

表 1 最終体重、肝臓重量、1,4-ジオキサン摂取量、GST-P 陽性細胞巢の発生

1,4-dioxane (ppm)	No. of rats	Final body weights (g)	liver		Average 1,4-dioxane intake		GST-P positive foci (2 cell <) (number/area)
			Absolute weight (g)	Relative weight (%)	Daily intake (mg/kg b.w.)	Total (mg/kg b.w.)	
F344 rats							
0	30	324 ± 10	11.1 ± 1.0	3.4 ± 0.2	0	0	0.20 ± 0.30
2	30	323 ± 27	11.1 ± 1.2	3.4 ± 0.2	0.2	24.4	0.38 ± 0.48
20	30	334 ± 14	10.9 ± 0.9	3.3 ± 0.2	2.2	245.0	0.49 ± 0.69
200	30	327 ± 14	11.1 ± 0.8	3.4 ± 0.2	21.9	2448.6	4.48 ± 3.78*
2000	30	323 ± 14	11.4 ± 1.8	3.5 ± 0.5	222.2	24881.8	7.36 ± 3.65**
5000	30	310 ± 13*	10.9 ± 0.8	3.5 ± 0.2	562.4	62988.5	17.89 ± 5.85**

* p<0.01 v.s. 0 ppm group

** p<0.05 v.s. 0 ppm group

表2 遺伝子の発現量を基に選抜した候補遺伝子

Symbol	Gene name	Function	Fold changes in mircoarray analysis
FGFBP1	FGF binding protein-1	Growth factor	230
Top2a	Topoisomerase 2 alpha	DNA replication	59
Gro1	Growth regulated protein 1	Growth factor	50
CD133	Prominin	Glycoprotein	34
Gpx2	Glutathione peroxidase 2	Antioxidant enzyme	28
MMP3	Matrix metalloproteinase 3	Protease	25
Aldh1a3	Aldehyde dehydrogenase 1A3	Metabolism	22
Ocm	Oncomodulin	Ca ²⁺ - binding protein	17
Pttg1	Pituitary tumor-transforming 1	Growth factor	16
Kcne3	potassium voltage-gated channel 3	Homeostasis	15

表3 マイクロアレイによる遺伝子発現量解析(log比2以上の差を有するもの)

Gene Symbol	Gene Title	Log fold change
Sult2a2	sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 2	6.00
Gsta5	glutathione S-transferase Yc2 subunit	4.33
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	4.44
Gpx2	glutathione peroxidase 2	3.75
Abcg5	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5	4.50
Abcg8	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	4.41
Pcp4	Purkinje cell protein 4	4.27
Sult2a1	sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring-like 1	3.58
Ggt1	gamma-glutamyltransferase 1	2.66
Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	2.73
Gpr64	G protein-coupled receptor 64	2.67
Pter	phosphotriesterase related	2.61
Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	2.76
Prlr	prolactin receptor	2.70
Lamc2	laminin, gamma 2	2.18
UST4r	integral membrane transport protein UST4r	2.58
Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	2.65
Ablim3	actin-binding LIM protein 3	2.04
Psat1	phosphoserine aminotransferase 1	2.47
Slc6a6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	-2.27
Fasn	fatty acid synthase	-2.30
Sds	serine dehydratase	-3.12
Acpp	acid phosphatase, prostate	-3.98
Odz2	Odz, odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila)	-2.09
LOC367746	similar to Spindlin-like protein 2 (SPIN-2)	-3.35
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	-2.53
Apoa4	apolipoprotein A-IV	-3.50

表4 DNAメチル化解析候補遺伝子

ID	Genes in dataset	Prediction (based on expression direction)	Log Ratio
1373817_at	ING4	Affected	-0.166
1368289_at	GC	Affected	-0.212
1388764_at	IQGAP1	Decreased	-0.278
1369492_at	AADAC	Affected	-0.318
1384265_at	POLD3	Affected	-0.318
1367758_at	AFP	Affected	-0.326
1369976_at	DYNLL1	Affected	-0.395
1387202_at	ICAM1	Affected	-0.437
1387242_at	EIF2AK2	Affected	-0.445
1371258_at	FGA	Affected	-0.491
1375250_at	B4GALT1	Affected	-0.508
1388185_at	RB1	Affected	-0.553
1387672_at	GNMT	Increased	-0.702
1377353_a_at	TNFSF13	Affected	-0.720
1370642_s_at	PDGFRB	Affected	-0.732
1378074_at	PDK4	Affected	-0.952
1383291_at	TUBB4B	Affected	-1.058
1387994_at	HSD17B6	Affected	-1.541
1370355_at	SCD	Affected	-2.527

