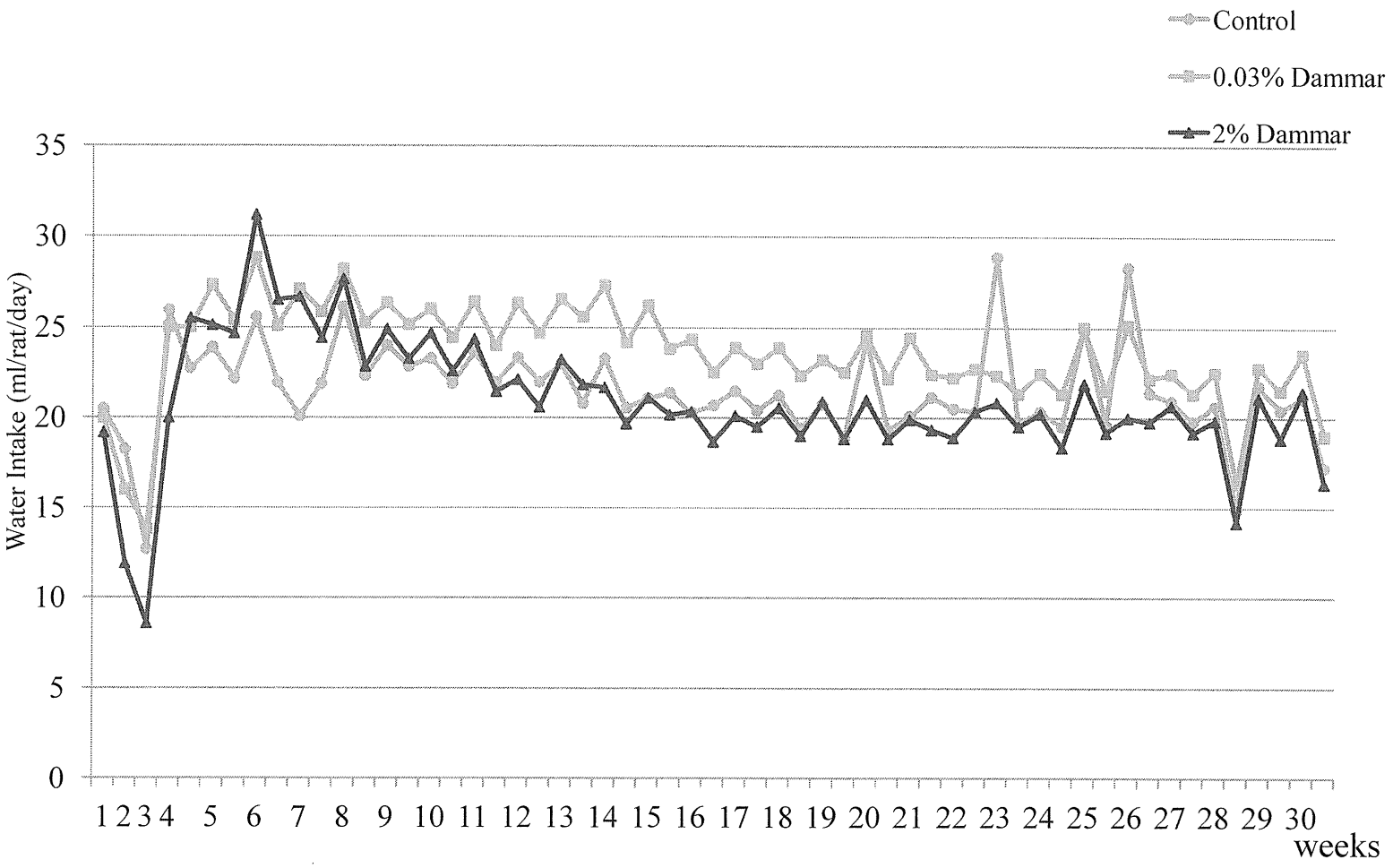

Fig. 7 Water Intake (ml/rat/day) of Experiment 2

Table 2. Average Food and Water Consumptions and Total intake of Dammar Resin of Experiment 2

