

201133025A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための

短・中期バイオアッセイ系の開発

(H23-化学-指定-007)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉見 直己

平成24 (2012) 年3月

目 次

I. 総括研究報告

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究 (吉見直己)	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発 (吉見直己)	5
2. 前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発 (高橋智)	6
3. 胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発 (塚本徹哉)	8
4. 大腸前癌病変を構成する細胞の起源に関する研究 (久野壽也)	10
5. 遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発 (魏民)	11
6. 肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発 (横平政直)	14
7. 膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発 (小川久美子)	15
8. 網羅的なDNA付加体解析法を用いた化学物質のDNA損傷性評価 (戸塚ゆ加里)	16
9. ヒストン修飾を指標としたin vitro発がんリスク 評価系の開発 (伊吹裕子)	18

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究班員名簿

I. 総括研究報告書

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発

研究代表者 吉見 直己 琉球大学医学部腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

化学物質は毎年新規に開発され、その一部は Ames 試験等の変異原試験陽性が含まれ、ヒトに対する発がんへの安全性の確認が必要である。そのため、発がん試験には動物による代替実験試験を要するが、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発・研究されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難であるため、本研究では発がん性を検証するために病理組織学的な診断を利用により、変異原陽性物質に対する少数での動物系での中・短期のバイオアッセイ系を開発することを目的とした。臓器により、病理組織学的に早期の腫瘍性病変を特定できるように検討を始めた(大腸)。他の臓器でも早期病巣の特定とその特徴解析の検討を準備した。加えて、分担者間での多施設共同として動物臓器供与のシステムの構築に関して検討したが、その輸送などの実際方法を今後詰めていく必要があることがわかった。

研究分担者

高橋智（名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学分野 教授）

塚本徹哉（藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授）

久野壽也（岐阜大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座 准教授）

魏民（大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学 准教授）

横平政直（香川大学医学研究院病理病体学生体防御医学講座腫瘍病理学 助教）

小川久美子（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部実験病理学 部長）

戸塚ゆ加里（国立がん研究センター研究所発がんシステム研究分野 ユニット長）

伊吹裕子（静岡県立大学環境科学研究所環境毒性学 准教授）

A. 研究目的

本研究で、短・中期発がん予測バイオアッセイ系を開発し、そのガイドライン設定の方向性への提唱が目的である。既にヨーロッパ・ユーロ圏の諸国での研究施設では、法律により動物実験系ができないため、代替実験法が開発が急がれるが、ヒトに対する発がん影響を反映できる代替法は現在のところない。そのため、動物モデルでの評価法は未だに必要不可欠である。しかし、国際的に動物試験に対する 3R（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）の原則は、動物系実験を肯定的に考えている研究者でさえ、当然の考慮として受け入れられている。この現状のためにも、腫瘍形成を正確に判定し得る病理組織学的な評価を基とした各臓器

別の発がん試験として短・中期でのバイオアッセイ系の開発が望まれる。ヒトの場合においても各臓器のがんの早期発見がその治療と予後に重要な関与があることは周知の事実である。実際、ヒトにおける生検標本での病理診断技術の発達、内視鏡的にも病変を認めない場合でも、ランダム生検により、病理組織学的に異型細胞の存在は重要な診断価値があり、その後の精査の対象となっている。しかるに、未知物質の発がん性試験には長期動物実験による肉眼的な腫瘍形成を指標としており、その観察される腫瘍の病理組織学的な検索はあくまでも腫瘍の確定するためのものであった。しかし、動物実験においても従前より前がん病変として種々の早期に発現する病巣の研究がなされてきた。その多くの研究は腫瘍発生の科学的機序の視点でのものであった。このため、本研究では、前がん病変とされてきたもののうち、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものは、その肉眼的な腫瘍形成に関わらず、腫瘍として認められるものを指標として検索できる試験法を開発を目指すことにした。

B. 研究方法

以下のように、主に臓器別に中・短期バイオアッセイ系の確立と新規 in vitro 発がん性予測試験を実施した。

1) 中・短期バイオアッセイ系

① 胃

正常マウスに X 線照射した後の大腸陰窩における遺伝子発現変化をモデルに用いた。大腸陰窩を 30mM EDTA in Hanks' Balance solution にて腺管分離を行い、PAXgene Tissue container (QIAGEN) を用いて、分離腺管の固定を行い、実体顕微鏡下に、陰窩を腺底部から腺開口部まで

領域ごとに 3 分割して、PAXgene RNA kit (QIAGEN)を用いて、total RNA の抽出を行った。GAPDH を内部標準として、p21、p53、 β -catenin、cyclin D1 の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法により検討した。各遺伝子の primer の配列は、p21: Forward primer (F): TTGCACTCTGGTGTCTGAGC, Reverse primer (R): TCTGCGCTTGGAGTGATAGA; p53: (F) GCTTCTCCGAAGACTGGATG, (R) GTCCATGCAGTGAGGTGATG; β -catenin: (F) CTTGGCTGAACCATCACAGA, (R) TGTCAGCTCAGGAATTGCAC; Cyclin D1: (F) TGCAAATGGAAGTCTTCTG, (R) CTGGCATTGGAGAGGAAG; GAPDH: (F) GTGGACCTCATGGCCTACAT, (R) TGTGAGGGAGATGCTCAGTG. Quantitect SYBR Green RT-PCR kit を用い Rotor-GeneQ (QIAGEN) を使って定量的に、RT-PCR を行った。

② 大腸

(ア) 前がん病変の組織学的検索

発癌剤 dimethylhydrazine (40mg/kg 体重)で大腸発癌を誘発し、5, 20, 40 週で屠殺を行い、腫瘍形成とともに、前癌病変に関して検討した。メチレンブルー染色による前癌病変と考えられる aberrant crypt foci (ACF)ないしアルシアンブルー染色で MDF を個々に観察し、その後、パラフィン包埋組織標本作製して得られる個々の微小病巣(陰窩数が 15 個以上から 50 個程度)の病理組織学的異型度の比較を行った。

