

図 5

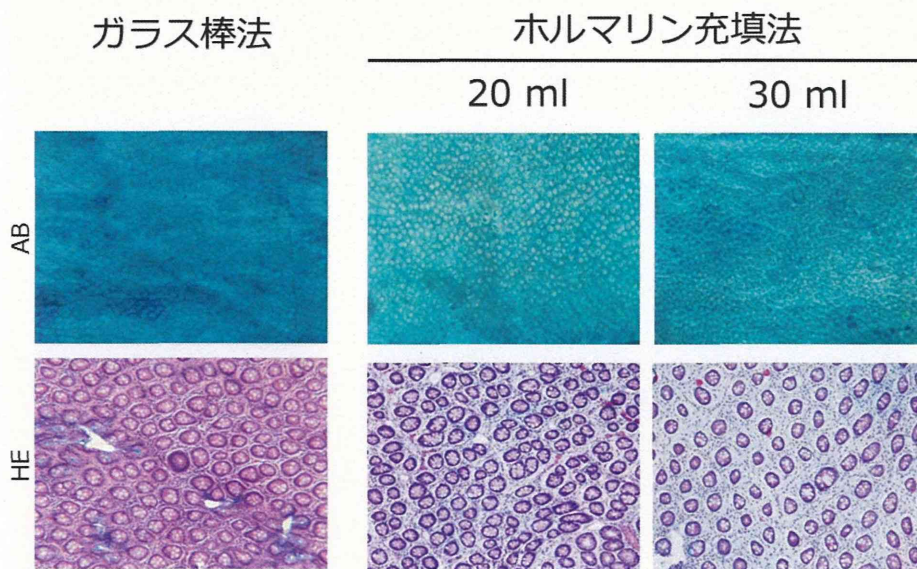


図 6

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 (γ -H2AX) 発現が有意に上昇することを見いだした。昨年度は、前立腺発がん物質あるいは前立腺以外に標的性を示す発がん物質をラットに投与し、発がん標的臓器である前立腺における γ -H2AX、HMGB2、Ki-67 発現の特異性について検討し、HMGB2 や Ki-67 では前立腺発がん物質で有意な上昇を認めたが、他の発がん物質では対照群と差はみられなかった。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が、今年度は大腸および腎における検討を加えて、それぞれの臓器特異性に発がん物質を検出できるかを検討した。結果、肝および腎について HMGB2 および Ki-67 標識率は、それぞれの発がん物質で有意な上昇を示した。 γ -H2AX 標識率は一部の肝および腎発がん物質で上昇を認めず、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。一方大腸においては、いずれも全ての大腸発がん物質において有意な標識率上昇を認めないものの、 γ -H2AX は少なくとも標識率上昇は認め一番有益な結果が得られた。以上より、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、一部の前立腺以外の臓器に対する発がん物質の検出利用も有効であった。

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。

我々は昨年度に、前立腺発がん物質である 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) および 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) で、発現上昇を認めた3つの遺伝子、リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)、High mobility group box 2 (HMGB2) および Ki-67 について、前立腺発がん物質に対する特異性を検討した結果、HMGB2 および Ki-67 で比較的良好な結果が得られた。一方、 γ -H2AX は標識率が 0.02% と低いこともあり、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。

このように、前立腺組織において発がん物質検出マーカーとして有益な遺伝子が他の臓器においても同様に

用いることが可能であるかを、肝組織を用いて検討した結果、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一方で、 γ -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。

そこで、今年度は更なる他臓器での解析を目的として、腎および大腸組織における3つの遺伝子、 γ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 のそれぞれの発がん物質に対する臓器特異性について検討した。

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、 γ -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

腎尿細管における γ -H2AX標識率は、DMNにおいて上昇傾向を認めるものの有意差は見られなかった。一方で、HMGB2およびKi-67標識率は、DMHにおいて有意な上昇を認めた。腎に標的性のない発がん物質PhIP、DMAB、MNU、BOP、DMBA、MeIQxおよびDMHについては、 γ -H2AX、HMGB2およびKi67標識率は対照群といずれも差がなかった。対照群の標識率平均はそれぞれ、 γ -H2AX:0.02%、HMGB2:11%およびKi67:7%だった。

