

## 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（平成 25 年度）

#### 畜水産食品中に含まれる動物用医薬品等の安全性確保に関する研究

##### 分担課題：肝発がん促進シグナルの解析

分担研究者 鈴木 和彦 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 准教授

#### 研究要旨

我々はこれまでに、動物用医薬品の中で、CYP inducer により産生される活性酸素種(ROS)が肝発がん促進過程に關与する可能性を示してきた。しかし、CYP inducer であってもミクロソームで ROS 産生しない場合や ROS 産生が酸化ストレスの増強に繋がらない場合でも肝発がん促進作用が見られることがあり、その機序は明確になっていない。そこで本研究は、非ミクロソーム ROS 産生源である NADPH oxidase (NOX)に着目して、肝発がんないし発がん促進過程において細胞増殖亢進を来たす非遺伝毒性発がん機序への NOX の関与を検討することを目的として実施した。25 年度はラット二段階肝発がんモデルを用い、*N*-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週間後から piperonyl butoxide(PBO)を単独あるいは NOX 阻害剤(Apocynin; APO)あるいは抗酸化剤(*N*-acetyl cystein; NAC)と併用して混餌投与を 8 週間行った。プロモーター投与 1 週間後に部分肝切除を行った。実験終了後、肝臓については病理組織学的検索、免疫組織化学的解析、遺伝子の発現変動解析を行った。検索の結果、PBO の投与により肝前がん病変指標の glutathione *S*-transferase placental form 陽性細胞率、Ki-67 陽性細胞率ならびに active caspase-3 陽性細胞率が増加したが、APO および NAC の併用によりそれらの増加は抑制されなかった。また、real-time RT-PCR にて、薬物代謝酵素および抗酸化酵素も PBO により増加したが、APO および NAC の併用によりそれらの増加は抑制されなかった。以上より、PBO の発がん促進による肝前がん病変形成には NOX の関与の可能性は低いと推察された。

#### A. 研究目的

ヒトや動物は環境汚染物質や食品中の種々の化学物質を経口的に摂取するが、その一部の物質は肝臓の薬物代謝酵素である cytochrome P450(CYP)を誘導することにより(以下、CYP inducer と呼ぶ)肝発がんのリスクを高めると考えられている。研究代表者と分担研究者らの研究グループでは、暴露されるリスクの高い CYP inducer として食品添加物、動物用医薬品、農薬に着目し、それらによる CYP の誘導がミクロソームにおける活性酸素種(ROS)の産生増加およびそれによる酸化ストレス発現を惹起し、その酸化ストレスにより肝発がん促進作用を示すことを報告してきた(Kuwata et al., 2011; Shimamoto et al., 2011; Morita et al., 2011; Tawfeeq et al., 2011; Hayashi et al., 2012)。しかし、現時点の発がん機序において活性酸素種 (ROS) との因果関係が明らかなものは酸化的 DNA 損傷に起因する突然変異の誘発のみで、ROS 産生と細

胞増殖機構を繋ぐ分子メカニズムについては未だ不明な部分が多い。また、CYP inducer であってもミクロソームで ROS 産生しない場合やミクロソーム ROS 産生が酸化ストレスの増強に繋がらない場合でも肝発がん促進作用が見られる場合もあり、新たな視点からの機序解明が急務であると考えられる。

細胞内ではミクロソーム以外でも ROS は産生され、その因子の一つとして膜蛋白である NADPH oxidase(NOX)が挙げられる。NOX は細胞膜成分 (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>) と細胞質成分 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, Rac 1) からなる複合体で、好中球やマクロファージなどの貪食細胞における抗菌作用を担う中心的な分子として知られている。これら貪食細胞のファゴソーム内にて NADPH を基質として NOX を介して酸素一分子よりスーパーオキシドが産生される。スーパーオキシド自体に抗菌作用はないが、superoxide dimustase により過酸化水

素となり、Fenton 反応などを介してヒドロキシラジカルを産生し、また、myeloperoxidase の作用により次亜塩素酸を産生することで抗菌作用を示すことが知られている (Kalyanaraman, 2013)。肝臓において NOX の関与を示す病態としてエタノール誘発性のアルコール性肝障害 (Thakur et al., 2006) や虚血・再灌流モデル (Liu et al., 2008) が知られており、クッパー細胞の活性化に伴い NOX を介した ROS 産生が亢進することで病態が進行することが示されている。