(イ) 前がん病変を構成する細胞起源検索

6 週齢の ICR マウスに対し azoxymethane (10 mg/kg 体重)を投与した 1 週間後に 1.5% dextran sodium sulfate を 1 週間飲水投与して大腸増殖性病変を誘発した。実験開始 4 週間後に犠牲死させ、大腸を摘出し、粘膜面に対して垂直な病理組織標本作製した。粘膜内病変を HE 染色で確認したのち、Lgr5 の免疫染色を行い、染色性と染色パターンを評価した。次に、*Apc*^{Min/+}と *Lgr5-GFP* knock-in マウスを交配して作製したマウスの大腸腺腫に対し Lgr5, β -catenin, GFP の免疫染色を行い、染色性を評価した。

③ 肝臓

in vivo 変異原性の検索が可能な F344 系 *gpt delta* ラット (以下 *gpt delta* ラットと略す)を用いた中期肝発がん性試験法 (伊東法) の発がん性および変異原性の包括評価における有用性を、*gpt delta* ラットにおいて *in vivo* 変異原性試験である *gpt* アッセイと Spi⁻アッセイを施行し、2-AAF の動物生体下における DNA に対する変異原性を検討する予定である。

④ 肺臓

NNK 誘発マウス肺腫瘍 (腺系腫瘍、16 週) および NTCU 誘発マウス肺扁平上皮異形成 (20 週)、DHPN ラット肺腫瘍 (腺系腫瘍、30 週) の固定標本を用い、SP-C および CCSP について二重免疫染色を行う。さらに、多種のマーカーについて検討を行う。

⑤ 膀胱

ラット膀胱では、単純性過形成および乳頭状/結節状過形成などの過形成性病変が、比較的早期より観察される。これらの早期病変と既知の化学発がん物質誘発癌病変において、各種 DNA 損傷修復酵素や細胞増殖制御因子について免疫組織学的に比較検討し、早期においても、癌病変と類似のパターンを示す病変の有無について検討する。特に、修復酵素と増殖因子を共発現する細胞の有無について解析する。本年度は、指標となりうる分子やその抗体を我々の過去のデータ・標本および文献より検討し、免疫組織化学染色に利用可能な抗体の選定を行った。

⑥ 前立腺

6 週齢 F344 雄ラットに 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) をそれぞれ 300mg/kg b.w. で強制胃内投与、200mg/kg b.w. で皮下投与し、2 日後に前立腺 (腹葉、側葉、背葉) を摘出し、ホルマリン固定および凍結組織を採取した。免疫組織学的検討を行うと同時に、前立腺腹葉および側葉から抽出した total RNA を用いてマイクロアレイによる発現プロファイルを検討した。

2) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

① 網羅的な DNA 付加体解析法

実験動物において発がん性が報告されているアルキル化試薬の *N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU, 100 mM) と市販のウシ胸腺 DNA (ctDNA, 1.5 mg/mL) を試験管内で 37 °C, 14 時間反応させ、DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOFMS での解析に供した。Waters 社が提供するソフトウェア MarkerLynx を用い、分析データから DNA 付加体の候補となりうるピークを抽出した。また、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス -116.04736 を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように解析系をデザインした。各ピークの *m/z*、保持時間、面積値から DNA 付加体マップを作製した。本年度はまず、*in vitro* モデル反応系において生成される既知および未知 DNA 付加体の解析について行なった。NMU-ctDNA をアダクトーム法により解析した。

② ヒストン修飾を指標法

化学物質によるヒストン修飾として、H2AX(Ser139)、H3 リン酸化(Ser10, Ser28)、アセチル化(global, Lys9, Lys14)に焦点を絞り検討することとし、そのヒストン修飾選択の適正を確認するための予備実験を行った。

3) 多施設共同システム構築

分担者ごとに動物実験の対象臓器以外の臓器に関して、他施設で研究対象にする臓器を一定の固定・保存状態をするための共通プロトコルを班会議等で議論を開始した。

(倫理面への配慮)

全ての分担者の動物施設におけるの規程に基づいて、実験計画の許可とともに、遺伝子を利用する場合はそれぞれの施設での組み換えDNA実験委員会の許可を得、厳正に動物愛護と倫理面を配慮した実験を施行した。また、ヒト検体を検討する場合は、インフォームド・コンセントの得られた検体を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

C. 研究結果

1) 中・短期バイオアッセイ系

① 胃

1 腺管あるいは腺底部部分 1、3、10 個を用いて、内部標準に用いる GAPDH と発現変動が期待される p21 に関して定量的に RT-PCR を行った。その結果、腺管あるいは腺底部いずれを用いた場合でも GAPDH、p21 のいずれもほぼ定量的な結果が得られた。p21 mRNA は、腺開口部では恒常的に発現していた。腺底部では、正常では低値であったが、X 腺照射と共に 15 倍程度に発現が上昇した。p53 と cyclin D1 は、腺底部で高値で、腺開口部では低値であった。β-catenin レベルはほぼ一定であった。

今後、今回確立した手法を用い、胃腺管の各領域の遺伝子発現変化を検討する予定である。

② 大腸

(ア) 前がん病変の組織学的検索

現在、進行中で結果として示すものはありませんが、今までの文献から、MDF は早期に腫瘍性組織形態を呈する可能性がある。

(イ) 前がん病変を構成する細胞の起源

陰窩の複雑な分岐はマウス大腸前癌病変と考えられているβ-catenin accumulated crypt の特徴でもあり、萌出部の Lgr5 の発現は大腸前癌病変の発生に関係があると思われる。大腸早期増殖性病変および腺腫に Lgr5 は高発現しており、大腸発癌リスクの評価に用いることが可能と考えられた。Apc^{Min/+} × Lgr5-GFP knock-in mouse に生じた腺腫が Lgr5(+) となったにもかかわらず GFP 陰性となったのは不明であるが、一部の腺腫が Lgr5(-) の stem cell 由来である可能性も考えられた。

③ 肝臓

本年度は、動物実験の事前準備を終え、動物およびその他の必要物資を確保した。現在、試験開始前の馴化飼育中である。

④ 肺臓

現在、実験準備中である。検討予定のマーカーとして、CCSP、SP-C、Ki67、PCNA、CK7、CK20、SP-A、CK 34 β E12、TTF-1、p53、CK5/6、EGF-R、Estrogen R、Progesterone R、CEA、NapsinA、P16、P27、EGF-R、

cyclinD1 を予定している。

⑤ 膀胱

我々の過去のデータより 3%のウラシル混餌食によるラット膀胱増殖性病変においては、DNA 損傷修復酵素のうち、MGMT の mRNA 発現はむしろ低下しており、OGG1、MSH2 および MTH1 の発現は明らかな変化は示さなかった。近年 H2AX は DNA2 本鎖損傷のバイオマーカーとして注目されており、複数の文献が見られている。膀胱における免疫染色による評価を目指して、準備を進めている。