大腸粘膜上皮における γ -H2AX標識率は、PhIP、DMAB、DMHにおいて有意な上昇を認め、MNUやMeIQxについても上昇傾向を認めた。HMGB2標識率は、DMAB群のみ有意な上昇を認めるものの、PhIPは上昇傾向のみ、他のMNU、MeIQxやDMHについては対照群と差がなかった。Ki-67標識率は、PhIP、DMABにおいて有意な上昇を認めるものの、MNUやMeIQxにおいては上昇傾向のみ、DMHについては対照群と差がなかった。一方、大腸粘膜上皮に標的性のない発がん物質BOP、DMBAおよびDMNについては、 γ -H2AX、HMGB2およびKi67標識率は対照群といずれも差がなかった。対照群の標識率平均はそれぞれ、 γ -H2AX:0.1%、HMGB2:95%およびKi67:44%だった。

E. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

- 1) Long, N., Takahashi, S., et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Sci*, 104:298-303, 2013.
- 2) Kobayashi, D., Takahashi, S., et al. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. *Prostate*, 73:913-922, 2013.
- 3) Pitchakarn, P., Takahashi, S., et al. Ellagic acid inhibits migration and invasion by prostate cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14: 2859-2863, 2013.
- 4) Suzuki, S., Takahashi, S., et al. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation.

Exp Toxicol Pathol, 65: 1035-1041, 2013.

- 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*, 133:961-971, 2013.
- 6) Suzuki, S., Takahashi, S., et al. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Cancer Sci*, 104:1711-1717, 2013.
- 7) Sato, S., Takahashi, S., et al. Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. *J Toxicol Pathol*, in press.

2. 学会発表

- 1) 高橋智、前立腺癌の病理組織学的診断～Gleason分類を中心に～、卒後教育プログラム「泌尿器科腫瘍：泌尿器がんの病理診断の基礎知識」、第101回日本泌尿器科学会総会、2013年4月、札幌。
- 2) 鈴木周五、高橋智、他、NADPH oxidase 阻害剤 Apocynin によるラット前立腺発癌抑制効果、第102回日本病理学会総会、2013年6月、札幌。
- 3) 佐藤慎哉、高橋智、他、HDAC 阻害剤 OBP-801 の前立腺発癌抑制作用の検討、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月、横浜。
- 4) 鈴木周五、高橋智、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、2014年1月、徳島。

F. 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。

胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発

研究分担者 塚本 徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨

慢性炎症によって誘導される初期遺伝子異常のマーカーとして γ -H2AXの有用性を検討した。*N*-methyl-*N*-nitrosoureaを投与したマウスに、*Helicobacter pylori*を感染させると γ -H2AXの発現が上昇する傾向が見られた。ヒト胃癌症例では、その胃型・腸型形質発現と比較検討すると胃型形質の欠失とともに γ -H2AXの発現が上昇する傾向が見られた。持続する慢性炎症によって腸型化が進行し、同時に種々の遺伝子異常が蓄積する可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性炎症は、種々の臓器で発がんの重要なリスクファクターであることが知られており、活性酸素によるDNA損傷、遺伝子のメチル化等による発現異常が重要な因子であることが明らかとなってきた。胃では、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*, ピロリ菌) 感染は胃発がんのリスクファクターであることが疫学的にも実験的にも証明されている。しかし、胃発がん初期過程における遺伝子変異あるいは遺伝子発現異常、さらにはそれに伴う形態変化は明らかにされていない。近年、*H. pylori*感染に伴って、本来、Bリンパ球のクラススイッチに必要な activation-induced cytidine deaminase (AID)が異所性に発現し、遺伝子変異を誘発することが明らかになってきた。また、変異部位においては、AIDとともにSer139がリン酸化されたヒストンH2AX (γ -H2AX)がフォーカスを形成し、*H. pylori*感染による炎症に伴って発生する活性酸素によるDNA損傷でも γ -H2AXの発現が誘導される。本研究では、マウスおよびヒト胃癌において γ -H2AXの発現を検討し、初期遺伝子変異のマーカーとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

(1) マウス実験：

5週齢オスC57BL/6マウスに120ppm *N*-methyl-*N*-nitrosoureaを飲水投与(MNU群)し、*H. pylori*感染(Hp)群、10%食塩食(NaCl)群、それらの複合群を設け実験第40週で屠殺した。MNU群、MNU+Hp群、MNU+NaCl群、およびMNU+Hp+NaCl群において発生した腺癌を用いた。パラフィンブロックを3 μ mで薄切し、脱パラフィンし、抗原賦活化後、rabbit polyclonal 抗ヒト γ -H2X抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)で反応後、Ventana自動免疫染色装置(Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ)を用いて免疫染色を行った。 γ -H2AXの腫瘍内での発現の割合に応じてscore 0~3の4段階にスコアリングした(score 0=0-5%、score 1=6-33%、score 2=34-66%、score 3=67-100%)。Graphpad Prism ver. 6(Graphpad Software, La Jolla, CA)を用いて統計学的に解析し、 $P<0.05$ を有意と判定した。