NOX は ROS 産生源であると同時に細胞内情報伝達因子としての役割も担い、貪食細胞以外の実質細胞においても、TGF- $\beta$ 1 (Boudreau et al., 2012)、NF $\kappa$ B (Wang et al., 2011)、Wnt/ $\beta$ -catenin (Kato et al., 2012)ならびに PI3K/Akt (Huang et al., 2012)などを介した細胞増殖・分化、MAPK 経路や Wnt/ $\beta$ -catenin/TCF 経路において TCF に対する FOXO による競合反応によるアポトーシスへの関与 (Parody et al., 2009,2010) が示唆されている。これらの作用により NOX は種々の臓器における腫瘍細胞の増殖やアポトーシスの抑制、血管新生、浸潤、転移などがんの進展に関わる主要経路に関与することが示されている (Block and Gorin, 2012)。

我々のこれまでの研究において、フタル酸エステル的一种であるフタル酸ジヘプチル(DHP)のラットへの 90 日間投与により、肝臓における細胞増殖、glutathione S-transferase placental form(GST-P)陽性前がん病変の形成ならびに酸化性ストレス指標の変動とともに、NOX2 mRNA レベルならびに NOX2 陽性細胞の増加を確認している。また、別のフタル酸エステルであるフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)との併用で、DEHP による PPAR $\alpha$  アゴニスト活性亢進に起因すると推測される拮抗作用により、細胞増殖、GST-P 陽性前がん病変の形成ならびに NOX 発現増加がいずれも抑制されることを確認している。これらの知見より NOX が肝臓がん過程における前がん病変形成や細胞増殖に関与している可能性が示唆されている。これ

らのフタル酸エステルは peroxisome receptors-activated receptor  $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )の agonist であり、そのひとつである Wy-14643 においてもクッパー細胞における NOX を介する ROS 産生が肝細胞の初期細胞増殖に関与していることが NOX 複合体の一つの構成要素 p47<sup>phox</sup> の null マウスを用いた実験により示されている (Rusyn et al., 2000)。しかし、同様の実験系を用いた Wy-14643 の長期間暴露における検討では NOX に関連した細胞増殖の増加は明らかとなっておらず (Woods et al., 2007)。化学物質誘発性の肝臓がん過程における NOX の関与はいまだ不明な部分が多い。

本研究では、NOX を介した ROS による酸化ストレスが前がん病変形成を惹起する際の細胞内情報伝達経路である可能性を明らかにすることを目的とし、非遺伝毒性性肝臓がん物質である piperonyl butoxide(PBO)を用いて肝中期発がん性試験を実施し、NOX 阻害剤の併用投与の細胞増殖、アポトーシスならびに前がん病変形成に与える影響について検討した。

## B. 研究方法

### 動物実験

6 週齢の雄性 F344 ラットを用い、二段階発がんモデルを用いた発がんプロモーション実験に供した。試験開始時にイニシエーターである N-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週間後から PBO を単独 (15,000 ppm) あるいは NOX 阻害剤(Apocynin; APO, 250 ppm)あるいは抗酸化剤(N-acetyl cystein; NAC, 3000 ppm)と併用して混餌投与を 8 週間行った。対照群は基礎飼料で維持し、APO および NAC 単独処置群も設定した。動物は定法に従い、試験 3 週目に部分肝切除を行った。PBO は、これまでの実験で前がん病変指標である GST-P に陽性を示す前がん病変が誘発される用量を投与用量として設定した。APO および NAC もすでに報告のある投与用量を設定した。試験期間中、動物の体重、摂餌量および飲水量を毎週測定し、PBO、APO および NAC の試験期間中の平