⑥ 前立腺

PhIP は前立腺の中でも腹葉にのみ発がん性を示すが、PhIP 投与後の前立腺組織における細胞増殖を Ki-67 免疫染色にて観察すると、腹葉のみで増殖活性の増加がみられ、側葉、背葉では変化はみられなかった。マイクロアレイ解析では発現上昇遺伝子として細胞周期関連遺伝子が多く認められたが、我々はその中で 1.53 倍の上昇がみられた Histone H2AX に注目して解析を行った。活性化体であるリン酸化 Histone H2AX (γ-H2AX) の免疫組織染色を行いその陽性細胞率を定量化すると、前立腺腹葉、大腸で有意な増加がみられたのに対し、前立腺側葉、背葉、肺、肝、腎では有意な上昇は観察されなかった。

2) 新規 in vitro 発がん性予測試験

① 網羅的な DNA 付加体解析法

Native な ctDNA に存在しない DNA 付加体が 16 個見出された。そのうちの一つは、既知の付加体である O⁶-メチル-2'-デオキシグアノシン (O⁶MedG) である可能性が、m/z 値より示唆された。さらに、メチル化された 2'-デオキシシチジンと同一である、m/z 242.11 を有するピークが検出された。

② ヒストン修飾を指標法

ホルムアルデヒド作用後、顕著なヒストン H3(Ser10, Ser28) のリン酸化が示された。ヒストンアセチル化は、一時的に (~6 時間) アセチル化が低下し、その後回復するパターンを示した。ヒストン H2AX(Ser139) リン酸化は時間依存的に増加した。

3) 多施設共同システム構築

各施設、主体とする臓器以外には必ずしも、動物解剖時に保存していないことが判明したために、共通の臓器保存をしていくかを協議した結果、早急に各施設の対象臓器の摘出固定・保存の方法をまとめ、研究代表者に提出することにし、次年度にまとめることとした。

D. 考察

各臓器別で早期がん病巣を特定できる中短期モデルの開発を目標に進行しているが、大腸では比較的多くの前がん病変が知られており、がんの化学予防のバイオマーカーとしても利用されるとともに、ヒトにおい

でも動物で提唱された前がん病変の存在が大腸癌の内視鏡的なマーカーとして認識されているため、これらの早期の病理組織学的検索は発がん試験として十分に利用できると思われる。

他臓器での病理組織学的診断による中短期での実験系での有力な前がん病変を今後検討して行くと共に、遺伝子発現でのバイオマーカーを組み合わせることで、同様に中短期動物モデルから作成する病理組織標本での腫瘍性病変の特定の可能性が期待される。

新規 *in vitro* 系での試験では、新たに LC-TOF MS を用いてアダクトーム法を確立の可能性を示唆され、今後の未知物質に対する検討が必要である。また、ヒストン修飾ではヒストン H2AX(Ser139)リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3(Ser10)のリン酸化により前がん遺伝子の発現制御を捉えることが可能であることが明らかになり、*in vitro* 新規発がんリスク評価指標候補として、前立腺における動物系での同様の検討結果から、有力視された。

E. 結論

動物を供する発がん試験における代替法の確立は化学物質のひとつへの安全性に対して重要である。しかし、動物実験に対する 3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則は決して動物を使用しないということではないため、今回の研究目標はその精神に基づいてヒトとしての生体に近い動物での発がんすなわち、腫瘍形成の有無を推測できるシステムの構築の確立を目指すものと位置づけることができ、その観点で、その可能性を示唆できるものと考えている。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi, S. et al. Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. Prostate, in press.
- 2) Nakatani S, Kakehashi A, Ishimura E, Yamano S, Mori K, Wei M, Inaba M, Wanibuchi H. Targeted proteomics of isolated glomeruli from the kidneys of diabetic rats: Sorbin and SH3 domain containing 2 is a novel protein associated with diabetic nephropathy. Exp Diabetes Res. in press.
- 3) Xie XL, Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Tajiri M, Wanibuchi H. 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) promotes mouse hepatocarcinogenesis by activating transforming growth factor- β and Wnt/ β

-catenin signaling pathways. Toxicol Sci. in press.

- 4) Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Kakehashi A, Mori K, Nishizawa Y, Inaba M, Wanibuchi H. Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephronectin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transpl. in press.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II. 分担研究報告書

大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発

研究分担者 吉見 直己 琉球大学医学部腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

大腸粘膜における発がん試験の指標として、前がん病変の病理組織学的な意義を、ラット DMH 大腸発癌モデルで経時的に検討した。その病理組織像の推移から、従前より前癌病変と考えられている変異陰窩巣(aberrant crypt foci ; ACF)よりも早期から粘液染色で陰性の粘液枯渇陰窩巣(mucin-depleted foci ; MDF)が腺腫ないし腺癌に類する所見の有無を多くのヒト消化管病理を専門とする病理医に診断要請する予定である。長期実験での腫瘍形成を指標とするのではなく、中・短期での大腸発がん試験法として大腸粘膜での MDF を組織学的に検索する代替法の可能性を模索する予定である。

A. 研究目的

ヒト大腸発癌過程において、腺腫・癌連鎖仮説で説明がつかない平坦型大腸癌が最近注目されている。動物モデルでみられる mucin-depleted foci (MDF)は平坦型の前癌病変の可能性がある。そのため、従前から動物モデルでの前がん病変として認識され、発がん予測バイオマーカーとして利用されている aberrant crypt foci (ACF)との病理組織学的な経時的な変化に関して検討し、本研究目的である中短期での発がん試験への利用の可能性を検討した。

B. 研究方法

発癌剤 dimethylhydrazine (40mg/kg 体重)で大腸発癌を誘発し、5, 20, 40 週で屠殺を行い、腫瘍形成とともに、前癌病変に関して検討する予定である。その経過で、メチレンブルー染色による前癌病変と考えられる aberrant crypt foci (ACF)ないしアルシアンブルー染色で MDF を個々に観察し、その後、パラフィン包埋組織標本作製して得られる個々の微小病巣(陰窩数が 15 個以上から 50 個程度)の病理組織学的異型度の比較を行う。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、琉球大学動物実験施設の実験動物委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C. 研究結果

