

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 病理部

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、既知の遺伝毒性物質 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) 投与ラット膀胱粘膜の正常様粘膜、過形成粘膜および悪性腫瘍組織における各種 DNA 損傷修復関連マーカーの発現を免疫組織化学的に無処置ラット膀胱粘膜と比較検討した。無処置粘膜においても複数の DNA 損傷修復酵素の発現が見られた一方で、2 重鎖切断のマーカーである γ -H2AX については、無処置粘膜には認められず、BBN 投与ラットの増殖性病変のみならず、正常様粘膜上皮においても核内に顆粒状陽性巣が観察された。このことから、 γ -H2AX は BBN 等の遺伝毒性物質の暴露指標となる可能性が示唆された。

A．研究目的

化学物質のリスク評価において、個体における遺伝毒性の有無は最も重要な因子の 1 つである。そこで今回我々は、ラット膀胱について、遺伝毒性物質による腫瘍誘発を早期に検出できる系の確立を目的とし、BBN 投与ラット膀胱について、複数の DNA 損傷修復酵素の発現様式を検討した。

B．研究方法

種々の DNA 損傷修復関連マーカーの発現動態について、F344 ラットに遺伝毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) を投与した膀胱の正常様組織～過形成粘膜および癌組織、ならびに、無処置ラット膀胱粘膜において比較検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、2 重鎖切断のマーカーである γ -H2AX, MRE11, XRCC1、直接損傷修復に関わる MGMT、ミスマッチ修復に関わる MLH1, MSH6、塩基除去修復に関わる APE1、ヌクレオチド除去修復に関わる DDB1, ERCC1、校正修復に関わる TREX1、細胞周期チェックポイントのマーカーである SMC1 および複製後修復に関わる RAD18 について、免疫組織化学染色を行い、発現様式について検討した。(表 1, 2)

C．研究結果

免疫組織化学染色の結果、1) 本研究で検索した DNA 修復酵素の多くは、無処置ラットの膀胱粘膜上皮にも恒常的に発現しており、BBN 投与による変化は見られなかった。2) MGMT は BBN 投与後の正常様～過形成性粘膜で発現が認められる一方、癌細胞では陰性であった。3) γ -H2AX は対照動物では陰性であるのに対し、BBN 投与後の膀胱では、癌組織や過形成粘膜など増殖性細胞のみならず、正常様粘膜上皮においても核内に顆粒状陽性巣がみられた。以上の結果から、BBN による膀胱発がん機序には MGMT および γ -H2AX 発現が関与する可能性が示唆された。(図 1-4)

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機序は特異的であり、複数の経路が知られている。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かとされている。今回、ヒストン H2AX タンパクセリン 139 のリン酸化型である γ -H2AX が BBN 投与ラット膀胱粘膜の核において、広く発現が見られたことから、遺伝毒性の指標としての可能性が示唆された。今後、非遺伝毒性物質暴露膀胱における発現様式との比較が必要と考える。

E．結論

γ -H2AX は BBN 等の遺伝毒性物質の暴露指標となる可能性が示唆された。

F．研究発表

1．論文発表

1) Toyoda T, Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Onami S, Suzuki I, Ogawa K. Detection of γ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats. J Toxicol Pathol, in press.

2．学会発表

特になし

G．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

表 1. 使用した抗体と染色条件

Antigen	Clonality (clone)	Host species	Dilution	Supplier
γ -H2AX	Poly	Rabbit	1:10	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
MRE11	Poly	Rabbit	1:500	Cell Signaling Technology
XRCC1	Mono (33-2-5)	Mouse	1:100	Abcam, Cambridge, MA
MGMT	Mono (SPM287)	Mouse	Ready-to-use	Abcam
MLH1	Mono (EPR3894)	Rabbit	1:250	Abcam
MSH6	Mono (44)	Mouse	1:100	Abcam
APE1	Mono (13B8E5C2)	Mouse	1:5000	Abcam
DDB1	Mono (EPR6089)	Rabbit	1:250	Abcam
ERCC1	Mono (8F1)	Mouse	1:500	Abcam
TREX1	Poly	Rabbit	1:100	Abcam
SMC1	Mono [EPR2879(2)]	Rabbit	1:500	Abcam
RAD18	Mono	Mouse	1:1000	Abcam