Dammar resin(%)	No. of rats	Food consumption (g/rat/day)	Total intake of Dammar Resin	Water intake (ml/rat/day)
0	14	13.63 ± 0.52	0	21.09 ± 1.37
0.03	15	13.75 ± 0.34	0.75 ± 0.02226	23.14 ± 0.57*
2	15	12.90 ± 0.48*	46.45 ± 1.76976	20.41 ± 1.35

*: Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 3. Organ Weights (g) of Experimental 1

Organ		Dammar resin (%) 0 (N=5)	Dammar resin (%) 2 (N=6)
Lung	Absolute	0.94 ± 0.03	0.87 ± 0.07
	Relative	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.02
Heart	Absolute	0.79 ± 0.05	0.75 ± 0.04
	Relative	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Liver	Absolute	10.45 ± 0.41	9.57 ± 0.63*
	Relative	4.01 ± 0.25	4.23 ± 0.08
Spleen	Absolute	0.54 ± 0.32	0.50 ± 0.04
	Relative	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.08
Kidney	Absolute	1.75 ± 0.04	1.59 ± 0.04*
	Relative	0.67 ± 0.04	0.70 ± 0.03

*: Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 4. Organs Weights of Experiment 2

		Dammar resin (%)		
		0	0.03	2
	Organs	N=14 (adrenals; N=13)	N=15	N=15
Absolute (g)	Brain	1.94 ± 0.05	1.99 ± 0.08	1.94 ± 0.07
	Thymus	0.12 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.14 ± 0.04
	Lungs	1.29 ± 0.13	1.36 ± 0.13	1.20 ± 0.08
	Heart	0.93 ± 0.06	0.97 ± 0.07	0.90 ± 0.06
	Spleen	0.69 ± 0.04	0.70 ± 0.05	0.64 ± 0.05 *
	Liver	8.66 ± 0.63	9.11 ± 0.47	9.56 ± 0.54 *
	Adrenals	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
	Kidneys	2.10 ± 0.16	2.14 ± 0.15	2.07 ± 0.22
	Testes	2.70 ± 0.16	2.69 ± 0.28	2.83 ± 0.19
	Salivary glands	0.58 ± 0.09	0.62 ± 0.05	0.54 ± 0.04
Relative(g/100g B.W.)				
	Brain	0.52 ± 0.03	0.51 ± 0.02	0.56 ± 0.02 *
	Thymus	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	Lungs	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.02
	Heart	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01
	Spleen	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01
	Liver	2.31 ± 0.07	2.33 ± 0.08	2.77 ± 0.10 *
	Adrenals	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00 *
	Kidneys	0.56 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.60 ± 0.07
	Testes	0.72 ± 0.04	0.69 ± 0.08	0.82 ± 0.05 *
	Salivary glands	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01

*: Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 5. Hematological Data of Experiment 2

Item		Dammar resin (%) 0 (N=14)	0.03 (N=14)	2 (N=14)
RBC	($\times 10^4/\mu L$)	946 ± 16	953 ± 15	930 ± 19 *
Hb	(g/dL)	15.8 ± 0.3	15.7 ± 0.3	15.6 ± 0.2
Ht	(%)	48.9 ± 1.6	47.5 ± 1.0 *	47.5 ± 1.1 *
MCV	(fL)	51.7 ± 1.0	50.0 ± 0.9 *	51.1 ± 0.8
MCH	(pg)	16.9 ± 0.4	16.6 ± 0.5	17.0 ± 0.0
MCHC	(g/dL)	32.4 ± 0.9	32.9 ± 0.6	32.9 ± 0.3
PLT	($\times 10^4/\mu L$)	54.3 ± 5.8	53.2 ± 7.9	59.0 ± 6.3
WBC	($\times 10^3/\mu L$)	48.4 ± 8.4	50.9 ± 7.3	41.1 ± 6.8 *

*: Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 6. Serum Biochemical Data of Experiment 2