現在、進行中で結果として示すものはありませんが、今までの文献から、MDF は早期に腫瘍性組織形態を呈する可能性がある。

D. 考察

予定される初期病変と考えられる平坦型 MDF は経時的に複数の異型陰窩数を有して増殖してくると、隆起と拡張性変化を呈して、隆起型 MDF の形態変化を来してくるものと推測された。結果として隆起型 MDF を含む粘液枯渇を呈する MDF が初期から腫瘍性性格を

有するものであると推察している。すなわち、ACF は発癌剤による反応性病変としての予知バイオマーカーであり、大腸腫瘍顕在化予知のバイオマーカーとしては、形態と粘液機能面を見ることができる MDF を指標にする必要性を示唆したものと思われ、既に腫瘍と診断される病理組織学的な性格を有する微小病変を中短期に発見できる可能性を示唆するものと考えられ、発がん試験自体への応用が可能であると考えている。

診断者間によるばらつきを今後検討する必要性がある。

E. 結論

大腸発がん試験の代替法として、全大腸粘膜での病理組織学的検索を施行することで、肉眼的な検出できない微小病変の早期病巣の有無の検出方法を提唱する計画を遂行予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし。

2. 学会発表
特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発

研究分担者 高橋 智 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨

前立腺発がんリスク評価のための短・中期発がんモデル樹立を目的にラットを用いて検討する。我々は以前に、発がん物質投与のラットにおいて、その発がん標的臓器でリン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) 発現が有意に上昇することを見いだした。そこで本年度は、前立腺発がん物質、あるいは前立腺以外に発がん標的性を示す発がん物質をラットに投与し、発がん標的臓器における γ -H2AX 発現を評価し、その特異性について検討する。現在、動物実験が進行中である。

A. 研究目的

前立腺癌は世界的に男性癌の中で4番目に多い腫瘍で、日本でも2020年には肺癌について2番目の罹患率になると予測されており、増加率が一番高いがんである。前立腺がんの原因については未だ不明な点が多いが、食事要因がその発症に深く関与していることが示唆されている。前立腺がんの発症を予防するにはその発がん因子を同定して、それらの摂取を極力抑える事が重要であると考えられ、環境中の発がん因子を同定するための短・中期発がんモデルが必要である。

発がんモデルではがん、あるいは前がん病変を指標にする事が一般的であるが、ラットの前立腺がんモデルでは前がん病変を惹起するには30-40週、がんでは50-60週必要であり、多数の被検物質をスクリーニングするには効率的ではない。そこで、これらの病変を代替する分子・遺伝子群を抽出、同定し、これらを指標にした前立腺発がんモデルの樹立を試みた。

我々は以前に、前立腺発がん物質である2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)の臓器標的性に関わる諸要因を解析し、PhIPをラットに投与した際に発がん標的臓器においてのみリン酸化ヒストンH2AX (γ -H2AX)発現が上昇することを明らかにした。また、PhIPと同様に前立腺発がん物質である3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)を投与した場合においても γ -H2AX 標識率の増加が認められ、前立腺発がん物質をスクリーニングする指標として γ -H2AX が有用ではないかと考えられた。そこで、本年度は前立腺発がん物質に対する γ -H2AX の特異性について検討する。

B. 研究方法

6週齢F344雄ラットに、前立腺発がん物質であるN-methyl-N-nitrosourea (MNU)、N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)、前立腺に標的性のない肝・腎発がん物質であるDimethylnitrosamine (DMN)、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)、大腸発がん物質である1,2-dimethylhydrazine (DMH)、肺・甲状腺発がん物質であるDihydroxy-di-n-propyl-nitrosamine (DHPN)、乳腺発がん物質である7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を単回投与す

る。投与経路は、それぞれ皮下投与 (BOP)、胃内投与 (MeIQx, DMBA) もしくは腹腔内投与 (MNU, DMN, DMH, DHPN) を用いる。投与2日後に前立腺、大腸、肺、肝、腎を摘出し、それぞれホルマリン固定および凍結組織を採取する。免疫組織学的検討を行うと同時に、前立腺腹葉および側葉から抽出したtotal RNAを用いて、 γ -H2AXの標識率、発現量を検討する。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、名古屋市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C. 研究結果

本年度は、動物実験による研究成果を持ち合わせていないが、次年度に行う実験のための準備として発がん物質、抗体、その他の研究試薬等の確保を終了した。

D. 考察

発がん標的臓器における γ -H2AX 発現の特異性が確認されれば、短・中期前立腺発がんモデル樹立に向けた基礎的データが得られるものと期待される。

E. 結論

γ -H2AX は臓器発がんに関与しており、 γ -H2AX を指標にした動物モデルは前立腺発がん物質のスクリーニングのみならず、他臓器に対する発がん物質の検索にも有用である可能性が示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

- 1) [Takahashi, S.](#) et al. Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. Prostate, in press.

日本語論文

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発

研究分担者 塚本徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨

ヒト胃発がん初期における変化を解明するため、マウス胃腺管を用いて発がん物質暴露初期における遺伝子発現変化の解析が必要である。そのため、構造がより単純で幹細胞領域や増殖帯の同定されているマウス大腸を用いて遺伝子発現の定量性の検討を行った。その結果、腺管を腺開口部から腺底部に分割しても定量的に遺伝子発現変化を検討でき、各部位における遺伝子発現の差も同定可能であった。今後、今回確立した手法を用い、胃腺管の各領域の遺伝子発現変化を検討する予定である。

A. 研究目的

近年、衛生環境の改善による *Helicobacter pylori*（ピロリ菌）感染率の低下や治療法の進歩と共に胃がんは減少の一途をたどっているが、その死亡率は依然高い値を示している。ピロリ菌は、1983年、WarrenとMarshallにより慢性活動性胃炎患者から初めて分離され、その後の多くの疫学的研究により、ピロリ菌が慢性胃炎、胃潰瘍、腸上皮化生さらには胃がんや悪性リンパ腫等の発症に重要な要因であることが明らかとなってきた。慢性炎症は、種々の臓器で発がんの重要なリスクファクターであることが知られており、活性酸素によるDNA損傷、遺伝子のメチル化等による発現異常が重要な因子であることが明らかとなっている。しかし、胃発がん初期過程における遺伝子変異あるいは遺伝子発現異常、さらにはそれに伴う形態変化は未だ明らかではない。