表 2. DNA 損傷マーカーの発現様式

Class	Proteins	Control group		BBN-treated group	
		Urothelium	Mesenchymal cells	Normal-appearing and hyperplastic urothelium	Carcinoma
Double-strand breaks	γ -H2AX	-	-	+	+
	MRE11	+	+	++	++
	XRCC1	+	+	+	+
Direct damage reversal	MGMT	-	-	+	-
Mismatch repair	MLH1	±	±	+	+
	MSH6	+	±	+	+
Base excision repair	APE1	++	++	++	++
Nucleotide excision repair	DDB1	++	++	++	++
	ERCC1	±	-	+	+
Proof-reading repair	TREX1	+	++	++	++
Cell cycle checkpoint	SMC1	++	++	++	++
Post replication repair	RAD18	++	++	++	++

-, Almost negative; ±, scattered positive; +, occasionally positive; ++, extensively positive.

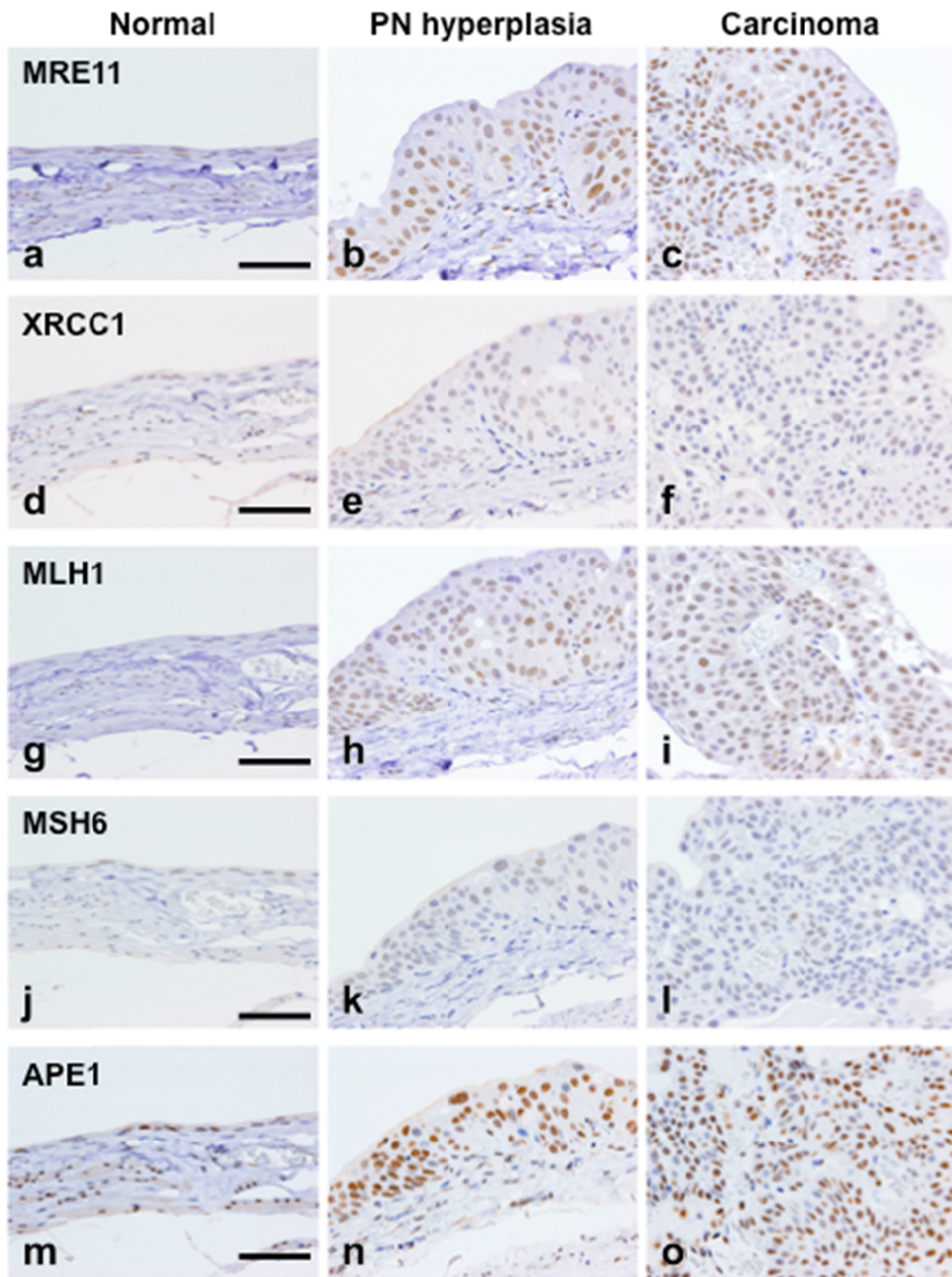


図1 . DNA 二重鎖切断、ミスマッチ修復、塩基除去修復に関する DNA 損傷修復酵素の免疫組織化学染色像. (a, d, g, j, m) 無処置対照ラット膀胱粘膜、(b, e, h, k, n) BBN 投与ラットの PN 過形成および (c, f, i, l, o) BBN 投与ラットの移行上皮癌. (a-c) MRE11. (d-f) XRCC1. (g-i) MLH1. (j-l) MSH6. (m-o) APE1. Bars = 50 μ m.