均摂取量を算出した。

投与期間終了後、イソフルランの深麻酔下にて血液を採取後、放血致死させ、肝臓を採取し、重量測定を行った。最終体重をもとに相対肝重量を算出した。血液より血漿を分離して血液生化学検査に供した。血液生化学的検査項目として、総蛋白、アルブミン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、クレアチニン、尿素窒素、グルコース、トリグリセライドおよび総コレステロールを測定した。一部の肝臓は遺伝子発現解析・生化学的解析用に分取し、液体窒素で急速凍結した後、検索まで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。また病理組織学的・免疫組織化学的検索用に 4%パラホルムアルデヒド固定した後、パラフィン包埋を行った。

病理組織学的検査および免疫組織化学染色に対する解析

組織学的検索は薄切後にヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。さらに、ラット肝増殖性病変に陽性を示す GST-P 並びに細胞増殖活性マーカーである Ki-67、アポトーシスマーカーである active caspase-3 の免疫組織化学染色による観察を実施した。免疫組織学的染色については、次の手順で行った。脱パラフィン処理した組織切片を、内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3%過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、Ki-67 については、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、active caspase-3 については、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に浸漬し、オートクレーブ  $121^{\circ}\text{C}$  で 10 分間にて反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて正常ウマ血清でブロッキングし、マウス抗 Ki-67 抗体 (50 倍希釈; Dako, Denmark) およびウサギ抗 cleaved caspase-3 (300 希釈; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) を用いて  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit

(Vector Laboratories, USA) を用い、3,3'-ジアミノベンチジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。前がん病変指標としてウサギ抗 GST-P 抗体 (1,000 倍希釈; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Japan) を用いた。GST-P の染色手順は上記に準じたが抗原賦活処置は行わなかった。GST-P 陽性前がん病変は以前の報告と同様に、直径 0.2 mm 以上の病変数と面積、そして肝臓の総面積を計測し、単位面積当たりの数および面積を算出した。Ki-67 および active caspase-3 陽性肝細胞はランダムに選んだ領域の 1000 個以上の肝細胞当たりの百分率を求めた。

遺伝子発現解析では、ランダムに選んだ各群 6 例ずつを対象とし real-time RT-PCR 法にて第一相薬物代謝酵素である *Cyp1a1* と *Cyp2b1/2*、抗酸化酵素の *Nqo1* と *Gpx2*、NOX 関連因子 *Cybb* (*gp91phox/Nox2*) および *Rac1* の特異的 primer set を用いて定量解析した (Table 1)。発現量の補正は内部標準遺伝子である  $\beta$  アクチンを用いて実施した。

統計解析

定量データについて平均値および標準偏差を求めた。すべてのデータについて多群間比較を用い、Bartlett 検定で等分散を確認した後、一元配置分散分析を行った。有意差が認められた場合は Tukey's multiple comparison test を行った。Bartlett 検定で等分散でなかった場合、Steel-Dwass multiple comparison test を実施した。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、また、動物はすべて深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、東京農工大学の利用規定および米国国立衛生研究所が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

## C. 研究結果

試験期間中、肝部分切除に起因して PBO 投与群で 1 匹、NAC 併用群で 2 匹が死亡した。これらの動物の死亡は PBO 処置による影響ではなかった。PBO 単独および併用群において、DEN 単独群と比較して、剖検時に体重の有意な低値が認められた (Table 2)。絶対及び相対肝重量は DEN 単独群と比較して、PBO 単独および併用群において有意に増加した。いずれの項目についても APO あるいは NAC の併用投与による影響は認められなかった。

血液生化学検査では DEN 単独群に比べ、PBO 単独および併用群において総蛋白、アルブミン、尿素窒素および総コレステロールの増加と AST、グルコースおよびトリグリセリドの低下が見られたが、APO あるいは NAC の併用投与による影響は認められなかった。APO および NAC 単独投与群では DEN 単独群に比べ総コレステロールの軽度の増加が認められた (Table 3)。

病理組織学的解析では、各群において変異肝細胞巣 (明細胞性、空胞性、好酸性及び好塩基性) が認められた。免疫組織化学的解析では、DEN 単独群に比べ、GST-P 陽性肝細胞巣の数および面積は PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった (Table 4)。Ki-67 陽性細胞率ならびに active caspase-3 陽性細胞率も PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった (Table 4)。