本研究では、ヒト胃がんの初期発がん過程における分化異常を指標とし、発がん物質暴露によるマウス胃腺管の各部位における異常の検出を目標とした。すなわち、胃底腺および幽門腺それぞれから腺管分離法により、上皮成分のみを採取し、幹細胞領域、腺開口部領域、腺底部領域に分けて、ごく初期の遺伝子異常あるいは遺伝子発現変化を検討し、発がん過程の指標となるようなマーカーの検索と候補遺伝子の病理組織学的発現パターンを検討することを目標とした。今年度は、まず、より構造の単純で、増殖帯や幹細胞の位置のわかっている大腸陰窩を用いて各部位における遺伝子発現を検討し、実験手技の妥当性および定量性等の検討を行った。

B. 研究方法

正常マウスにX線照射した後の大腸陰窩における遺伝子発現変化をモデルに用いた。大腸陰窩を30mM EDTA in Hanks' Balance solutionにて腺管分離を行い、PAXgene Tissue container (QIAGEN)を用いて、分離腺管の固定を行い、実体顕微鏡下に、陰窩を腺底部から腺開口部まで領域ごとに3分割して、PAXgene RNA kit

(QIAGEN)を用いて、total RNAの抽出を行った。GAPDHを内部標準として、p21、p53、 β -catenin、cyclin D1の遺伝子発現を定量RT-PCR法により検討した。各遺伝子のprimerの配列は、p21: Forward primer (F): TTGCACTCTGGTGTCTGAGC, Reverse primer (R): TCTGCGCTTGGAGTGATAGA; p53: (F) GCTTCTCCGAAGACTGGATG, (R) GTCCATGCAGTGAGGTGATG; β -catenin: (F) CTTGGCTGAACCATCACAGA, (R) TGTCAGCTCAGGAATTGCAC; Cyclin D1: (F) TGCAAATGGAAGCTTCTG, (R) CTGGCATTTTGAGAGGAAG; GAPDH: (F) GTGGACCTCATGGCCTACAT, (R) TGTGAGGGAGATGCTCAGTG. Quantitect SYBR Green RT-PCR kitを用いRotor-GeneQ (QIAGEN)を使って定量的に、RT-PCRを行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議、2006年）及び藤田保健衛生大学動物実験取扱規定を遵守し、同大学動物実験委員会の承認のもとに遂行した。

C. 研究結果

1腺管あるいは腺底部部分1、3、10個を用いて、内部標準に用いるGAPDHと発現変動が期待されるp21に関して定量的にRT-PCRを行った。その結果、腺管あるいは腺底部いずれを用いた場合でもGAPDH、p21のいずれもほぼ定量的な結果が得られた。p21 mRNAは、腺開口部では恒常的に発現していた。腺底部では、正常では低値であったが、X線照射と共に15倍程度に発現が上昇した。p53とcyclin D1は、腺底部で高値で、腺開口部では低値であった。 β -cateninレベルはほぼ一定であった。

D. 考察

従来の大腸粘膜全体を用いた遺伝子発現検索では、非常に大きな個体差があった。これは、大腸上皮のみならず、相当量の間質細胞あるいは炎症細胞が混入す

るためと考えられる。それに対して、腺管分離した大腸陰窩あるいは腺管の一部のみでも、ほぼ均一な上皮細胞からなっており、良好な定量性が得られたと考える。また、腺底部と腺開口部を比較すると、部位による p21 遺伝子発現の違いが明らかになった。さらに、X線照射に対して、腺底部の幹細胞領域で応答があることが示され、遺伝子障害作用による応答にも鋭敏に定量的に RT-PCR が施行できることが示された。

E. 結論

マウスの実験においては、実際にヒト胃で起こっている事象を模して、化学物質による遺伝子損傷刺激後の幹細胞領域における遺伝子変異をマーカーとして、発がん早期における反応を検討できると考えられた。今後、今回確立した手法を用い、胃底腺および幽門腺腺管の幹細胞領域および増殖帯の同定を行い、各領域の発がん物質暴露に対する遺伝子発現変化を検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

大腸前癌病変を構成する細胞の起源に関する研究

研究分担者 久野壽也 岐阜大学大学院医学系研究科腫瘍病理学 准教授

研究要旨

Lgr5は大腸上皮の幹細胞マーカーであり、ヒト大腸腺腫や大腸がんにおいて発現が確認されている。化学物質の発癌リスク評価においてこの蛋白が果たす役割を明らかにするため、化学物質誘発マウス大腸早期増殖性病変における同蛋白の発現、局在を検討した。Azoxymethane および dextran sodium sulfate で誘発した大腸早期増殖性病変と、*Apc^{Min/+}*と *Lgr5-GFP knock-in* マウスを交配して作製したマウスの大腸腺腫を用いて Lgr5, b-catenin, GFP の免疫染色を行ったところ、いずれにも Lgr5 の発現が見られ、腺管の萌出する部位に高度な発現を認めた。以上より Lgr5 は早期増殖性病変および腺腫でも発現しており、化学物質の短期検索系マーカーとして有望と考えられた。

A. 研究目的

大腸腫瘍はおそらく陰窩部に長期間にわたって存在することができる幹細胞に遺伝子異常が蓄積して生じると考えられる。大腸陰窩の幹細胞のマーカーである Lgr5 は大腸癌においても発現が見られ、腫瘍細胞の起源を探るツールとなりうると考えられる。まずは、化学物質の大腸発癌リスク評価のマーカーとして Lgr5 が有用であるかどうかを検討した。

B. 研究方法

6週齢の ICR マウスに対し azoxymethane (10 mg/kg 体重) を投与した 1 週間後に 1.5% dextran sodium sulfate を 1 週間飲水投与して大腸増殖性病変を誘発した。実験開始 4 週間後に犠牲死させ、大腸を摘出し、粘膜面に対して垂直な病理組織標本を作製した。粘膜内病変を HE 染色で確認したのち、Lgr5 の免疫染色を行い、染色性と染色パターンを評価した。次に、*Apc^{Min/+}* と *Lgr5-GFP knock-in* マウスを交配して作製したマウスの大腸腺腫に対し Lgr5, β -catenin, GFP の免疫染色を行い、染色性を評価した。