gpt delta ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

本研究の目的は、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期間にかつ包括的に検出できる新しい発がんリスク評価法を確立することである。本年度では、発がん性と変異原性を包括的に検索できる *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法を用いて、*in vitro* 変異原性試験では陰性であるが、*in vivo* 変異原性はまだ検討されていない肝発がん物質である 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性を検討した。*gpt delta* ラットに 1,4-ジオキサンを 0, 200, 1000, 5000 ppm の用量で 16 週間飲水投与した。その結果、*gpt* アッセイによる点突然変異頻度は 5000 ppm 投与群で有意な増加を示した。また、肝臓前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の面積あたりの数が 5000 ppm 投与群で有意に増加した。以上のことから、1,4-ジオキサンはラット肝臓に対して *in vivo* 変異原性を有し、さらに肝発がん性を有することが明らかとなった。1,4-ジオキサンは浄水処理で除去されないため水道水中に微量ながらも存在しているため、本研究成果は 1,4-ジオキサンのリスク評価・管理に寄与するものであると考えられた。

A. 研究目的

環境中には多くの発がん物質が存在し、ヒト発がんの原因と目されており、食品を介しての化学物質曝露はそのなかでも大きな要因となっている。しかし、食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は動物試験だけでも 2 年間という長期的検討が必要であり、莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの食品添加物等に対応することが困難なためである。一方、遺伝毒性に関しては、*in vitro* の変異原性試験により遺伝毒性の有無が決められてきたが、偽陽性になるものも多く、特異性が低いという点において現状の試験法では問題がある。本研究では、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期的、かつ包括的に検出可能な新しい発がんリスク評価法の開発の一環として、医薬品・化粧品（シャンプー）などの抽出・精製・反応用溶剤として用いられる合成有機化合物

であり、浄水処理においては除去されない 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性について *gpt delta* ラットを用いて検討を行った。1,4-ジオキサンの遺伝毒性について *in vitro* 試験では、Ames 試験で陰性、姉妹染色分体交換試験では弱陽性が報告されており、また *in vivo* 試験では小核試験陰性、伴性劣性致死試験陽性であり、弱い遺伝毒性作用を持つ可能性があると考えられる。また国際がん研究機関 (IARC) では 1,4-ジオキサンは「ヒトに対する発がん性の可能性あり (グループ 2B)」と評価されている。1,4-ジオキサンは微量ながらも水道水中に存在することから、遺伝毒性および発がん性について早急に明らかとする必要がある。遺伝毒性については *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 評価系を用い、発がん性については肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の評価を行った。

B. 研究方法

1. *gpt delta* ラット肝臓における 1,4-ジ

オキサンの *in vivo* 変異原性の検討

[材料]

5週齢の雄性 F344系 *gpt delta* ラットを1週間の馴化飼育後、4つの群に分けた。実験開始時より CE-2 基礎飼料を与え、飲料水として 1,4-ジオキサンをそれぞれ 0, 200, 1000, 5000 ppm の濃度で蒸留水に希釈し、16週間飲水投与を行い、24時間自由摂取させた。なお、動物実験については、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ドシステムの動物室にて、室内の環境条件は温度 22 ± 2 度、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。また、紙の床敷を入れたプラスチック製ケージに、3匹に分けて飼育し、ケージおよびチップを週1回交換した。屠殺までの実験期間中は、体重、摂餌量、摂水量を週1回測定した。

[GST-P 陽性細胞巢の評価]

試験期間終了後、麻酔下にて安楽殺を行い、肝臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定を行った。得られた肝臓組織から1スライドあたり3切片ずつ用いて評価を供した。GST-P 免疫組織化学染色標本は陽性細胞巢を構成する細胞が2個以上のものについて集計し、肝臓切片の面積で除して定量的評価を行った。

[変異頻度の解析]

点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイに用いるために、剖検時に得られたラット凍結肝より、genomic DNA を Transpack DNA isolation kit を用いて抽出を行った。*in vitro* 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した。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°C 、20分間静置の

後、 37°C 、20分間振とうで回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させた。感染後の YG6020 菌液を 6-Thioguanine (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で2日間培養行い、*gpt* 遺伝子の不活化による変異体コロニーを得た。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より求めた。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求めた。突然変異体頻度の算出については、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することで得た。

gpt 遺伝子変異体の変異スペクトラを評価するため、得られた変異コロニーをコロニーダイレクト PCR 法によって、DNA フラグメントを増幅した。プライマーは forward に primer 1; 5' -TACCACTTTATCCCGCGTCAGG-3' を、reverse に primer 2 ; 5' -ACAGGGTTTCGCTCAGGTTTGC-3' を使用して、サーマルサイクラーにて *gpt* 遺伝子の ORF 456bp を含む 739bp の DNA フラグメントを増幅した。得られた PCR product を illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns にて精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用して、DNA サイクルシーケンスを行った。プライマーは forward に primer A; 5' -GAGGCAGTGCCTAAAAGAC -3' を、reverse に primer B ; 5' -CTATTGTAACCCGCCTGAAG -3' を使用して DNA サイクルシーケンスを行った。その後、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer で *gpt* 遺伝子のシーケンス解析を行い、変異スペクトラについて解析を行った。