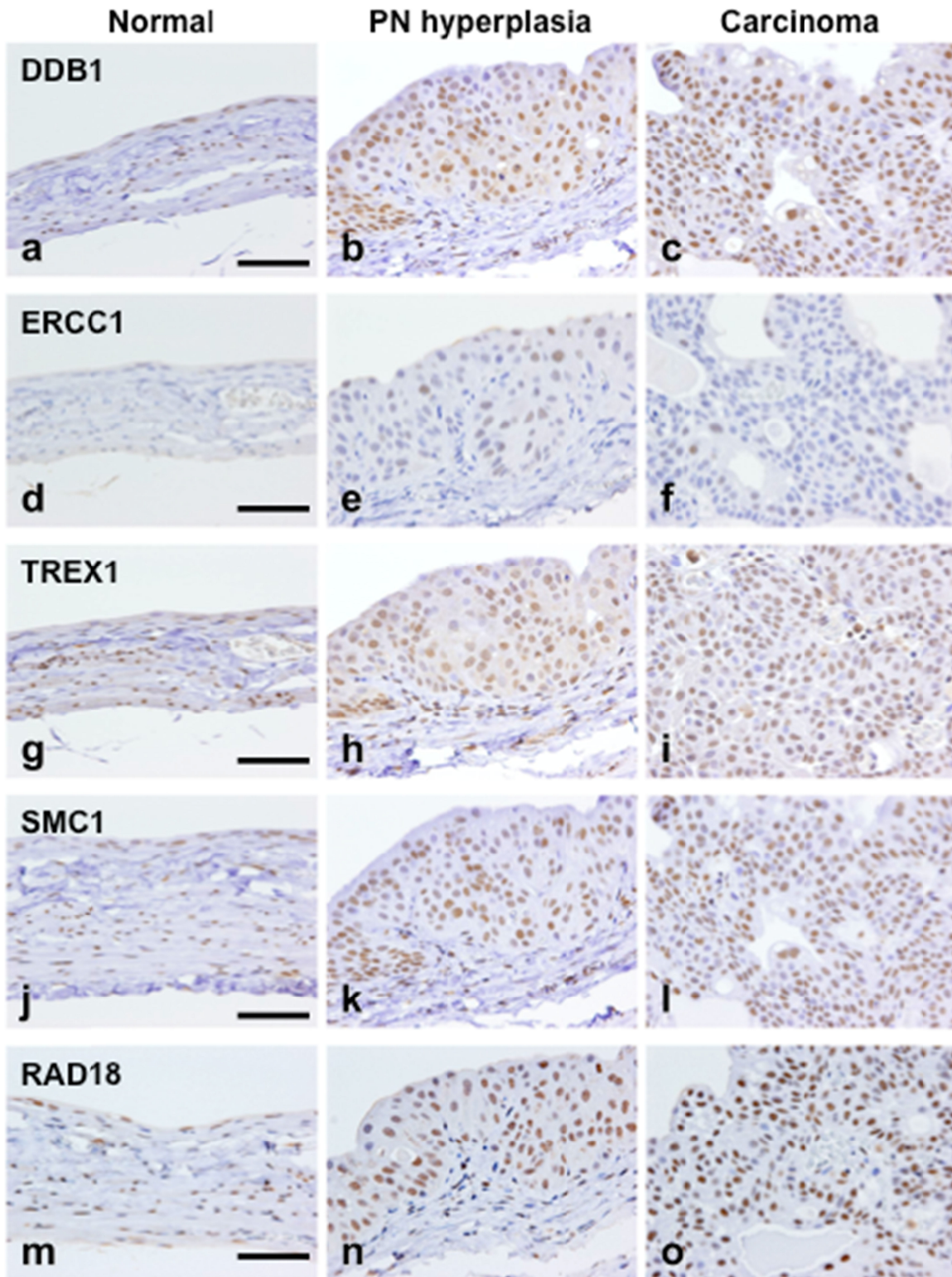


図2 .ヌクレオチド除去修復、校正修復、細胞周期チェックポイントおよび複製後修復に関する DNA 損傷修復酵素の免疫組織化学染色像. (a, d, g, j, m) 無処置対照ラット膀胱粘膜、(b, e, h, k, n) BBN 投与ラットの PN 過形成および (c, f, i, l, o) BBN 投与ラットの移行上皮癌. (a-c) DDB1. (d-f) ERCC1. (g-i) TREX1. (j-l) SMC1. (m-o) RAD18. Bars = 50 μ m.