(倫理面への配慮)

実験は実験動物を対象にしたものであり、動物の取り扱いに関しては生命倫理に配慮し、岐阜大学動物実験指針に沿って行った。また、レポーターマウスを用いた実験は岐阜大学組み換え DNA 実験委員会に申請承認後に行った。

C. 研究結果

マウス大腸増殖性病変にも Lgr5 の発現が見られ、腺管の萌出する部位に高度な発現を認めた。また、交配によって得られた *Apc^{Min/+}* × *Lgr5-GFP knock-in mouse* には大腸腫瘍が自然発生し、生じた腺腫は β -catenin, Lgr5 が発現しているにもかかわらず、GFP(-)であった。

D. 考察

陰窩の複雑な分岐はマウス大腸前癌病変と考えられ

ている β -catenin accumulated crypt の特徴でもあり、萌出部の Lgr5 の発現は大腸前癌病変の発生に関係があると思われる。大腸早期増殖性病変および腺腫に Lgr5 は高発現しており、大腸発癌リスクの評価に用いることが可能と考えられた。*Apc^{Min/+}* × *Lgr5-GFP knock-in mouse* に生じた腺腫が Lgr5(+) となったにもかかわらず GFP 陰性となったのは不明であるが、一部の腺腫が Lgr5(-) の stem cell 由来である可能性も考えられた。

E. 結論

マウス大腸腫瘍で発現している Lgr5 は早期の増殖性病変でも発現しており、化学物質の短期検索系マーカーとして有望である。GFP 陰性の腺腫の存在は今回用いたシステムの限界など様々な要因が考えられ、十分な検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発に関する研究

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学 准教授

研究要旨

本研究は、化学物質の遺伝毒性と発がん性を包括的に検出可能な新しい中期肝発がんリスク評価法の開発を目的とし、既知遺伝毒性肝発がん物質を用いて、*in vivo* 変異原性の検索が可能な *gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験法の有用性を検討する。本年度は、遺伝毒性肝発がん物質である 2-acetylaminofluorene (2-AAF) の中期肝発がん性試験および変異原性試験を開始した。*gpt delta* ラットおよび F344 ラットを 6 群に分け、第 1、2、5 および 6 群は *gpt delta* ラット群、第 3 および第 4 群は F344 ラット群とした。第 1 群から第 4 群では、実験開始日に DEN を 200 mg/kg の用量で単回腹腔内投与し、2 週間後より 0 あるいは 50 ppm の 2-AAF 添加飼料を 6 週間与える。さらに、2-AAF 投与開始 1 週後に 2/3 部分肝切除を行う。第 5 および 6 群には実験開始後 2 週間は基礎飼料を与え、その後 0 あるいは 50 ppm の 2-AAF 添加飼料を 6 週間与える。投与終了後、第 1 から 4 群において、ラット肝前がん病変の指標である Glutathione S-transferase 陽性細胞巢を指標とし、2-AAF の *gpt delta* および F344 ラットにおける肝発がん性を比較検討する。また、*gpt delta* ラットにおいて *in vivo* 変異原性試験である *gpt* アッセイと Spi⁻アッセイを施行し、その変異原性を検討する。現在動物実験が進行中である。

A. 研究目的

化学物質の安全性を評価するためには、発がん性と変異原性の評価は必要不可欠である。しかし、現行の発がん性試験法と変異原性試験法にはそれぞれ問題点が存在している。標準の発がん性評価法の問題点として、動物試験だけでも 2 年間という長期的検討が必要であることと、莫大な経費および多数の動物数を要するため、多くの化学物質に対応することが困難であることなどがあげられる。一方、変異原性は *in vitro* 変異原性試験により決められてきたが、*in vitro* での試験が臓器特異性や代謝能を反映していないのが原因となって判定結果の不確実性を生じていることがあるのも事実であり、化学物質の変異原性を評価するためには *in vivo* 検出系が必要であると考えられる。よって、安全性評価に適した期間でかつ発がん性および遺伝毒性を包括的に評価できる試験法の確立が待たれている。

本研究では、化学物質の遺伝毒性と発がん性を包括的に検出可能な新しい中期肝発がんリスク評価法の開発を目的とし、既知遺伝毒性肝発がん物質を用いて、*in vivo* 変異原性の検索が可能な F344 系 *gpt delta* ラット（以下 *gpt delta* ラットと略す）を用いた中期肝発がん性試験法（伊東法）の発がん性および変異原性の包括評価における有用性を検討する。本年度では、遺伝毒性肝発がん物質である 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を用いて *gpt delta* ラットおよびその野生型であり、発がん性試験に汎用されている F344 ラットにお

ける肝発がん感受性を比較検討する。また、*gpt delta* ラットにおいて *in vivo* 変異原性試験である *gpt* アッセイと Spi⁻アッセイを施行し、2-AAF の変異原性を検討する。

B. 研究方法

1. 実験プロトコル

5 週齢の雄性 *gpt delta* ラット 30 匹および雄性 F344 ラット 20 匹（日本エスエルシー株式会社）を用いた。実験動物納入より 7 日間は、環境に適応させる期間とし、8 日目より実験を開始した。その間の飲料水は水道水とし、基礎飼料として MF 粉末（オリエンタル酵母）を使用した。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリヤーステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24 ± 2 度、湿度 50 ± 10%、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。

実験の第 1、2、5 および 6 群は *gpt delta* ラット 10 又は 5 匹ずつ、第 3 および第 4 群は F344 ラット 10 匹ずつ分ける。第 1 群から第 4 群に実験開始日に DEN を 200 mg/kg の用量で単回腹腔内投与し、2 週間後より 0 あるいは 50 ppm の 2-AAF 添加飼料を 6 週間与える。さらに、実験開始 3 週目に 2/3 部分肝切除を行う。第 5 および 6 群には実験開始後 2 週間は基礎飼料を与え、その後 0 あるいは 50 ppm の 2-AAF 添加飼料を 6 週間与える。なお、第 5 および 6 群には 2/3 部分肝切除を行わない。

