

## 前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発

分担研究者 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した。我々は以前に、前立腺発がん物質である PhIP, DMAB を投与したラットにおいて、リン酸化ヒストン H2AX( $\gamma$ -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、PhIP, DMAB 以外の前立腺発がん物質 (MNU, BOP) あるいは前立腺以外に標的性を示す発がん物質 (DMN, MeIQx, DMH, DMBA) をラットに投与し、発がん標的臓器における $\gamma$ -H2AX 発現の特異性について検討した。また、 $\gamma$ -H2AX と同様に前立腺で有意な上昇を示す遺伝子として HMGB2, Ki-67 を抽出し、 $\gamma$ -H2AX と同様に検討した。その結果、今回検討したいずれの物質も前立腺における $\gamma$ -H2AX 標識率に有意差はみられなかった。HMGB2 では PhIP, DMAB, MNU, Ki-67 では PhIP, DMAB, MNU, BOP のすべての前立腺発がん物質で有意な上昇を認められたが、他の発がん物質では HMGB2, Ki-67 の両者とも対照群と差はみられなかった。以上の結果から、HMGB2 および Ki-67 標識率が前立腺発がん物質を検出するのに有用なマーカーである可能性が示唆された。また、前立腺以外の臓器における発がん標的の特異性について肝で検討した結果、HMGB2 および Ki-67 標識率は肝発がん物質で有意な上昇を示した。 $\gamma$ -H2AX 標識率は肝発がん物質 DMAB, MNU で上昇を認めず、発がん物質検出マーカーとして特異性に乏しい可能性が示唆された。

### 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 ( $\gamma$ -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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -H2AXの特異性を検討すると同時にマイクロアレイにて同様に上昇をした遺伝子として High mobility group box 2 (HMGB2)およびKi-67につい

ても解析を行った。また、これら3つの遺伝子について発がん標的の特異性を検討するに当たり、肝組織でも計測した。

### 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-oxo-propyl)amine (BOP)、前立腺以外の臓器に対する発がん物質として Dimethylnitrosamine (DMN)(標的臓器：肝、腎)、2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(MeIQx)(標的臓器：肝)、1,2-Dimethylhydrazine (DMH)(標的臓器：大腸)、7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA) (標的臓器：乳腺)を単回投与した。投与経路は、それぞれ皮下投与 (BOP, DMH)、胃内投与 (MeIQx, DMBA) もしくは腹腔内投与 (MNU, DMN) を用いた。投与 2 日後に前立腺、肝、腎、大腸を摘出し、ホルマリン固定および一部は凍結組織を採取した。免疫組織染色を行い、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

(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

前立腺腹葉、側葉および背葉における $\gamma$ -H2AX標識率は、MNUで上昇傾向を認めるものの有意差はみられなかった。BOPでは対照群と差がなかった。DMBA, MeIQx, DMHおよびDMNのいずれにおいても全ての葉で対照群との差は見られなかった。HMGB2標識率は、前立腺発がん物質PhIP

では発がん性を示す腹葉においてのみ有意な上昇を認め、DMABおよびMNUは全ての葉で有意な上昇を観察した。一方、BOP、DMBA、MeIQx、DMHおよびDMNでは全ての葉において対照群との差は見られなかった。Ki67標識率はPhIP、DMABでは腹葉、MNUでは背葉、BOPでは側葉および背葉において有意な上昇が観察された。一方、前立腺に標的性のない発がん物質DMBA、MeIQx、DMHおよびDMNはいずれも全ての葉で対照群との差は見られなかった。