[統計学的解析]

統計学的解析には剖検時における最終体重、肝臓の絶対重量および相対重量、GST-P 陽性細胞巢および遺伝子変異頻度について、統計学的解析を実施した。統計学的解析には、

StatLight2000 (C)の多群の検定を用い、各検定の有意水準は5%とした。統計学的検定法については、まず各群の分散比を Bartlett 検定で検定し、等分散の場合は Dunnett 検定 (両側検定) により、不等分散の場合は Steel 検定により比較した。

C. 研究結果

1. *gpt delta* ラット肝臓における 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性の検討

剖検時における最終体重、肝臓重量、飼育期間中の1,4-ジオキサン摂取量およびGST-P陽性細胞巢の定量的評価についてTable.1に示した。無処置群と比較して、5000 ppm 投与群で最終体重、肝臓の相対重量の有意な減少が認められた。また、肝臓の前癌病変マーカーであるGST-P陽性細胞巢(2細胞以上)の単位肝臓面積あたりの数が5000 ppm 投与群で有意に増加した。点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイの結果をTable.2に示す。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度が無処置群では $4.3 \pm 2.6 (\times 10^{-6})$ 、200 ppm 1,4-ジオキサン投与群では $6.5 \pm 3.1 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm 投与群では $7.9 \pm 2.9 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm 投与群では $13.2 \pm 7.1 (\times 10^{-6})$ であった。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度は、無処置群と比較して、5000 ppm 投与群において有意な増加がみられた。

また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラをTable 3に示す。AT to TA トランスバージョンの頻度が200ppmで増加傾向、1000および5000 ppm群で、A:T to G:C 5000 ppm群で有意な増加が認められた。それぞれの遺伝子変異スペクトラにおける変異頻度について以下に記す。Base substitution において、Transition 変化であるG:C to A:T変化は無処置群では $2.5 \pm 1.7 (\times 10^{-6})$ 、200 ppm投与群では $2.8 \pm 1.7 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では $1.9 \pm 1.4 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では $3.2 \pm 2.3 (\times 10^{-6})$ 、A:T to G:C

変化は無処置群では $0.3 \pm 0.6 (\times 10^{-6})$ 、200 ppm投与群では $0.2 \pm 0.4 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では $1.1 \pm 1.2 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では $4.0 \pm 3.1 (\times 10^{-6})$ であった。また、同じBase substitutionにおいてTransversion変化であるG:C to T:A変化は無処置群で $0.9 \pm 1.5 (\times 10^{-6})$ 、200 ppm投与群では $1.1 \pm 0.8 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では $0.8 \pm 1.1 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では $2.0 \pm 1.8 (10^{-6})$ 、G:C to C:G変化は無処置群では0、200 ppm投与群では $0.3 \pm 0.8 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では $0.5 \pm 0.9 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では $0.4 \pm 0.8 (\times 10^{-6})$ 、A:T to T:A変化は無処置群では0、200 ppm投与群では $1.0 \pm 2.2 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では $1.5 \pm 1.0 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では $1.7 \pm 1.8 (\times 10^{-6})$ 、A:T to C:G変化は無処置群では0、200 ppm投与群では0、1000 ppm投与群では $0.4 \pm 1.0 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では $0.8 \pm 1.1 (\times 10^{-6})$ であった。deletion において、1bp 欠失変化は無処置群では $0.2 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、200 ppm投与群では $0.2 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では $0.7 \pm 1.1 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では $1.0 \pm 1.4 (\times 10^{-6})$ 、2bp以上の欠失変化は無処置群では $0.3 \pm 0.9 (\times 10^{-6})$ 、200 ppm投与群では $0.2 \pm 0.4 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では $0.7 \pm 0.9 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では $0.2 \pm 0.6 (\times 10^{-6})$ であった。Insertion 変化において1bp挿入変異は無処置群では $0.2 \pm 0.4 (\times 10^{-6})$ 、200 ppm投与群では $0.7 \pm 0.9 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では $0.3 \pm 0.8 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm投与群では0、2bp以上の挿入変異は無処置群では0、200 ppm投与群では $0.2 \pm 0.6 (\times 10^{-6})$ 、1000 ppm投与群では0、5000 ppm投与群では0であった。

D. 考察

本研究では、1,4-ジオキサンのラット肝臓における *in vivo* 変異原性および発がん性について明らかにすることを目的として、*gpt delta* ラットを用いた包括的試験を行った。GST-P 陽性細胞巢の定量的評価および *gpt* アッセイによって、1,4-ジオキサンがラット肝臓において変異原性および発がん性を有することが明らかとなった。また、1,4-ジオキサンによる変異原性には A:T to G:C および A:T to T:A 塩基置換が特徴であると推測される。しかし、その変異原性は 5000 ppm ではじめて有意な変化を示すものの、その値は非常に小さいため、その遺伝毒性は非常に弱いと考えられる。