全動物は、一般状態を毎日観察し、週 1 回体重、飲水量および摂餌量を測定した。実験開始より 8 週

間後に、全動物を麻酔下で、腹部大動脈から採血後に脱血致死させ、屠殺・剖検を行い、肝臓を摘出し、重量を測定する。また、肝臓の一部は、速やかに液体窒素中で凍結し、解析まで-80℃にて保存する。全群において肝臓のホルマリン固定パラフィン標本を作製し、病理組織学的検討ならびに胎盤型

Glutathione S-transferase (GST-P)の免疫組織化学的検討を行う。また、*gpt delta* ラット群においては、点突然変異を検出する *gpt assay* および欠失変異を検出する *Spi-* assay を行う。

2. 肝臓の免疫組織化学的検査

肝臓の前がん病変マーカーである胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) をABC法にて免疫染色を行う。GST-P 陽性細胞巢の個数および面積を病理標本画像解析装置 IPAP-WIN [住化テクノサービス株式会社] を用いて計測し、肝臓切片 1cm²当りの GST-P 陽性細胞巢 (直径 0.2mm 以上) の個数および面積を算出し、定量的解析を行う。

3. *gpt* および *Spi-*アッセイ

gpt アッセイでは、肝臓凍結組織から RecoverEase™ DNA Isolation Kit を用いて DNA を抽出する。*in vivo* パッケージングには、Transpack Packaging Extract を用いて、抽出した DNA からトランスジーン λ EG10 をファージ粒子として回収する。Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株の菌液に回収したファージを加え、37℃ 20min (静置) の後、37℃ 20min (振とう) にて回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させる。感染後の YG6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37℃ で 2 日間培養を行い、*gpt* 遺伝子が不活化している変異体のコロニーを得る。また、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数は 6-TG を含まない M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数によって求める。突然変異数は、6-TG を含む寒天培地にまいて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数で除して算出する。

*Spi-*アッセイでは、*in vivo* パッケージングによりファージを回収するまでの手法は *gpt* アッセイと同様に行う。P2 溶原菌に回収したファージを加え、37℃ 20min (静置) により回収したファージを P2 溶原菌に感染させた後、λ トリプティック寒天培地にまいて 37℃ で一晚培養し、*Spi-*変異体プラークを得る。また、非溶原菌に感染させ、全ファージが溶菌してプラーク作ることにより回収プラーク数を求める。突然変異体頻度は変異プラーク数を回収ファージ数で除して算出する。

4. 倫理面への配慮

動物実験は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設において行われ、動物実験の開始前には実験

計画書を大阪市立大学実験動物委員会に提出し、その承諾を得た上で動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないために麻酔下にて実施する。

5. 統計学的解析

体重、摂餌量、臓器重量、前がん病変および遺伝子の変異頻度の平均値について F 検定による等分散検定を行う。等分散の場合は Student's t-test 検定を行い、不等分散の場合は Welch t-test 法による両側検定を行う。

C. 研究結果

本年度は、動物実験の事前準備を終え、動物およびその他の必要物資を確保した。現在、試験開始前の馴化飼育中である。

D. 考察

現在、実験を開始したところで考察を要する事項がないが、本実験で得られる結果は *gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験法の発がん性および遺伝毒性の包括評価における有用性に関する基礎的なデータが得られるものと期待される。

E. 結論

本研究は、化学物質の遺伝毒性と発がん性を包括的に検出可能な新しい中期発がんリスク評価法を開発することを目的とし、既知の遺伝毒性肝発がん物質の肝発がん性を *gpt delta* ラット肝中期発がん性試験法を用いて検索し、合わせて *in vivo* 変異原性を検索するものである。本年度は、遺伝毒性肝発がん物質である 2-AAF の *gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験および変異原性試験を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakatani S, Kakehashi A, Ishimura E, Yamano S, Mori K, Wei M, Inaba M, Wanibuchi H. Targeted proteomics of isolated glomeruli from the kidneys of diabetic rats: Sorbin and SH3 domain containing 2 is a novel protein associated with diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res.* in press.

2) Xie XL, Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Tajiri M, Wanibuchi H. 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) promotes mouse hepatocarcinogenesis by activating

transforming growth factor- β and Wnt/ β -catenin signaling pathways. Toxicol Sci. in press.

3) Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Kakehashi A, Mori K, Nishizawa Y, Inaba M, Wanibuchi H. Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephronectin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transpl. in press.

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 助教

研究要旨

本研究ではマウスおよびラットの化学物質誘発肺腫瘍モデルでの早期病変における将来の悪性化を推定可能なマーカーの検索を目的とする。肺増殖性病変の起源に着目し、クララ細胞のマーカーである Clara cell secretory protein (CCSP) と II 型肺胞上皮細胞のマーカーである Pulmonary Surfactant Protein C (SP-C) を含めた多種のマーカーについての検討を予定している。これは肺発癌の早期病変における組織型の判別に有用と期待されるが、現在実験準備中である。

A. 研究目的

ラットの肺腫瘍誘発物質としては、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) (2 週間の飲水投与) が知られている。しかし、肺腫瘍発生までには約 30 週間と長期を要する。マウスにおいては、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の腹腔内投与による肺腫瘍モデルが存在するが、これも最短で 12 週間を要する。

これらのモデルにおいて、早期に過形成性病変が出現するが、将来、軽快するものと悪性化するものが混在している。本研究では肺発癌の早期病変における将来の悪性化を予想することが可能なマーカーの検索を目的とする。このマーカーの同定により、物質の発癌修飾作用についての評価を現状より短期間で行うことができること期待される。同時に、早期病変で起こる悪性化のメカニズムについて、新たな病理組織学的知見を得られる可能性がある。本年度は、肺増殖性病変の起源に着目し、クララ細胞のマーカーである Clara cell secretory protein (CCSP) と II 型肺胞上皮細胞のマーカーである Pulmonary Surfactant Protein C (SP-C) を含めた多種のマーカーについて、NNK 誘発マウス肺腫瘍、N-nitrosotris-(2-chloroethyl) urea (NTCU) 腹腔内投与により誘発された肺扁平上皮異形成、および DHPN 誘発ラット肺腫瘍について検討を行う。

B. 研究方法

NNK 誘発マウス肺腫瘍（腺系腫瘍、16 週）および NTCU 誘発マウス肺扁平上皮異形成（20 週）、DHPN ラット肺腫瘍（腺系腫瘍、30 週）の固定標本を用い、SP-C および CCSP について二重免疫染色を行う。さらに、多種のマーカーについて検討を行う。