一方、肝組織における $\gamma$ -H2AX、HMGB2およびKi-67標識率を検討した結果、肝発がん物質における $\gamma$ -H2AX標識率はMeIQx、DMNでは有意な上昇を認めたもののMNU、DMABでは差がみられなかった。一方、肝に標的性のない発がん物質PhIP、DMBA、BOPでは対照群と差がなかったもののDMHは有意な上昇を示した。HMGB2およびKi67標識率は肝発がん物質DMAB、MNU、MeIQxおよびDMNのいずれにおいても有意な上昇を示した。一方、肝に標的性のない発がん物質PhIP、BOPについては対照群と差がなかったものの、HMGB2ではDMBAで、Ki-67ではDMHにおいて有意な上昇を示した。

## D. 考察

免疫組織学的に $\gamma$ -H2AX、HMGB2およびKi-67標識率を算出して、前立腺発がん物質検出における特異性について検討した結果、HMGB2およびKi-67では比較的良好な結果が得られたが、 $\gamma$ -H2AXではMNU、BOPの両者を検出することは困難であった。さらに対照群の前立腺上皮における標識率は、HMGB2で20~30%、Ki-67で5%程度であったのに対し、 $\gamma$ -H2AXで0.02~0.05%と極めて低い値を示し、解析範囲による値の変動が大きくなる恐れがあり、検出マーカーとして使用するには不相当である可能性が示唆された。

肝発がん物質の観点からも検討したところ、今回検討したすべての肝発がん物質でHMGB2、Ki-67標識率の有意な上昇が観察された。肝標的性のない発がん物質DMBAはHMGB2標識率、DMHはKi-67標識率において有意な上昇がみられたが、HMGB2、Ki-67の両者では偽陰性は観察されなかったことから、発がん物質のスクリーニング系としては有用である可能性が示唆された。 $\gamma$ -H2AXではMeIQx、DMNで有意な上昇がみられたが、DMAB、MNUでは差がみられず、発がん物質検出系として利用するにはその特異性に問題があると考えられた。

## E. 結論

HMGB2 あるいは Ki-67 標識率を指標にした動物モデルは前立腺発がん物質の検出スクリーニングに有用であり、前立腺以外の臓器に対する発がん物質の検出にも利用できる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

外国語論文

- 1) Naiki, T., Takahashi, S. et al. Organ specific Gst-pi expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice. Prostate, 72:533-541, 2012.

- 2) Takahashi, S. et al. Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. Prostate, 70:1559-72, 2012.
- 3) Long, N., Takahashi, S. et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. Cancer Sci., 104:298-303, 2013.
- 4) Kobayashi, D., Takahashi, S. et al. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. Prostate, in press.
- 5) Tang, D., Takahashi, S., et al. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-(PhIP)-DNA adducts in benign prostate and subsequent risk for prostate cancer. Int. J. Cancer, in press.

## 2. 学会発表

- 1) 高橋智、前立腺がんの予防、市民公開講座「がん予防の最前線」、第19回日本がん予防学会、2012年6月、岐阜。
- 2) 龍訥、高橋智、他。ラット前立腺発がんに対する紫トウモロコシ色素の化学予防効果の検討、第19回日本がん予防学会、2012年6月、岐阜。
- 3) 鈴木周五、高橋智、他。内因性活性酸素誘導酵素NADPH oxidaseの阻害によるTRAPラットを用いた前立腺発癌に対する抑制効果、第19回日本がん予防学会、2012年6月、岐阜。
- 4) 鈴木周五、高橋智、他。Inhibition of NADPH oxidase, an endogenous superoxide inducer, suppresses prostate cancer progression、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月、札幌。
- 5) 佐藤慎哉、高橋智、他。OBP-801, histone deacetylase inhibitor, suppressed prostate cancer growth through downregulation of androgen receptor、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月、札幌。
- 6) 鈴木周五、高橋智、他。NADPH oxidase 阻害剤 apocynin による前立腺発癌抑制効果、第29回日本毒性病理学会、2013年1月、つくば。
- 7) 佐藤慎哉、高橋智、他。HDAC 阻害剤 OBP-801 による前立腺癌予防作用の検討、第29回日本毒性病理学会、2013年1月、つくば。

## 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。