E. 結論

1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性を有し、さらに肝発がん性も有することが明らかとなった。この成果は 1,4-ジオキサンのリスク評価・管理に寄与するものであると考えられた。また、*gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法が包括的短期発がんリスク評価試験法としての有用性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Xie XL, Kakehashi A, Wei M, Yamano S, Takeshita M, Yunoki T, Wanibuchi H. l-Leucine and l-isoleucine enhance growth of BBN-induced urothelial tumors in the rat bladder by modulating expression of amino acid transporters and tumorigenesis-associated genes. *Food Chem Toxicol*, 59, 137-144, 2013.
2. Hanada S, Nishiyama N, Mizuguchi S, Yamano S, Kakehashi A, Wei M, Inoue H, Komatsu H, Chung K, Suehiro S, Wanibuchi H. Clinicopathological significance of combined analysis of cytokeratin19 expression and preoperative serum CYFRA21-1 levels in human lung squamous cell carcinoma. *Osaka City Med J*, 59, 35-44, 2013.
3. Komatsu H, Kakehashi A, Nishiyama N, Izumi N, Mizuguchi S, Yamano S, Inoue H, Hanada S, Chung K, Wei M, Suehiro S, Wanibuchi H. Complexin-2 (CPLX2) as a potential prognostic biomarker in human lung high grade neuroendocrine tumors. *Cancer Biomark*, 13, 171-180, 2013.
4. Wei M, Yamada T, Yamano S, Kato M, Kakehashi A, Fujioka M, Tago Y, Kitano M, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 1-9, 2013.
5. Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Nagano K, Nishimaki F, Banton M, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: Evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 390-400, 2013.
6. Tago Y, Yamano S, Wei M, Kakehashi A, Kitano M, Fujioka M, Ishii N, Wanibuchi H. Novel medium-term carcinogenesis model for lung squamous cell carcinoma induced by N-nitroso-tris-chloroethylurea in mice. *Cancer Sci*, 104, 1560-1566, 2013.
7. Hanada S, Kakehashi A, Nishiyama N, Wei M, Yamano S, Chung K, Komatsu H, Inoue

- H, Suehiro S, Wanibuchi H. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate as a prognostic biomarker in human primary lung squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*, 13, 289-298, 2013.
8. Kakehashi A, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens. *Cancers*, 5, 1332-1354, 2013.
 9. Kato M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Evaluation of the modifying effect of inhalation of mainstream cigarette smoke on mouse bladder carcinogenesis. *J Toxicol Pathol*, 26, 447-451, 2013.
 10. Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Tanaka M, Shiota M, Osada-Oka M, Nakamura Y, Wei M, Wanibuchi H, Iwao H, Yoshiyama M. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 445, 327-333, 2014.
 11. 藤岡正喜、山野莊太郎、魏 民、鰐淵英機. 免疫組織染色の定量法. *細胞工学*, 学研メディカル秀潤社, 33(3), 316-322, 2014.
2. 学会発表
 1. 鰐淵英機、桑江優子、魏 民、若狭研一、梯アンナ: ヒト肝細胞癌における特異的候補分子の機能解析. 第102回日本病理学会総会, 札幌 (2013年6月)
 2. 鰐淵英機、魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、藤岡正喜: ヒ素発がん性の機序の解明. 第20回日本がん予防学会, 東京 (2013年7月)
 3. 梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、長野嘉介、西牧富久美、魏 民、福島昭治、鰐淵英機: ラットにおける2-エトキシ-2-メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明. 第28回発癌病理研究会, 沖縄県南城市 (2013年8月)
 4. Okumura M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in F344 rats. The European Cancer Congress 2013, Amsterdam, the Netherlands (2013年9~10月)
 5. 魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、加藤 実、武下正憲、梯アンナ、鰐淵英機: 1,2-ジクロロプロパンのマウスおよびハムスターの肝臓における代謝および毒性発現機序の検討. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013年10月)
 6. 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、奥村真衣、下村衣里、梯アンナ、鰐淵英機: gpt delta ラットを用いた DMA(V), iAs(III)の変異原性および遺伝子変化の検討. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013年10月)
 7. 梯アンナ、桑江優子、加藤 実、山野莊太郎、神吉将之、魏 民、若狭研一、鰐淵英機: ヒト肝細胞癌における新規特異的候補分子ターゲットの機能解析. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013年10月)
 8. 山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、三島胡桃、鰐淵英機: 内因性 NADPH オキシダーゼインヒビターであるアポサイニン はラット腎発がんにおいて発がん抑制作用を有する. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013年10月)
 9. 奥村真衣、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機: ラット中期多臓器発がん性試験法を用いた DPAA(diphenyl arsenic acid)の発がん修飾作用の検討. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013年10月)

