

Table.4
gpt mutant frequencies in bladder mucosa

Treatment	Sample No.	Cm ^R colonies ($\times 10^5$)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Non-treatment	111+112	2.23	1	0.45	0.53 \pm 0.11
	113+121	2.05	1	0.49	
	122+123	2.15	1	0.47	
	131+132	1.36	1	0.73	
	133+141	4.45	4	0.45	
	142+143	1.76	1	0.57	
0.05% BBN	211+212	2.18	6	2.94	4.01 \pm 0.72*
	213+221	5.56	22	3.96	
	222+223	4.67	20	4.28	
	231+232	3.64	18	4.95	
	233+241	3.04	12	3.95	
2.5%Propolis	311+312	2.06	2	0.97	0.58 \pm 0.24
	313+321	2.42	1	0.41	
	322+323	2.66	2	0.75	
	331+332	1.98	1	0.51	
	333+341	5.02	2	0.40	
	342+343	2.42	1	0.41	
5.0%Sodium ascorbate	411+412	4.33	2	0.46	0.63 \pm 0.35
	413+421	4.25	4	0.94	
	422+423	4.34	6	1.38	
	431+432	4.13	1	0.24	
	433+441	6.77	4	0.59	
	442+443	5.33	1	0.19	

* :Significantly different from control group.

Table.5
Spi^r mutant frequencies in bladder mucosa

Treatment	Sample No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$)	Spi-Mutants	Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm SD
Non-treatment	111+112	0.42	2	0.48	0.49 \pm 0.19
	113+121	0.39	2	0.51	
	122+123	0.33	1	0.30	
	131+132	0.36	3	0.83	
	133+141	0.32	1	0.31	
	142+143	0.21	1	0.48	
0.05% BBN	211+212	0.20	9	4.54	4.23 \pm 0.54*
	213+221	0.16	8	5.03	
	222+223	0.49	19	3.89	
	231+232	0.34	13	3.85	
	233+241	0.29	11	3.84	
2.5% Propolis	311+312	0.28	1	0.36	0.41 \pm 0.10
	313+321	0.48	2	0.42	
	322+323	0.20	1	0.50	
	331+332	0.66	2	0.30	
	333+341	0.59	2	0.34	
	342+343	0.18	1	0.57	
5.0% Sodium ascorbate	411+412	0.22	1	0.45	0.51 \pm 0.24
	413+421	0.21	2	0.97	
	422+423	0.21	1	0.47	
	431+432	0.24	1	0.42	
	433+441	0.42	2	0.47	
	442+443	0.35	1	0.29	

* :Significantly different from control group.

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）
分担研究報告書

遺伝子のメチル化異常に関する研究

研究分担者 辻内俊文 近畿大学 教授

研究要旨

本研究は、種々の被検物質を WB-F344 細胞に処理し、LPA 受容体の発現パターンと細胞運動能を指標に、被検物質におけるイニシエーション・プロモーション作用、DNA メチル化異常などの毒性を短期に検出する系を確立し、食品添加物として含まれる種々の化合物の安全性評価に応用することを目的とする。今回は、過酸化水素(H_2O_2)とエストロゲンを用いて LPA 受容体の発現パターンと細胞運動能に及ぼす影響を検索した。その結果、 H_2O_2 とエストロゲン処理により、WB-F344 細胞の細胞運動能上昇には LPA3 が、細胞運動能低下には LPA1 が関与することが明らかとなった。

A. 研究目的

がんを含む種々の疾患に起因する遺伝子変異には、DNA 分子の塩基配列そのものに変化を生じる genetic な変異と、塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現に異常をきたす DNA メチル化異常などの epigenetic な変異がある。これまでの研究では、ヒト症例や動物実験で作成した病変を用いた遺伝子変異の検索が主流で多くの関連遺伝子の同定が行われてきた。一方、培養細胞系を用いたこれら異常を引き起こす物質の簡便な同定法はいまだ開発されていない。最近我々は、発がんプロモーターである TPA (12-O-tertadecanolphorbol-13-acetate) を低濃度でラット肝上皮細胞(WB-F344)に処理すると、リゾフォスファチジン酸受容体-3(LPA3)を介して細胞運動能が亢進することを報告した。

本研究は、種々の被検物質を WB-F344 細胞に処理し、LPA 受容体の発現パター

ンと細胞運動能を指標に、被検物質におけるイニシエーション・プロモーション作用、DNA メチル化異常などの毒性を短期に検出する系を確立し、食品添加物として含まれる種々の化合物の安全性評価に応用することを目的とする。