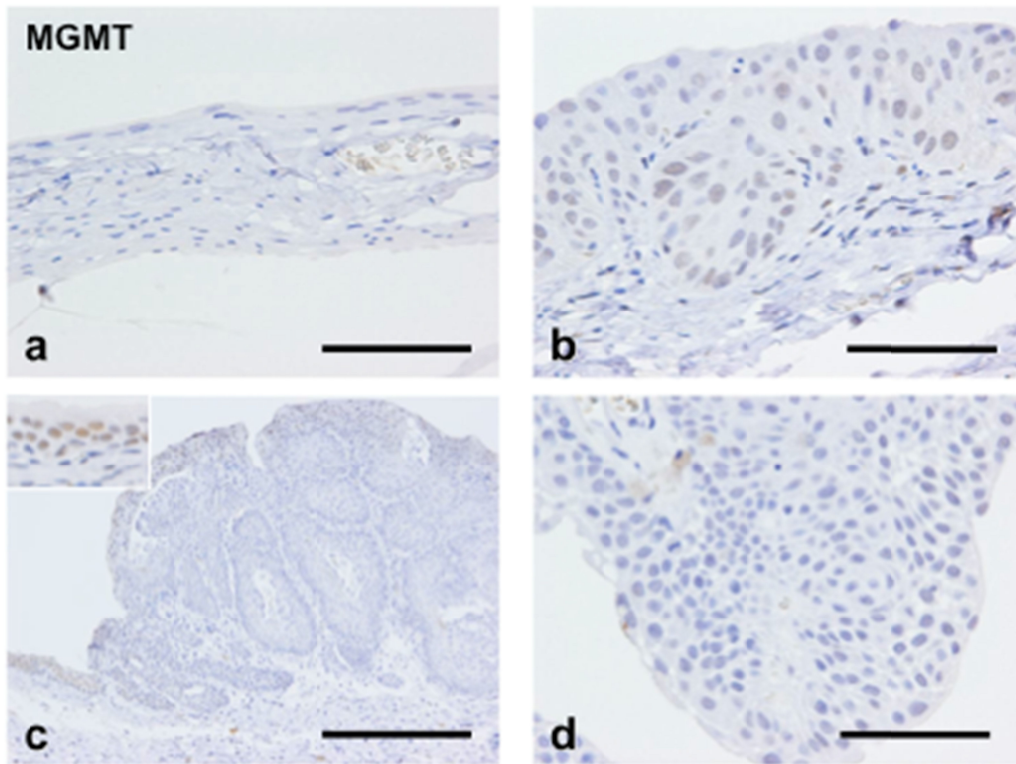


図3 . MGMT の免疫組織化学染色像 . (a) 無処置対照ラット膀胱粘膜、(b) BBN 投与ラットのPN 過形成および (c,d) BBN 投与ラットの移行上皮癌 . 過形成 (b) や表層の上皮細胞 (c,挿入図) は陽性を示すが、癌組織 (c,d) においてはほぼ陰性である . Bars = 50 (a,b and d) or 200 (c) μm