10. 鰐淵英機、奥村真衣、藤岡正喜、魏 民：多臓器発がん性試験法を用いたラットにおけるジフェニルアルシン酸の発がん性の検討。第 19 回ヒ素シンポジウム，福岡（2013 年 11 月）
11. Yamano S, Wei M, Wanibuchi H. Cancer initiating cell of lung squamous cell carcinoma in mice might be derived from of the bronchiolar alveolar stem cell. 第 18 回日韓がんワークショップ，岐阜（2013 年 11 月）
12. 魏 民、山野荘太郎、藤岡正喜、梯アンナ、下村衣里、神吉将之、鰐淵英機：シリアンハムスターにおける 1, 2-dichloropropan の強制経口投与による肝毒性とその発現機序の検討。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
13. 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：肝発がんにおける LC-Ms/Ms 及び *in vitro* 機能解析を用いた新規特異的候補分子の検討。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
14. 山野荘太郎、尾崎清和、武田周二、串田昌彦、井澤武史、山手丈至、平田暁大、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：EHEN 投与ラットの前腸由来臓器への分化多能性を示す肝芽腫の一例。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
15. 藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、下村衣里、三島胡桃、福永賢輝、鰐淵英機：ラット膀胱におけるプロポリスの発がん促進作用及びその機序の検討。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
16. 奥村真衣、藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、三島胡桃、多胡善幸、鰐淵英機：ラット中期多臓器発がんモデルを用いた DPAA(diphenyl arsenic acid)の発がん修飾作用の検討。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
17. 三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏 民、北野光昭、鰐淵英機：EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
18. 下村衣里、藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、梯アンナ、串田昌彦、鰐淵英機：DMA^vおよび iAs^{III}ラット膀胱、肝臓における変異原性の解析。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
19. 梯アンナ、魏 民、福島昭治、鰐淵英機：ラット肝発がんにおける Valerian の予防効果。第 13 回分子予防環境医学研究会，和歌山（2014 年 1～2 月）
20. 三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する。第 13 回分子予防環境医学研究会，和歌山（2014 年 1～2 月）
21. Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H: Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. 平成25年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ，大津（2014年2月）
22. 山野荘太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける NADPH oxidase (NOX) の役割。平成 25 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ，大津（2014 年 2 月）

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

Table.1 最終体重、肝臓重量、1,4-ジオキサン摂取量、GST-P 評価

1,4-dioxane (ppm)	No. of rats	Final body weights (g)	liver		Average 1,4-dioxane intake		GST-P positive foci (2 cell <) (number/area)
			Absolute weight (g)	Relative weight (%)	Daily intake (mg/kg b.w.)	Total (mg/kg b.w.)	
F344 rats							
0	30	324 ± 10	11.1 ± 1.0	3.4 ± 0.2	0	0	0.20 ± 0.30
2	30	323 ± 27	11.1 ± 1.2	3.4 ± 0.2	0.2	24.4	0.38 ± 0.48
20	30	334 ± 14	10.9 ± 0.9	3.3 ± 0.2	2.2	245.0	0.49 ± 0.69
200	30	327 ± 14	11.1 ± 0.8	3.4 ± 0.2	21.9	2448.6	4.48 ± 3.78*
2000	30	323 ± 14	11.4 ± 1.8	3.5 ± 0.5	222.2	24881.8	7.36 ± 3.65**
5000	30	310 ± 13*	10.9 ± 0.8	3.5 ± 0.2	562.4	62988.5	17.89 ± 5.85**

* p<0.01 v.s. 0 ppm group

** p<0.05 v.s. 0 ppm group

Table. 2 1,4-ジオキサン投与ラット肝臓における点突然変異頻度(*gpt* アッセイ)

Treatment of 1,4-dioxane	Animal no.	Total colonies	Total 6-TG mutants	Mutation frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm SD
0ppm	111	1,068,000	3	2.8	4.3 \pm 2.6
	112	720,000	4	5.6	
	113	900,000	3	3.3	
	114	804,000	2	2.5	
	121	376,000	3	8.0	
	122	486,000	4	8.2	
	123	744,000	1	1.3	
	124	706,000	2	2.8	
200ppm	211	910,000	7	7.7	6.5 \pm 3.1
	212	854,000	2	2.3	
	213	718,000	3	4.2	
	214	450,000	2	4.4	
	221	862,000	7	8.1	
	222	668,000	5	7.5	
	223	518,000	6	11.6	
1000ppm	311	748,000	8	10.7	7.9 \pm 2.9
	312	700,000	5	7.1	
	313	464,000	2	4.3	
	314	902,000	7	7.8	
	321	800,000	5	6.3	
	322	616,000	4	6.5	
	323	462,000	6	13.0	
5000ppm	411	364,000	4	11.0	13.2 \pm 7.1*
	412	510,000	7	13.7	
	413	536,000	10	18.7	
	414	588,000	8	13.6	
	421	664,000	11	16.6	
	422	644,000	4	6.2	
	423	602,000	1	1.7	
424	578,000	14	24.2		