Item		Dammar resin (%) 0 (N=14)	0.03 (N=14)	2 (N=15)
TP	(g/dL)	6.8 ± 0.2	6.6 ± 0.3	7.2 ± 0.2 *
Alb	(g/dL)	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.8 ± 0.1 *
A/G		2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1
T-Bil	(mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01*
T-Cho	(mg/dL)	61.9 ± 3.5	65.1 ± 8.1	79.1 ± 7.1 *
GLU	(mg/dL)	160 ± 16	192 ± 29 *	154 ± 14
TG	(mg/dL)	177.6 ± 40.1	165.2 ± 36.0	97.7 ± 24.7*
BUN	(mg/dL)	25.0 ± 0.8	26.8 ± 1.8*	26.9 ± 1.1 *
Cre	(mg/dL)	0.39 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.01 *
Ca	(mg/dL)	10.5 ± 0.2	10.3 ± 0.2 *	10.6 ± 0.2
IP	(mg/dL)	4.4 ± 0.5	4.9 ± 0.4	4.3 ± 0.5
PL	(mg/dL)	119 ± 9.0	124 ± 12.0	125 ± 10.9
Na	(mEQ/L)	141 ± 1.7	140 ± 1.5	140 ± 1.0
Cl	(mEQ/L)	104.4 ± 1.5	99.0 ± 23.9	105.8 ± 1.3
K	(mEQ/L)	5.0 ± 0.4	5.2 ± 1.2	5.7 ± 0.4 *
AST	(IU/L)	123.1 ± 21.9	122.4 ± 30.2	67.0 ± 8.8 *
ALT	(IU/L)	85.4 ± 12.0	83.3 ± 19.7	49.9 ± 5.3 *
ALP	(IU/L)	388.4 ± 34.7	356.9 ± 33.5	358.6 ± 34.6
γ–GTP	(IU/L)	< 3	< 3	< 3

*: Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 7. GST-P Positive Foci in the Liver of Experiment 2

Dammar resin (%)	No. of rats	GST-P Positive Foci (>100μm)	
		No./cm^2	Area(mm^2/cm^2)
0	14	1.706 ± 0.903	0.086 ± 0.044
0.03	15	2.147 ± 2.585	0.115 ± 0.098
2	15	5.232 ± 3.128 *	0.281 ± 0.193 *

*: Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 8. ACF and MDF in the colon

Dammar resin (%)	No. of rats	Total No. of ACF/colon	No. of ACF containing of more than four Acs
0	14	171.07 ± 48.70	69.36 ± 20.60
0.03	15	185.27 ± 47.74	74.73 ± 24.79
2	15	187.07 ± 67.06	74.47 ± 26.34

Dammar resin (%)	No. of rats	Total No. of MDF/colon	No. of MDF containing of more than four Acs
0	14	33.00 ± 9.66	5.43 ± 1.55
0.03	15	30.53 ± 9.68	5.87 ± 2.56
2	15	34.00 ± 6.80	5.67 ± 1.88

ACF: aberrant crypt foci

MDF: mucin-depleted foci

Acs: aberrant crypts

Table 9. Summary of Preneoplastic or Neoplastic Lesions-1

	Group No.	1	2	3
	Dammar resin (%)	0	0.03	2
Organs and Findings	No. of rats	14	15	15
Pituitary				
Adenoma, pars distalis		0	1	0
Thyroid				
Hyperplasia, C-cell		1	0	0
Hyperplasia, follicular cell		12	15	14
Adenoma, follicular cell		12	13	10
Carcinoma, follicular cell		8	8	7
Nasal cavity				
Hyperplasia, olfactory epithelium		6	9	10
Hyperplasia, respiratory epithelium		1	0	0
Adenoma, septal gland		1	0	0
Adnoma, respiratory epithelium		1	0	2
Olfactory neuroblastoma		3	7	2
Lung/bronchial				
Hyperplasia, bronchiolo-alveolar		14	15	15
Adenoma, bronchiolo-alveolar		8	9	6
Adenocarcinoma, bronchiolo-alveolar		2	1	0
Carcinoma, adenosquamous		0	1	0
Carcinoma, squamous cell		1	0	0
Tongue				
Hyperplasia, squamous cell		1	0	0
Esophagus				
Hyperplasia, squamous cell		9	4 *	3 *
Jejunum				
Adenoma		0	1	0

* : Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 9. Summary of Preneoplastic or Neoplastic Lesions-2

	Group No.	1	2	3
	Dammar resin (%)	0	0.03	2
Organs and Findings	No. of rats	14	15	15
Colon				
Focal atypical hyperplasia		2	1	1
Hyperplasia		0	1	0
Reactive hyperplasia		1	0	0
Adenocarcinoma		2	1	0
Mucinous adnocarcinoma		2	1	1
Liver				
Foci (area) of cellular alteration		13	15	14
Carcinoma, hepatocellular		0	0	1
Kidney				
Atypical hyperplasa, tubule cell		12	15	11
Hyperplasia, transitional cell		0	0	1
Adenoma, tubule cell		8	7	4
Carcinoma, transitional cell		1	1	1
Carcinoma, tubule cell		2	3	1
Nephroblastoma		5	5	0 *
Urinary bladder				
P/N hyerplasia,transitonal cell		5	7	10
Simple hyperplasia, transitional cell		13	14	13
Papilloma, transitional cell		7	7	6
Carcinoma, transitional cell		2	0	0
Prostate				
Fibrosarcoma		0	1	0
Prep./ Clit. gland			[1]a	
Adenoma			1	
Mammary gland				
Adenoma		0	1	0

a : Numbers in square bracket are for animals examined microscopically.

* : Significantly different from control group at $P<0.05$.

Table 10. Summary of Congenital or Non-neoplastic Lesions

	Group No.	1	2	3
	Dammar resin (%)	0	0.03	2
Organ and Findings	No. of rats	14	15	15
Parathyroid				
Multinucleated syncytial giant cells/(2)a		1	0	0
Adrenal				
Cyst/(1)a		0	0	1
Nasal cavity				
Inflammation/(2)a		0	1	0
Inflammation/(3)a		3	0	0
Colon				
Cellular infiltration, inflammatory cell/(2)a		1	0	0
Pancreas				
Atrophy, acinar cell/(1)a		2	1	1
Liver				
Cellular infiltration, lymphocyte/(1)a		0	3	1
Cyst, biliary/(2)a		0	0	1
Cystic degeneration/(2)a		0	0	1
Fatty change/(2)a		0	2	0
Kidney				
Atypical tubules/(1)a		14	15	13
Urinary bladder				
Cellular infiltration, lymphocyte/(1)a		3	0	1
Necrotizing inflammation/(2)a		0	1	0

a : Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion : (1) Minimal (2) Slight (3) Moderate (4) Marked (5) Severe

Table 11. Total Number and Multiplicity of Hyperplastic or Neoplastic Lesions in the Thyroid

Dammar resin (%)	No. of rats	Hyperplasia, follicular cell		Adenoma, follicular cell		Carcinoma, follicular cell		Adenoma or carcinoma follicular cell	
		Total No.	Multiplicity[a]	Total No.	Multiplicity	Total No.	Multiplicity	Total No.	Multiplicity
0	14	41	2.9±1.7	53	3.8±3.4	10	0.7±0.7	63	4.5±3.6
0.03	15	58	3.9±2.6	54	3.6±2.4	15	1.0±1.3	69	4.6±2.8
2	15	91	6.1±5.1	39	2.6±2.6	14	0.9±1.3	53	3.5±3.3

[a] : Average number of lesions ± S.D.

Table 12. Total Number and Multiplicity of Hyperplastic or Neoplastic Lesions in the Colon

Dammar resin (%)	No. of rats	Adenocarcinoma		Mucinous carcinoma		Total carcinoma	
		Total No.	Multiplicity	Total No.	Multiplicity	Total No.	Multiplicity
0	14	2	0.1±0.4	2	0.1±0.4	4	0.3±0.5
0.03	15	1	0.1±0.3	1	0.1±0.3	2	0.1±0.4
2	15	0	0.0±0.0	1	0.1±0.3	1	0.1±0.3

[a] : Average number of lesions ± S.D.