Real-time RT-PCR でも、第一相薬物代謝酵素である *Cyp1a1* と *Cyp2b1/2*、抗酸化酵素の *Nqo1* と *Gpx2* では DEN 単独群に比較して PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった。一方、NOX 関連因子 *Cybb* (*gp91phox/Nox2*) および *Rac1* に有意な変化は見られなかった (Table 5)。

#### D. 考察

PBO は殺虫剤用共力剤であり、それ自体に殺虫効果はないが、他のピレスロイドとの併用によりその効果を高めることが知られており、国内を含

め広く使用されている。PBO は肝臓の CYP1A および CYP2B inducers であり、ラットにおいて肝発がん promotion 作用を示すことが明らかとなっている (Kawai et al., 2010; Morita et al., 2013)。その機序として ROS 産生の関与が示唆されているものの、ROS 産生源としての CYP の関与は明らかにされていない (Hara et al., 2014)。PBO の肝発がん促進過程には PTEN/Akt や TGF- $\beta$ /Smad シグナルの発現異常が示唆されているため (Tania et al., 2009; Ichimura et al., 2010; Hara et al., 2014) 本研究ではそれらのシグナル伝達に關与する可能性のある非ミクロソーム ROS 産生源である NOX に着目して検討を行った。

その結果、GST-P 陽性巣の数と面積、Ki-67 陽性細胞率、active-caspase 3 陽性細胞率はいずれも PBO により増加した。NOX を介した薬物代謝非依存的な ROS 産生と全般的な ROS 産生の影響を確認する目的で、APO や NAC の併用効果を検討した。しかしながら、前がん病変、細胞増殖およびアポトーシスに対する APO や NAC による増加抑制は見られず、薬物代謝酵素や抗酸化酵素の mRNA 発現レベルも同様であった。また、PBO 投与による NOX 関連因子 *Cybb* (*gp91phox/Nox2*) および *Rac1* に有意な変化は見られなかった。これらの結果は、PBO による肝発がん促進機序には NOX が関与している可能性が低いことを示唆するものであった。*Rac1* 依存性の NOX2 発現は最も普遍的な NOX 活性経路であるが、NOX2 のホモログとして NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, DUOX1, DUOX2 などが知られており、ヒトの肝細胞癌細胞株では NOX4 依存性の TGF- $\beta$ 1 誘導性アポトーシスの発現が報告されている (Carmona-Cuenca et al., 2008)。従って、今後、ラットの二段階発がんモデルにおいても NOX2 以外のホモログの発現についても検討を加える必要がある。なお、肝重量や一部の血液生化学的検査項目に PBO 投与の影響がみられたが、APO あるいは NAC の併用処置による影響は認められなかった。

APO (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) は

*Apocynum cannabinum* や *Picrorhiza kurrora* などの植物の茎から分離、抽出された免疫調整物質であり、貪食細胞や非貪食細胞の NOX 活性を抑制することが報告されている (Stefanska and Pawliczak, 2008)。その抑制機序は完全には解明されていないが、p47<sup>phox</sup> の細胞膜への移行阻害と考えられており、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や MPO の作用により形成された APO ラジカル (APO の 2 量体を含む) が p47<sup>phox</sup> の thiol 基を酸化することによって考えられている。今回、APO による PBO の肝発がん促進効果が見いだせなかったが、グルタチオンやシステインなどのチオールが存在下では APO の作用が抑制されることが知られており、PBO によるグルタチオンの増加が NOX の効果発現に影響を及ぼした可能性が示唆された。PBO 投与ラットの肝臓におけるグルタチオン含量や GSH/GSSG の比率の検討はこれまでなされていないが、GSH の酸化酵素である *Gpx2* の mRNA レベルの増加が本実験やこれまでの研究で確認されている (Morita et al., 2013)。