(2) ヒト実験：

ヒト胃腫瘍においても γ -H2AXの発現を評価し、胃型・腸型形質発現との関係を検討した。MUC5ACあるいはMUC6陽性の腫瘍を胃型、MUC2あるいはCD10陽性のものを腸型、胃型および腸型マーカーのいずれもが陽性のものを胃腸混合型、いずれのマーカーも陰性のものをヌル型と判定した。マウス実験と同様に4段階にスコアリングし統計学的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議、2006年)を遵守し遂行した。ヒト検体については、インフォームド・コンセントの得られた検体を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

C. 研究結果

(1) マウス実験：

マウス腫瘍では、それぞれのスコアの平均値 \pm SEは、MNU群 0.80 ± 0.20 に対して、MNU+Hp群、MNU+NaCl群、およびMNU+Hp+NaCl群では、それぞれ、 2.00 ± 0.71 、 1.80 ± 0.49 、 2.20 ± 0.37 といずれも上昇傾向にあった(Kruskal-Wallis test, $P=0.15$)。マウス胃癌では、*H. pylori*感染とそれによる炎症によって γ -H2AX発現が増加する傾向が見られた。

(2) ヒト実験：

ヒト胃癌では、胃型+胃腸混合型では、 γ -H2AXのscore 1+2、score 3がそれぞれ10例、0例に対して、腸型+ヌル型では、それぞれ10例、5例と、胃型を喪失した後の方で γ -H2AX強発現症例が増加する傾向が見られた(Fisher's exact test, $P=0.06$)。ヒト胃では、*H. pylori*長期感染によって徐々に胃型粘膜が腸型へ移行することが明らかになっている。本研究結果では、胃癌の進展に伴って胃型形質の欠失が起こり、同時に遺伝子変異の蓄積によって、 γ -H2AX発現が増加することが示唆された。

D. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asada, K., Ando, T., Niwa, T., Nanjo, S., Watanabe, N., Okochi-Takada, E., Yoshida, T., Miyamoto, K., Enomoto, S., Ichinose, M., Tsukamoto, T., Ito, S., Tatematsu, M., Sugiyama, T., Ushijima, T. FHL1 on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the formation of an epigenetic field defect. *Oncogene* 32: 2140-2149, 2013.
- 2) Fang, J., Seki, T., Tsukamoto, T., Qin, H., Yin, H., Liao, L., Nakamura, H., Maeda, H. Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) involves suppression of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Carcinogenesis* 34: 2833-2841, 2013.
- 3) Niwa, T., Toyoda, T., Tsukamoto, T., Mori, A., Tatematsu, M., Ushijima, T. Prevention of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancers in Gerbils by a DNA Demethylating Agent. *Cancer Prev Res (Phila)* 6: 263-270, 2013.
- 4) Nojiri, A., Toyoda, T., Tanaka, T., Yoshida, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T. Inflammation enhanced X-irradiation-induced colonic tumorigenesis in the Min mouse. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 4135-4139, 2013.
- 5) Toyoda, T., Tsukamoto, T. (equal contributors), Yamamoto, M., Ban, H., Saito, N., Takasu, S., Shi, L., Saito, A., Ito, S., Yamamura, Y., Nishikawa, A., Ogawa, K., Tanaka, T., Tatematsu, M. Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model: identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 13: 122, 2013.
- 6) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M. *Helicobacter pylori* infection and gastric

carcinogenesis in rodent models. *Semin Immunopathol* 35: 177-190, 2013.

- 7) Okochi-Takada, E., Hattori, N., Tsukamoto, T., Miyamoto, K., Ando, T., Ito, S., Yamamura, Y., Wakabayashi, M., Nobeyama, Y., Ushijima, T. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene* 33: 2273-2278, 2014.
- 8) Tsukamoto, T., Tatematsu, M. Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Neoplasia. *Curr Infect Dis Rep* 16: 402, 2014.