Table 13. Total Number and Multiplicity of Hyperplastic or Neoplastic Lesions in the Kidney

Dammar resin (%)	No. of rats	Atypical hyperplasia, tubule cell		Adenoma, tubule cell		Carcinoma, tubule cell	
		Total No.	Multiplicity[a]	Total No.	Multiplicity	Total No.	Multiplicity
0	14	34	2.4±1.7	9	0.6±0.6	2	0.1±0.4
0.03	15	62	4.1±2.9	8	0.5±0.6	3	0.2±0.4
2	15	15	1.0±0.8*	4	0.3±0.5	1	0.1±0.3

Dammar resin (%)	No. of rats	Nephroblastoma		Hyperplasia, transitional cell		Carcinoma, transitional cell	
		Total No.	Multiplicity	Total No.	Multiplicity	Total No.	Multiplicity
0	14	5	0.4±0.5	0	0.0±0.0	1	0.1±0.3
0.03	15	6	0.4±0.6	0	0.0±0.0	1	0.1±0.3
2	15	0	0.0±0.0	1	0.1±0.3	1	0.1±0.3

[a] : Average number of lesions ± S.D.

* : Significantly different from control group at $P<0.05$.

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究
総合分担研究報告書

遺伝子のメチル化異常に関する研究

分担研究者：辻内　俊文　近畿大学理工学部生命科学科　教授

研究要旨

近年、種々のがん細胞においてDNAメチル化異常によるがん抑制遺伝子不活化が報告され、がんの発生・進展・増殖に深く関与することが示唆されている。本研究では、既存添加物の一つであるダンマル樹脂の肝細胞癌発生機構を分子レベルで明らかにするとともに細胞機能に及ぼす影響についても検索した。その結果、ダンマル樹脂による肝細胞癌の発生にDNAメチル化異常の関与は乏しく、p53・b-catenin遺伝子点突然変異などgeneticな異常が重要であることが明らかとなった。さらに、培養細胞を用いた細胞機能解析より、ダンマル樹脂による細胞運動・浸潤能の促進作用もラット肝細胞癌発生機構に重要な役割を演じることが示された。

A．研究目的

近年、種々のがん細胞においてDNAメチル化異常によるがん抑制遺伝子不活化が報告され、がんの発生・進展・増殖に深く関与することが示唆されている。本研究では、既存添加物の一つであるダンマル樹脂の肝細胞癌発生機構を遺伝子レベルで明らかにするために、ラットにダンマル樹脂を投与して誘発した肝細胞癌におけるDNAメチル化異常について解析するとともに、p53・b-catenin・Ki-ras遺伝子点突然変異の検索も行った。さらに、培養細胞系を用いて、ラット肝上皮細胞の細胞運動・浸潤能に対するダンマル樹脂の影響を検索した。

B．研究方法

大阪市立大学より供与を受けた、ダンマル樹脂で誘発したラット肝細胞癌5例（ホルマリン固定パラフィン切片）を用いて、micro dissection法よりgenomic DNAを抽出しDNAメチル化ならびに点突然変異の解析を行った。 また、ダンマル樹脂を低濃度で48時間処理したラット肝上皮細胞WB-F344を用いて、細胞運動能ならびに細胞外基質分解酵素(matrix metalloproteinases (MMPs)の発現・活性化に及ぼす影響を検索した。

（倫理面への配慮）
該当せず

C．研究結果

ダンマル樹脂で誘発した肝細胞癌においてE-cadherin・p16遺伝子のメチル化異常はみられないものの、p53・b-catenin遺伝子点突然変異が各々20%の頻度で検出された。細胞培養を用いた細胞機能解析では、低濃度のダンマル樹脂で処理した細胞において有意な細胞運動能の亢進が見られるとともに、*Mmp-2*と*Mmp-9*の発現上昇とMmp-2の活性化が見られた。