* $p < 0.01$ v.s. 0 ppm group

Table 3 1,4-ジオキサンの *gpt* 遺伝子変異スペクトラ

Type of mutation	Treatment of 1,4-dioxane			
	0	200ppm	1000ppm	5000ppm
Base substitution				
Transition				
G:C to A:T	13 (59.1) ^a 2.5 ± 1.7 ^b	14 (43.8) 2.8 ± 1.7	9 (24.3) 1.9 ± 1.4	14 (23.7) 3.2 ± 2.3
A:T to G:C	2 (9.1) 0.3 ± 0.6	1 (3.1) 0.2 ± 0.4	6 (16.2) 1.1 ± 1.2	18 (30.5) 4.0 ± 3.1 *
Transversion				
G:C to T:A	4 (18.2) 0.9 ± 1.5	6 (18.8) 1.1 ± 0.8	4 (10.8) 0.8 ± 1.1	9 (15.3) 2.0 ± 1.8
G:C to C:G	0 (0) 0	1 (4.5) 0.3 ± 0.8	2 (5.4) 0.5 ± 0.9	2 (3.4) 0.4 ± 0.8
A:T to T:A	0 (0) 0	4 (12.5) 1.0 ± 2.2	7 (18.9) 1.5 ± 1.0 *	8 (13.6) 1.7 ± 1.8 *
A:T to C:G	0 (0) 0	0 (0) 0	2 (5.4) 0.4 ± 1.0	3 (5.1) 0.8 ± 1.1
deletion				
Single bp	1 (4.5) 0.2 ± 0.5	1 (3.1) 0.2 ± 0.5	3 (8.1) 0.7 ± 1.1	4 (6.8) 1.0 ± 1.4
Over 2bp	1 (4.5) 0.3 ± 0.9	1 (3.1) 0.2 ± 0.4	3 (8.1) 0.7 ± 0.9	1 (1.7) 0.2 ± 0.6
Insertion				
Single bp	1 (4.5) 0.2 ± 0.4	3 (9.4) 0.7 ± 0.9	1 (2.7) 0.3 ± 0.8	0 (0) 0
Over 2bp	0 (0) 0	1 (3.1) 0.2 ± 0.6	0 (0) 0	0 (0) 0
Total	22 (100) 4.3 ± 2.6	32 (100) 6.5 ± 3.1	37 (100) 7.9 ± 2.9	59 (100) 13.2 ± 7.1 *

^aNumber of mutations (%)

^bMutation frequency (× 10⁶)

* : p value < 0.05 (vs 0 ppm group)

遺伝子のメチル化異常に関する研究

研究分担者 氏名 辻内俊文 所属 近畿大学 職名 教授

研究要旨

本研究は、食品中に含まれる食品添加物をはじめとした様々な物質が誘発する DNA メチル化異常や点突然変異などの遺伝子変異を、細胞培養系を用いて短期に安全性評価を行う実験系の確立を目的とする。培養細胞はラット肝上皮 (WB-F344) 細胞を用い、内分泌かく乱物質である bisphenol A (BPA) と 4-nonylphenol (4-NP) を種々の濃度で 48 時間計 2 回処理した。その結果、細胞運動能は、BPA で処理した細胞では抑制し 4-NP では促進された。LPA 受容体遺伝子発現は、BPA で処理した細胞において LPA1 発現が上昇、4-NP では LPA3 発現が上昇した。本研究より、細胞内シグナル伝達経路の変化を指標とする細胞培養を用いた安全性評価法の有用性が示唆された。

A. 研究目的

がんは、種々の遺伝子異常を蓄積しながら多段階的に発生することが知られている。がん発生過程でみられる遺伝子異常には、点突然変異や欠失など DNA の塩基配列そのものに変異をきたす genetic な異常と、塩基配列には変異がなく遺伝子発現調節機構に変異を生じる epigenetic な異常がある。発がん要因には、発がん性を有する化合物によって引き起こされる外因性のものと、炎症巣で発生する活性酸素などによる内因性に要因に分けられる。外因性の発がん要因となりうる物質は、その多くが環境中に存在し我々の生活習慣とも密接に関わりをもつ。特に食事として日々摂取する食品に含まれる食品添加物などの様々な物質の安全性は厳重にかつ確実に評価する必要がある。現在、発がん性を評価する

実験系は動物実験が主体であり、安全性評価に至るまでには一定の実験期間を要する。一方、細胞培養を用いた発がんリスクを短期に評価する有用な実験系は確立されていない。本研究は、種々の被検物質を培養細胞に処理し、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ならびに発がんリスクを短期に検出する細胞培養系を確立し、食品添加物として含まれる種々の化合物の短期間での安全性評価に応用することを目的とする。今回の研究では、内分泌かく乱物質を細胞処理し、細胞運動能に対する影響と LPA 受容体発現誘導の有無を検索し、LPA 受容体を介する LPA シグナル伝達経路が細胞を用いた発がん性評価の有用性を検討した。