今回は、過酸化水素(H_2O_2)とエストロゲンを用いて LPA 受容体の発現パターンと細胞運動能に及ぼす影響を検索した。

B. 研究方法

培養細胞は、ラット肝上皮細胞 (WB-F344)を用い、10%FBS 含有 DMEM 培地で $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 の条件下にて培養した。前処理として、細胞に H_2O_2 、 17β -estradiol(E_2)、ethinyl estradiol(EE)、diethylstilbestrol(DES)を種々の濃度で 24 時間ごとに 2 回処理した。細胞運動能の検索には、Cell Culture Insert(8.0 μ m pore size)を用い、upper chamber には被検物質で処理した細胞を播き、lower chamber に

は5%charcoal stripped FBSを加え、24時間培養後に lower chamber に移動した細胞を計測した。LPA 遺伝子発現解析には被検物質で処理した細胞より RNA を抽出した後に cDNA を作製し、real-time RT-PCR 法を行った。倫理面への配慮に関して本研究には該当するものはない。

C. 研究結果

- (1) H₂O₂ 濃度依存性に細胞運動能の有意な上昇が見られた。H₂O₂ 無処理の細胞に比して、処理した細胞では LPA3 遺伝子発現の有意な上昇が見られた。WB-F344 の LPA3 ノックアウト細胞 (WB-shRNA3-1) では、H₂O₂ 処理による細胞運動能の上昇が抑制された。
- (2) E₂ 処理した細胞では、無処理の細胞に比して LPA1 と LPA3 遺伝子発現の有意な上昇が見られ、細胞運動能の著明な上昇が見られた。
- (3) EE 処理した細胞では、無処理の細胞に比して LPA3 遺伝子発現の有意な上昇が見られ、細胞運動能の著明な上昇が見られた。
- (4) DES 処理した細胞では、無処理の細胞に比して LPA1 遺伝子発現の有意な上昇が見られ、細胞運動能の著明な低下が見られた。
- (5) E₂ および EE 処理した LPA3 ノックダウン細胞では、細胞運動能の上昇が抑制された。一方、E₂ および DES 処理した LPA1 ノックダウン細胞では、細胞運動能の低下が抑制された。

D. 考察

炎症巣で発生する活性酸素はがん細胞の増殖・浸潤・転移に促進的に作用することが知られている。本研究で用いた過

酸化水素は、活性酸素の発生源として幅広く使用されている。本研究結果より H₂O₂ で処理した WB-F344 細胞の運動能は有意に上昇し、同時に LPA3 発現も増加することから、LPA3 発現と運動能上昇を示す化学物質には、がん細胞の増殖・浸潤・転移に対して促進的に作用する可能性が示唆された。

エストロゲンと乳がん発生との関連についてこれまでに多くの知見がある。本研究で用いた E₂ には腎発がん作用、EE には肝発がんプロモーション作用、DES には生殖器に対する発がん性をそれぞれ有する。これらエストロゲンを WB-F344 細胞に処理すると、それぞれが異なる LPA 受容体発現とそれに伴う運動性の変化を示した。これら WB-F344 細胞に対する反応性の差異をもたらす原因は不明であるが、それぞれの発がん標的臓器の違いに関連性があるかもしれない。今後はさらに多くの発がん物質を用いた検索をする必要がある。

E. 結論

H₂O₂ とエストロゲン処理により、WB-F344 細胞の細胞運動能上昇には LPA3 が、細胞運動能低下には LPA1 が関与することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shibata A, Tanabe E, Inoue S, Kitayoshi M, Okimoto S, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Tsujiuchi T.

- Hydrogen peroxide stimulates cell motile activity through LPA receptor-3 in liver epithelial WB-F344 cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 (433) 317-321.
2. Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Regulation of cell motile activity through the different induction of LPA receptors by estrogens in liver epithelial WB-F344 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 (428) 105-109.
 3. Yoshikawa K, Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Okimoto S, Fukushima N, Tsujiuchi T. Involvement of oncogenic K-ras on cell migration stimulated by lysophosphatidic acid receptor-2 in pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res.* 2013 (319) 105-109.
 4. Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Shibata A, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 suppresses cell migration activity of human sarcoma cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012. DOI: 10.3109/10799893.2012.738689.
 5. Fukui R, Kato K, Okabe K, Kitayoshi M, Tanabe E, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of drug resistance by lysophosphatidic acid receptor-3 in mouse mammary tumor FM3A cells. *J Toxicol Pathol.* 2012 (25) 225-228.
 6. Matunami M, Miki T, Nishiura K, Hayashi Y, Okawa Y, Nishikawa H, Sekiguchi F, Kubo L, Ozaki T, Tsujiuchi T, Kawabata A. Involvement of the endogenous hydrogen sulfide/Cav3.2 T-type Ca²⁺ channel pathway in cystitis-related bladder pain in mice. *Br J Pharmacol.* 2012. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02060x
 7. Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Tsujiuchi T, Kido A, Tsukamoto S, Mori T, Tanaka Y. Comparison of gene expression profiling in sarcoma and mesenchymal stem cells identifies tumorigenic pathways in chemically induced rat sarcoma model. *ISRN Oncol.* 2012 DOI: 10.5402/2012/909453.
 8. Fukui R, Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Negative regulation of cell motile and invasive activities by lysophosphatidic acid receptor-3 in colon cancer HCT116 cells. *Tumor Biol.* 2012 (33) 1899-1905.
 9. Kato K, Yoshikawa K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Opposite roles of LPA₁ and LPA₃ on cell motile and invasive activities of pancreatic cancer cells. *Tumor Biol.* 2012 (33) 1739-1744.