D．考察

ダンマル樹脂によるラット肝細胞癌発生に、epigeneticな異常の関与は乏しいものの、遺伝子の点突然変異の誘発と細胞運動・浸潤能の亢進が重要な役割を演じることが本研究結果で明らかとなった。これまで発がん実験系ならびに誘発した病変を用いた遺伝子変異の探索がリスク評価のための主な解析法であったが、本研究で用いた細胞運動・浸潤能を検索する実験系も有用な評価法のひとつになりうる可能性が考えられる。

E．結論

ダンマル樹脂によるラット肝細胞癌発生に、epigeneticな異常の関与は乏しく、geneticな異常が重要であることが明らかとなった。さらに、ダンマル樹脂は細胞の運動・浸潤能に対して促進作用を有することが判明した。

F．研究発表

1．論文発表

K.Kato, R.Fukui, K.Okabe, E.Tanabe, M.Kitayoshi, N.Fukushima, T.Tsujiuchi. Constitutively active lysophosphatidic acid

receptor-1 enhances the induction of matrix metalloproteinase-2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 417 (2012) 790-793.

Okabe K, Hayashi M, Kato K, Okumura M, Fukui R, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-3 increases tumorigenicity and aggressiveness of rat hepatoma RH7777 cells. Mol. Carcinog. (2012) DOI: 10.1002/mc.21851.

Hayashi M, Okabe K, Kato K, Okumura M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Different function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells. Cancer Lett. 2012(316)91-96.

Okabe K, Kato K, Teranishi M, Okumura M, Fukui R, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Induction of lysophosphatidic acid receptor-3 by 12-O-tertadecanolphorbol-13 -acetate stimulates cell migration of rat liver cells. Cancer Lett. 2011(309)236-242.

Okabe K, Hayashi M, Yamawaki Y, Teranishi M, Honoki K, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Possible involvement of lysophosphatidic acid receptor-5 gene in the aquisition of growth advantage of rat tumor cells. Mol Carcinog. 2011(50)635-642.

Hayashi M, Okabe K, Yamawaki Y, Teranishi M, Honoki K, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 enhances cell migration in rat lung tumor cells. Bioch. Bioph. Res. Com. 2011(405)450-454.

Okabe K, Hayashi M, Yoshida I, Nishimura K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Distinct DNA methylation patterns of lysophosphatidic acid receptor genes during rat hepatocarcinogenesis induced by a choline deficient L-amino acid defined diet. Arch Toxicol. 2011(85)1303-1310.

Okabe K, Hayashi M, Wakabayashi N, Yamawaki Y, Teranishi M,Fukushima N, Tsujiuchi T. Differential expressions and DNA methylation patterns of lysophosphatidic acid receptor genes in mouse tumor cells. Pathobiology. 2010(77)309-314.

Okabe K, Hayashi M, Fujii M, Honoki K, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Mutations of lysophosphatidic acid receptor genes in human osteosarcoma cells. Pathobiology. 2010 (77)278-282.

Tsujino M, Fujii M, Okabe K, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Differential expressions and DNA methylation patterns of lysophosphatidic acid receptor genes in human colon cancer cells. Virchows Arch. 2010 (457)669-676.

2. 学会発表

加藤紘平、奥村真衣、朴木寛弥、辻内俊文.ハムスター膵管癌培養細胞の悪性能獲得におけるＬＰＡ受容体の関与第 70 回日本癌学会総会, 10 月 3 日-5 日, 名古屋, 2011（日本癌学会誌プログラム P-3128, p.271）

岡部恭子、藤井美奈子、林麻衣、西村和樹、朴木寛弥、辻内俊文：コリン欠乏アミノ酸食によるラット肝発がん過程における Lpa3 遺伝子 DNA メチル化異常. 第 69 回日本癌学会総会, 9 月 22 日-24 日, 大阪, 2010（日本癌学会誌 P-0171, p.113）

朴木寛弥、辻内俊文：ニトロソ化合物によるラット肺・肝がん発生における Lpa5 遺伝子発現異常. 第 69 回日本癌学会総会, 9 月 22 日-24 日, 大阪, 2010（日本癌学会誌 P-0172, p.113）

G．知的所有権の取得状況

1. 特許取得　なし
2. 実用新案登録　なし
3.その他　なし