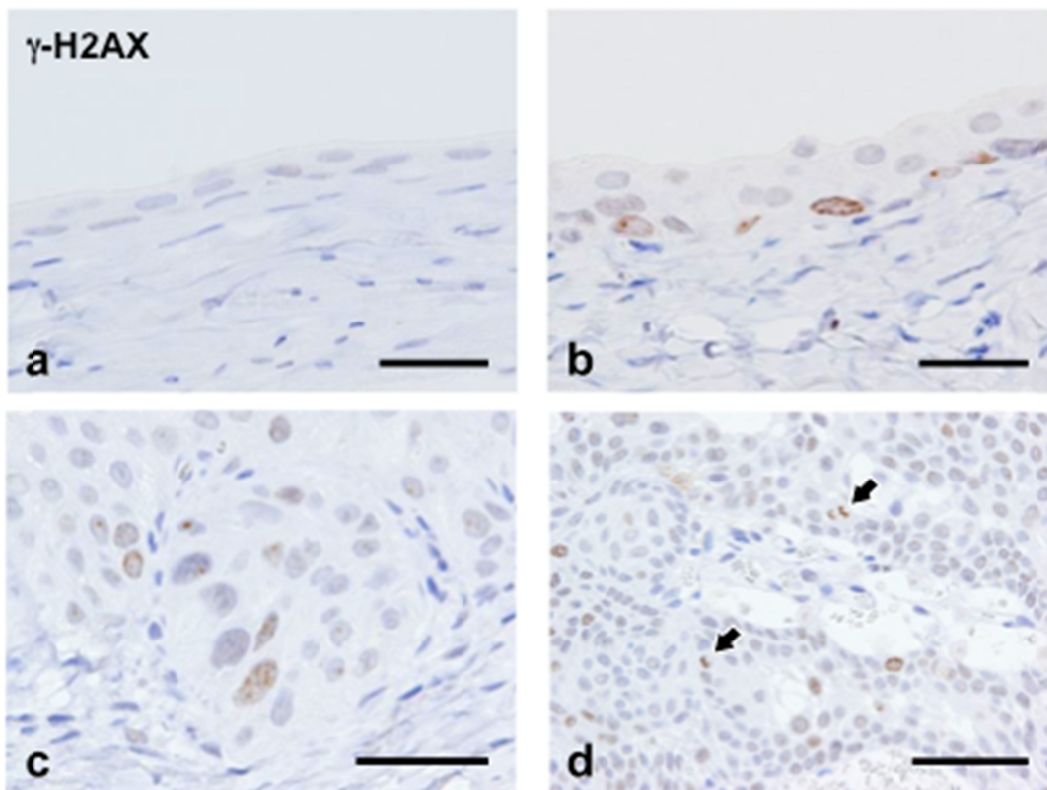


図4 . γ -H2AX の免疫組織化学染色像 . (a) 無処置対照ラット膀胱粘膜、(b) BBN 投与ラットの正常様膀胱粘膜 (c) BBN 投与ラットのPN 過形成および (d) BBN 投与ラットの移行上皮癌 . 無処置ラットでは陰性であるが、BBN 投与ラットの正常様粘膜上皮には陽性細胞が観察される . また、分裂期細胞 (矢印) においても陽性を示している . Bars = 25 (a, b and c) or 50 (d) μm .