10. Kitayoshi M, Fukui R, Tanabe E, Kato K, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Different effects on cell proliferation and migration abilities of endothelial cells by LPA₁ and LPA₃ in mammary tumor FM3A cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012 (32) 209-213.
11. Kitayoshi M, Kato K, Tanabe E, Yoshikawa K, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of endothelial cell migration by constitutively active LPA₁-expressing tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 (422) 339-343.
12. Furuta D, Yamane M, Tsujiuchi T, Moriyama R, Fukushima N. Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA₃. *Mol Cell Neurosci.* 2012 (50) 21-34.
13. Kato K, Fukui R, Okabe K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Constitutively active lysophosphatidic acid receptor-1 enhances the induction of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 (417) 790-793.
14. 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.

15. 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.

2. 学会発表

1. 朴木寛弥、藤井宏真、城戸颯、塚本真治、辻内俊文. リゾフォスファチジン酸受容体阻害はヒト肉腫細胞の運動・浸潤能生を抑制する.第 71 回日本癌学会総会,平成 24 年 9 月 19~21 日,札幌.(日本癌学会誌プログラム, p.281)
2. 福嶋伸之、大久保慶、桑田聖平、辻内俊文、岩森正男. 卵巣がん細胞の生存および増殖に対する種々の脂肪酸の作用.第 85 回日本生化学会大会,平成 24 年 12 月 14~16 日,福岡.(日本生化学会誌プログラム, 3P-132)

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

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
山野 莊太郎、魏 民、加藤 実、 <u>鰐淵英機</u>	第 2 節 膀胱がんモデル動物	中村卓郎	ANIMAL MODELS 疾患モデルの作成と利用：がん	エル・アイ・シー	東京都	2012	560-568
加藤 実、魏 民、 <u>鰐淵英機</u>	尿路上皮腫瘍の遺伝子異常と予後との関連	都築豊徳、森永正二郎	腫瘍病理識別診断アトラス 腎盂・尿管・膀胱癌	株式会社文光堂	東京都	2012	237-244
<u>鰐淵英機</u> 、山野 莊太郎、魏 民	肺がんモデル		細胞工学 Vol.31 No.12	学研メディカル秀潤社	東京都	2012	1384-1389

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
Kato M, <u>Wei M</u> , Yamano S, Kakehashi A, Tamada S, Nakatani T, <u>Wanibuchi H</u> .	DDX39 acts as a suppressor of invasion for bladder cancer.	Cancer Sci		DOI: 10.1111/j.1349-7006	2012
<u>Wei M</u> , Kakehashi A, Yamano S, Tamano S, Shirai T, <u>Wanibuchi H</u> , Fukushima S.	Lack of Hepatocarcinogenicity of Combinations of Low Doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and Diethylnitrosamine in Rats: Indication for the Existence of a Threshold for Genotoxic Carcinogens.	J Toxicol Pathol	25	209-214	2012
Xie XL, <u>Wei M</u> , Yunoki T, Kakehashi A, Yamano S, Kato M, <u>Wanibuchi H</u> .	Long-term treatment with l-isoleucine or l-leucine in AIN-93G diet has promoting effects on rat bladder carcinogenesis.	Food Chem Toxicol	50	3934-3940	2012
Xie XL, <u>Wei M</u> , Kakehashi A, Yamano S, Okabe K, Tajiri M, <u>Wanibuchi H</u> .	Dammar resin, a non-mutagen, induces oxidative stress and metabolic enzymes in the liver of <i>gpt</i> delta transgenic mouse which is different from a mutagen, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline.	Mutat Res	748	29-35	2012
Punvittayagul C, Pompimon W, <u>Wanibuchi H</u> , Fukushima S,	Effects of pinocembrin on the initiation and promotion stages of rat hepatocarcinogenesis.	Asian Pac J Cancer Prev	13	2257-2261	2012