B. 研究方法

培養細胞は、ラット肝上皮(WB-F344)細胞を用い、10%FBS含有DMEM培地で37度、5%CO₂の条件下にて培養した。細胞には、内分泌かく乱物質である bisphenol A (BPA)と 4-nonylphenol (4-NP)を0.1および1.0mMの濃度で48時間(1回/24時間)計2回処理した。細胞運動能の検索には、Cell Culture Insert (8.0mm pore size)を用い、upper chamberにはBPAおよび4-NPで処理した細胞(5x10⁴ cells)を播き、lower chamberにはFBS含有培地を加え、16時間培養後にlower chamberに移動した細胞をギムザ染色後に計測した。水平方向への細胞運動能への影響は、BPAおよび4-NPを1.0mMの濃度で48時間処理した後、scrape法を用いて検索した。遺伝子発現解析には、BPAおよび4-NP(1.0mM)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。さらに、遺伝子発現と細胞運動能の関連を検索する目的で、標的となる遺伝子に対するshRNAを組み込んだVectorを遺伝子導入し、puromycinでselectionを行うことによりノックダウン細胞を作成し、BPAと4-NPに対する効果を検索した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた実験系であり該当しない。

C. 研究結果

WB-F344細胞にBPAおよび4-NPを処理し細胞運動能ならびに遺伝子解析を行い

以下の結果を得た。

- (1) Cell Culture Insertを用いた細胞運動能は、BPAで処理した細胞では抑制、4-NPでは促進した。
- (2) scrape法を用いた水平方向への細胞運動能も同様に、BPAは抑制し4-NPは促進した。
- (3) LPA受容体遺伝子発現は、BPAで処理した細胞においてLPA1発現の上昇がみられ、4-NPではLPA3発現が上昇した。
- (4) BPAおよび4-NP処理による細胞運動能への影響は、LPA受容体ノックダウン細胞で抑制された。

D. 考察

内分泌かく乱物質は環境中に存在し、日常生活の中で曝露する可能性のある外因性の化合物である。内分泌かく乱物質は、生殖器系の異常、発がん、肥満、心血管系疾患など身体に様々な影響を及ぼす。これらの作用には、種々の細胞内・核内シグナルを介し細胞内ホルモン調節機構ならびに恒常性の維持に変化をもたらすことが要因のひとつと考えられている。本研究では、細胞運動能を指標とし、BPAと4-NPを肝上皮細胞に処理することで誘発される細胞運動能にLPAシグナル伝達経路が関与することが判明した。さらに、これまでの研究で用いたエストロゲン化合物や過酸化水素と同様に、内分泌かく乱物質の種類により異なるLPA受容体が作用することわかった。今後は、培養細胞にイニシエーション・プロモーション作用を有する化学物質を処理し、

細胞運動能に及ぼす影響と LPA 受容体パターンを検索し、被検物質の細胞に対する作用との相関性を明らかにする必要がある。

E. 結論

内分泌かく乱物質である BPA と 4-NP による肝上皮細胞の細胞運動能は、異なる LPA 受容体によって制御されることが判明した。本研究より、細胞培養を用いた細胞内シグナル伝達経路の変化を指標とする短期発がんリスク評価法の有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Dong Y, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cell motile and invasive activities of human sarcoma cell lines. *Mol Cell Biochem* 2014, in press.
2. Dong Y, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cellular responses in mouse fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 (446) 585-589.
3. Tsujiuchi T, Nakae D, Konishi Y. Multi-step lung carcinogenesis model induced by oral administration of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2014 (66) 81-88.
4. Tsujiuchi T, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Diverse effects of LPA receptors on cell motile activities of cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res* 2014, in press.
5. Dong Y, Araki M, Hirane M, Tanabe E, Fukushima N, Tsujiuchi T. Effects of bisphenol A and 4-nonylphenol on cellular responses through the different induction of LPA receptors in liver epithelial WB-F344 cells. *J Recept Signal Transduct Res* 2013, in press.
5. Tsujiuchi T, Araki M, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histol Histopathol* 2014 (29) 313-321.
6. Hirane M, Araki M, Dong Y, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Inhibitory effects of LPA1 on cell motile activities stimulated by hydrogen peroxide and 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 (441) 47-52.
8. Tanaka J, Yamaguchi K, Ishikura H, Tsubota M, Sekiguchi F, Seki Y, Tsujiuchi T, Murai A, Uemura T, Kawabata A. Bladder pain relief by HMGB1 neutralization and soluble thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis.