（倫理面への配慮）

動物実験に先立ち、香川大学、総合生命科学研究センター、動物実験部門の動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理する。

C. 研究結果

現在、実験準備中である。検討予定のマーカーとして、CCSP、SP-C、Ki67、PCNA、CK7、CK20、SP-A、CK 34 βE12、TTF-1、p53、CK5/6、EGF-R、Estrogen R、Progesterone R、CEA、NapsinA、P16、P27、EGF-R、cyclinD1 を予定している。

D. 考察

現在、実験準備中である。

E. 結論

肺発癌過程での早期病変の組織型の判別に有用なマーカーの検索を予定しており、現在、実験準備中である（一部の実験は進行中である）。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし。
2. 学会発表
特になし。

G. 知的所有権の出願・登録状況 （予定を含む）

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発

研究分担者 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター
病理部実験病理学 部長

研究要旨

短・中期に遺伝毒性を予測できる指標の検索を目的とし、ラット膀胱について、遺伝毒性物質（BBN など）誘発増殖性病変と非遺伝毒性物質（Uracil、Isothiocyanate 類など）誘発増殖性病変の初期像において、DNA 損傷マーカーを病理組織学的・免疫組織学的に比較し、リスク評価に資するアッセイ系の開発を検討する。

A. 研究目的

ラット膀胱について、遺伝毒性物質（BBN など）誘発増殖性病変と非遺伝毒性物質（Uracil、Isothiocyanate 類など）誘発増殖性病変の初期像を病理組織学的・免疫組織学的に比較し、遺伝毒性を予測できる指標を検討することとする。

B. 研究方法

ラット膀胱では、単純性過形成および乳頭状/結節状過形成などの過形成性病変が、比較的早期より観察される。これらの早期病変と既知の化学発がん物質誘発癌病変において、各種 DNA 損傷修復酵素や細胞増殖制御因子について免疫組織学的に比較検討し、早期においても、癌病変と類似のパターンを示す病変の有無について検討する。特に、修復酵素と増殖因子を共発現する細胞の有無について解析する。本年度は、指標となりうる分子やその抗体を我々の過去のデータ・標本および文献より検討し、免疫組織化学染色に利用可能な抗体の選定を行った。

（倫理面への配慮）本年度は、動物試験は実施しなかった。

C. 研究結果

我々の過去のデータより 3%のウラシル混餌食によるラット膀胱増殖性病変においては、DNA 損傷修復酵素のうち、MGMT の mRNA 発現はむしろ低下しており、OGG1、MSH2 および MTH1 の発現は明らかな変化は示さなかった。近年 H2AX は DNA2 本鎖損傷のバイオマーカーとして注目されており、複数の文献が見られている。膀胱における免疫染色による評価を目指して、準備を進めている。

D. 考察

DNA 損傷は、最大で 50 万回/細胞/日おこり、その損傷パターンも 100 種類以上あるとされている。その損傷に対応する修復酵素は特異的であり、1 本鎖損傷の直接消去、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復および 2 本鎖損傷の相同組み換え、非相同末端再結合などがある。なかでも、2 本鎖損傷は特に重大な損傷であり、修復時に変異の原因となりうるとされている。近年 H2AX は DNA2 本鎖損傷のバイオマーカーとして注目されている。これら

の遺伝子損傷修復に関わる因子の発現についての遺伝毒性発がん物質に暴露された組織での検討は、発がん性を短期に検討する指標として期待される。

E. 結論

MGMT、OGG1 等のみならず、H2AX をはじめとする DNA2 本鎖損傷マーカーの病理組織を用いた *in vivo* 遺伝毒性評価への応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

【参考文献】

- Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008;22:305-9.
- Smart DJ, Ahmedi KP, Harvey JS, Lynch AM. Genotoxicity screening via the γ H2AX by flow assay. *Mutat Res*. 2011;715:25-31.
- Kawanishi M, Watanabe T, Hagio S, Ogo S, Shimohara C, Jouchi R, Takayama S, Hasei T, Hirayama T, Oda Y, Yagi T. Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Mutagenesis*. 2009;24:279-84.

網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価

研究分担者 戸塚ゆ加里 国立がん研究センター研究所・発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験を用いた方法では化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要である。そこで本研究では、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行なった。アルキル化試薬の *N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU) と市販のウシ胸腺 DNA (ctDNA) を試験管内で反応させ、DNA アダクトーム法を用いて、生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。その結果、ctDNA に存在しない 16 種類の DNA 付加体が生成されることがわかった。そのうちの一つは、既知の付加体である *O*⁶-メチル-2'-デオキシグアノシン (*O*⁶MedG)である可能性が、*m/z* 値より示唆された。他の未報告の DNA 付加体については、精密質量を利用した元素組成解析やフラグメントイオンの分析を行うことで化学構造を推測する必要がある。以上の結果から、化学物質と ctDNA の *in vitro* 反応系を DNA アダクトーム法により評価することで、化学物質の DNA に対する反応性を簡便に解析することができるものとして期待された。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験（変異原性試験）、コメットアッセイ (DNA 損傷試験)、小核試験（染色体異常試験）などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考えられる。そこで本研究では、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめる。

B. 研究方法

実験動物において発がん性が報告されているアルキル化試薬の *N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU, 100 mM) と市販のウシ胸腺 DNA (ctDNA, 1.5 mg/mL) を試験管内で 37 °C, 14 時間反応させ、DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOF MS に供した。Waters 社が提供するソフトウ

エア MarkerLynx を用い、分析データから DNA 付加体の候補となりうるピークを抽出した。また、デオキシリボヌクレオチドに特徴的なニュートラルロス -116.04736 を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように解析系をデザインした。各ピークの *m/z*、保持時間、面積値から DNA 付加体マップを作製した。

（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

本年度はまず、*in vitro* モデル反応系において生成される既知および未知 DNA 付加体の解析について行なった。NMU-ctDNA をアダクトーム法により解析した結果、native な ctDNA に存在しない DNA 付加体が 16 個見出された（図 1）。そのうちの一つは、既知の付加体である *O*⁶-メチル-2'-デオキシグアノシン (*O*⁶MedG)である可能性が、*m/z* 値より示唆された。さ