Wongpoomchai R.					
Chung K, Nishiyama N, Wanibuchi H, Yamano S, Hanada S, Wei M, Suehiro S, Kakehashi A.	AGR2 as a potential biomarker of human lung adenocarcinoma.	Osaka City Med J	58	13-24	2012
Kawai K, Li YS, Song MF, Ootsuyama Y, Kakehashi A, Wanibuchi H, Ootsuyama A, Norimura T, Kasai H.	Methionine sulfoxide stimulates hepatocarcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse: Possible role of free radical-mediated DNA methylation.	Gene and Environment	34	123-128	2012
Fukushima S, Wei M, Kakehashi A, Wanibuchi H.	Threshold for genotoxic carcinogens: The central concern in carcinogenic risk assessment.	Gene and Environment	34	153-156	2012
Hoshi H, Sawada T, Uchida M, Iijima H, Kimura K, Hirakawa K, Wanibuchi H.	MUC5AC protects pancreatic cancer cells from TRAIL-induced death pathways.	Int J Oncol	42	887-893	2013
Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsumi S.	Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly.	Sci Rep	3	1224, doi: 10.1038/ srep012 24	2013
Shibata A, Tanabe E, Inoue S, Kitayoshi M, Okimoto S, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Hydrogen peroxide stimulates cell motile activity through LPA receptor-3 in liver epithelial WB-F344 cell.	Biochem Biophys Res Commun	433	317-321	2013
Yoshikawa K, Tanabe E, Shibata A, Inoue S,	Involvement of oncogenic K-ras on cell migration stimulated by lysophosphatidic acid receptor-2 in pancreatic cancer cells.	Exp Cell Res	319	105-109	2013

Kitayoshi M, Okimoto S, Fukushima N, Tsujiuchi T.					
Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Regulation of cell motile activity through the different induction of LPA receptors by estrogens in liver epithelial WB-F344 cells.	Biochem Biophys Res Commun	428	105-109	2012
Fukui R, Kato K, Okabe K, Kitayoshi M, Tanabe E, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Enhancement of drug resistance by lysophosphatidic acid receptor-3 in mouse mammary tumor FM3A cells.	J Toxicol Pathol	25	225-228	2012
Matunami M, Miki T, Nishiura K, Hayashi Y, Okawa Y, Nishikawa H, Sekiguchi F, Kubo L, Ozaki T, Tsujiuchi T, Kawabata A.	Involvement of the endogenous hydrogen sulfide/Cav3.2 T-type Ca ²⁺ channel pathway in cystitis-related bladder pain in mice.	Br J Pharmacol.		DOI: 10.1111/ j.1476-5 381.201 2.02060 x	2012
Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Tsujiuchi T, Kido A, Tsukamoto S, Mori T, Tanaka Y.	Comparison of gene expression profiling in sarcoma and mesenchymal stem cells identifies tumorigenic pathways in chemically induced rat sarcoma model.	ISRN Oncol.		DOI: 10.5402/ 2012/90 9453	2012
Fukui R, Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Negative regulation of cell motile and invasive activities by lysophosphatidic acid receptor-3 in colon cancer HCT116 cells.	Tumor Biol	33	1899-19 05	2012
Kato K, Yoshikawa K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Opposite roles of LPA ₁ and LPA ₃ on cell motile and invasive activities of pancreatic cancer cells.	Tumor Biol	33	1739-17 44	2012
Kitayoshi M, Fukui R, Tanabe E, Kato K, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Different effects on cell proliferation and migration abilities of endothelial cells by LPA ₁ and LPA ₃ in mammary tumor FM3A cells.	J Recept Signal Transduct Res.	32	209-213	2012
Kitayoshi M, Kato K, Tanabe E, Yoshikawa K, Fukui R, Fukushima	Enhancement of endothelial cell migration by constitutively active LPA ₁ -expressing tumor cells.	Biochem Biophys Res Commun	422	339-343	2012

N, <u>Tsujiuchi T.</u>					
Furuta D, Yamane M, <u>Tsujiuchi T.</u> , Moriyama R, Fukushima N.	Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA3.	Mol Cell Neurosci.	50	21-34	2012
Kato K, Fukui R, Okabe K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukushima N, <u>Tsujiuchi T.</u>	Constitutively active lysophosphatidic acid receptor-1 enhances the induction of matrix metalloproteinase-2.	Biochem Biophys Res Commun.	417	790-793	2012
Okabe K, Hayashi M, Kato K, Okumura M, Fukui R, Honoki K, Fukushima N, <u>Tsujiuchi T.</u>	Lysophosphatidic acid receptor-3 increases tumorigenicity and aggressiveness of rat hepatoma RH7777 cells.	Mol. Carcinog		DOI: 10.1002/ mc.2185 1	2012
Hayashi M, Okabe K, Kato K, Okumura M, Fukui R, Fukushima N, <u>Tsujiuchi T.</u>	Different function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells.	Cancer Lett	316	91-96	2012