APO は NOX 特異的な阻害剤であるが、NAC は一般的には抗酸化剤という区分に属する物質である。NAC はこれまでの報告では PPAR $\alpha$  アゴニスト (CYP4A inducer) による肝発がん促進過程に対しては修飾作用を示さず (Nishimura et al., 2009)、CYP1A inducer (Indole-3-carbinol) には抑制効果を示していた (Shimamoto et al., 2011)。GST-P 陽性肝細胞巢を指標とした Indole-3-carbinol の肝発がん促進作用は NAC 併用処置により軽減されたものの、Cyp1A mRNA 発現レベルやミクロソームの ROS 産生、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の発現レベルについての抑制効果は伴っておらず、Indole-3-carbinol についても CYP の誘導と肝発がん促進機構との関連性は明らかとなっていない。今回、CYP1A inducer である PBO 投与の肝臓において NAC 併用処置による修飾作用を見出せなかったことから、同種の薬物代謝酵素を誘導する薬剤においても発がん促進作用に関与する機序が異なる可能性が示唆された。

PBO 投与による NOX 関連遺伝子の発現が検出

できなかった理由とし、PBO そのものが NOX 誘発性を有しなかった可能性に加え、標準的なラット二段階肝発がんモデルでは、試験系や観察期間を含め NOX 関連分子の変動をとらえることが難しくなったことが挙げられる。従って、NOX の発現の高い肝内環境を設定するなどの実験系の改善が必要であると考えられる。NOX の関与する肝傷害として脂肪性肝疾患モデルが知られている。動物に高脂肪食を与えることで NOX の発現増加に伴って脂質過酸化が増加し (Matsunami et al., 2010)、APO 投与により肝脂肪化が軽減することが知られている (Lu et al., 2006)。高脂肪食摂取による脂肪肝は非アルコール性脂肪性肝疾患と呼ばれ、非アルコール性脂肪肝炎やそれに続く肝線維症を経て肝発がんにいたる進行性疾患として知られている (Sheedfar et al., 2013)。このような NOX 高発現環境下において被験物質の肝発がん性を検討することで、NOX の関与する肝発がん促進過程を明確化できる可能性が考えられる。次年度は、背景的に NOX の発現が高いことが示されている脂肪肝モデルを中期肝発がん性試験に適用し、NOX 高発現環境下において肝がん促進効果を検討する予定である。

## E. 結論

肝発がん促進過程における NOX の関与をラット肝二段階発がんモデルを用いて検討したが、PBO の発がん促進過程においては NOX の関与を示唆する知見は得られなかった。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Ishii, Y., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibusani, M., Mitsumori, K.: Liver tumor promoting effect of orphenadrine in rats and its possible mechanism of

action including CAR activation and oxidative stress. J. Toxicol. Sci. 38(3): 403-413, 2013.

Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Enhanced liver tumor promotion activity in rats subjected to combined administration of phenobarbital and orphenadrine. J. Toxicol. Sci. 38(3): 415-424, 2013.

## 2. 学会発表

盛田 怜子, 八舟宏典, 赤根弘敏, 板橋 恵, 白木彩子, 鈴木和彦, 渋谷 淳, 三森国敏: Phenobarbital (PB) とPiperonyl butoxide (PBO) の併用投与によるラット肝発がんプロモーション作用の修飾に関する研究. 第40回日本毒性学会学術集会, 幕張, 第40回日本毒性学会学術集会講演要旨集: P-67, p.S300, 6月17-19日, 2013

盛田 怜子, 林 仁美, 勢川 理紗, 鈴木 和彦, 渋谷 淳, 三森 国敏: CYP誘導剤の肝発がん促進作用に対する相互作用. 第28回発癌病理研究会, 於沖縄, 第28回発癌病理研究会プログラム: p. 34(演題19), 8月26-28日, 2013

Reiko Morita, Ayako Shiraki, Megu Itahashi, Kazuhiko Suzuki, Makoto Shibutani, Kunitoshi Mitsumori: Modification of Combined Administration of CYP Inducers in Rat Liver Tumor Promoting Activity. 11<sup>th</sup> European Congress of Toxicologic Pathology, Ghent, Belgium, P17, p.80, September 10-13, 2013

盛田 怜子, 白木彩子, 板橋 恵, 鈴木和彦, 渋谷 淳, 三森国敏: CYP誘導剤併用投与の肝発がん促進作用に対する影響. 第156回日本獣医学会, 岐阜, 第156回日本獣医学会学術集会講演要旨集: B65, p.223, 9月20-22日, 2013

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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