- Neuropharmacology 2014 (79) 112-118.
9. Honoki K, Tsujiuchi T. Senescence bypass in mesenchymal stem cells: a potential pathogenesis and implications of pro-senescence therapy in sarcomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2013(13) 983-996.
 10. Kuwata S, Ohkubo K, Kumamoto S, Yamaguchi N, Izuka N, Murota K, Tsujiuchi T, Iwamori M, Fukushima N. Extracellular lipid metabolism influences the survival of ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 (439) 280-284.
 11. Tanabe E, Kitayoshi M, Hirane M, Araki M, Dong Y, Fukushima N, Tsujiuchi T. Downregulation of activation factors of endothelia and fibroblasts via lysophosphatidic acid signaling in a mouse lung cancer LL/2 cell line. *J Recept Signal Transduct Res* 2013 (33) 286-290.
 12. Inoue S, Tanabe E, Shibata A, Hirane M, Araki M, Dong Y, Fukushima N, Tsujiuchi T. Ethionine regulates cell motile activity through LPA receptor-3 in liver epithelial WB-F344 cells. *Mol Cell Biochem* 2013 (383) 173-177.

2. 学会発表

1. Honoki K, Fujii H, Kido A, Tsukamoto S, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Receptor type-specific role of

lysophosphatidic acid signaling for migration and invasion in sarcoma cells. (第 72 回日本癌学会総会. 2013.10.3-5.横浜).

2. 石井章一、辻内俊文、福嶋伸之. LPA1 の変異は小胞体への蓄積と情報伝達の異常を生じる. (第 86 回日本生化学大会. 2013.9.11-13.横浜).
3. 福嶋伸之、辻内俊文、岩森正男. 脂肪酸による卵巣がん細胞 HNOA の細胞死抑制機構. (第 86 回日本生化学大会. 2013.9.11-13.横浜).

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

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
Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H.	Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer.	Pancreas	42	1034-1039	2013
Xie XL, Kakehashi A, Wei M, Yamano S, Takeshita M, Yunoki T, Wanibuchi H.	l-Leucine and l-isoleucine enhance growth of BBN-induced urothelial tumors in the rat bladder by modulating expression of amino acid transporters and tumorigenesis-associated genes.	Food Chem Toxicol	59	137-144	2013
Hanada S, Nishiyama N, Mizuguchi S, Yamano S, Kakehashi A, Wei M, Inoue H, Komatsu H, Chung K, Suehiro S, Wanibuchi H.	Clinicopathological significance of combined analysis of cytokeratin19 expression and preoperative serum CYFRA21-1 levels in human lung squamous cell carcinoma.	Osaka City Med J	59	35-44	2013
Komatsu H, Kakehashi A, Nishiyama N, Izumi N, Mizuguchi S, Yamano S, Inoue H, Hanada S, Chung K, Wei M, Suehiro S, Wanibuchi H.	Complexin-2 (CPLX2) as a potential prognostic biomarker in human lung high grade neuroendocrine tumors.	Cancer Biomark	13	171-180	2013

Wei M, Yamada T, Yamano S, Kato M, Kakehashi A, Fujioka M, Tago Y, Kitano M, Wanibuchi H.	Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats.	Toxicol Appl Pharmacol	273	1-9	2013
Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Nagano K, Nishimaki F, Banton M, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H.	Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: Evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways.	Toxicol Appl Pharmacol	273	390-400	2013
Tago Y, Yamano S, Wei M, Kakehashi A, Kitano M, Fujioka M, Ishii N, Wanibuchi H.	Novel medium-term carcinogenesis model for lung squamous cell carcinoma induced by N-nitroso-tris-chloroethylurea in mice.	Cancer Sci	104	1560-1566	2013
Hanada S, Kakehashi A, Nishiyama N, Wei M, Yamano S, Chung K, Komatsu H, Inoue H, Suehiro S, Wanibuchi H.	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate as a prognostic biomarker in human primary lung squamous cell carcinoma.	Cancer Biomark	13	289-298	2013
Takahashi K, Tanaka M, Inagaki A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Nagayama K, Shiota M, Iwao H.	Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line.	Int J Oncol	43	1985-1991	2013
Kakehashi A, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H.	Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens.	Cancers	5	1332-1354	2013
Kato M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H.	Evaluation of the modifying effect of inhalation of mainstream cigarette smoke on mouse bladder carcinogenesis.	J Toxicol Pathol	26	447-451	2013
Dong Y, Araki M, Hirane M, Tanabe E, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Effects of bisphenol A and 4-nonylphenol on cellular responses through the different induction of LPA receptors in liver epithelial WB-F344 cells.	J Recept Signal Transduct Res			2013
Hirane M, Araki M, Dong Y, Honoki K, Fukushima N,	Inhibitory effects of LPA1 on cell motile activities stimulated by hydrogen peroxide and 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in	Biochem Biophys Res Commun	441	47-52	2013