2. 学会発表

- 1) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Kiriya, Y., Tatematsu, T. Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model: Identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. 4th JCA-AACR Special Joint Conference on The Latest Advances in Gastric Cancer Research. Dec., 2013. Maihama
- 2) 桐山諭和、豊田武士、山本昌美、立松正衛、塚本徹哉。N-methyl-N-nitrosourea 誘発マウス腺胃発癌モデルにおける *Helicobacter pylori* 感染と高食塩食による遺伝子発現変動。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。個体レベルからみた炎症とがん-がん発生・進展における個体内相互作用。2014 年 2 月。大津

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

大腸前癌病変を構成する細胞の起源に関する研究

研究分担者 久野 壽也 名古屋市立大学医学部実験病態病理学 准教授

研究要旨

大腸上皮幹細胞である *Lgr5* 発現細胞の lineage tracing system を用いて、同細胞が大腸化学発癌物質のターゲットである可能性を探った。その結果、*Lgr5* 発現細胞がアゾキシメタンの標的細胞となっている可能性が示唆される microadenoma を確認した。また、アゾキシメタン誘発マウス大腸腫瘍モデルを用いて二次胆汁酸の一つであるデオキシコール酸摂取による発癌促進リスクを評価した。遠位大腸は発癌プロモーション作用のみ観察されたが、近位ではプロモーション作用に加え、イニシエーション作用を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

大腸上皮幹細胞は陰窩の底部に存在し、長期にわたって腺管を構成する上皮細胞を供給し続けることから、化学物質の主たる標的のひとつであることが推察される。今回、lineage tracing system を用いて、*Lgr5* 発現細胞が化学発癌物質の標的となる可能性を探った。また、化学物質の発癌性リスク評価の観点から、大腸の部位によって腫瘍発生に及ぼす影響が異なる可能性のある二次胆汁酸、デオキシコール酸の修飾作用をアゾキシメタン (AOM) 誘発マウス大腸腫瘍モデルで検討した。

B. 研究方法

(実験 1) タモキシフェン (TAM) 投与により *Lgr5* 発現細胞に β -galactosidase を発現する *Lgr5-GFP-IRES-creERT2* knock-in; *Rosa26-LacZ* reporter mice に対し、AOM および TAM をそれぞれ皮下と腹腔内へ同時投与した。前癌病変の発生を促進するため、投与 1 週間後より 1.5% のデキストラン硫酸ナトリウムを 1 週間飲水投与した。実験開始 5 週間後に犠牲死させ、大腸を摘出し、病理組織標本を作製した。粘膜内病変に X-gal 染色、HE 染色を行い、染色性と染色パターンを評価した。

(実験 2) 8 週齢の雄性 C57BL6 マウスに対し AOM (10 mg/kg 体重) を 1 回/週、4 週腹腔内投与し、終了 1 週間後からそれぞれ 0.04, 0.2, 0.5% の濃度でデオキシコール酸を混餌投与した。混餌開始後 2 週間で一部マウスの大腸粘膜を採取し、NF- κ B 関連遺伝子の発現解析を行った。実験開始後 24 週で残るマウスの大腸を摘出し、中遠位大腸は粘膜面に対し en face の病理組織標本を作成して網羅的に大腸前癌病変を評価した。盲腸隆起性病変は粘膜面に垂直な病理標本を作製し、ki-67, β -catenin の免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

実験は実験動物を対象にしたものであり、動物の取り扱いに関しては生命倫理に配慮し、岐阜大学動物実験指針に沿って行った。また、レポーターマウスを用いた実験は岐阜大学組み換え DNA 実験委員会に申請承認後に行った。

C. 研究結果

(実験 1) *LacZ* を発現するマウス大腸 microadenoma の出現を確認した。*LacZ* は microadenoma を構成するすべての細胞に発現していた。

(実験 2) 0.04, 0.2, 0.5% 摂取群の腫瘍性病変発生率 (処置マウス中の罹患マウスの割合)、大腸あたり microadenoma 数、adenocarcinoma 数はそれぞれ 80%, 1.7 ± 1.5 , 0; 70%, 1.8 ± 2.1 , 0.1 ± 0.3 ; 100%, 6.2 ± 1.4 , 0.7 ± 1.1 であり、AOM 単独群の 60%, 0.7 ± 0.7 , 0 と比較して microadenoma 数、adenocarcinoma 数が 0.5% 摂取群において有意に増加していた ($P < 0.01$, 0.05)。また、デオキシコール酸摂取により、盲腸に隆起性病変の発生が見られ、いずれの病変も β -catenin の胞体内蓄積や核内移行も観察されなかったが、ki-67 陽性細胞が高位にまで見られ、構造異型から腺腫、腺癌に分類される病変との結論に至った。盲腸隆起性病変は 0.2, 0.5% 摂取群にのみ見られ、デオキシコール酸単独でも腫瘍の発生が見られたが、AOM の投与により腫瘍は有意に増加した

($P < 0.05$)。デオキシコール酸摂取により遠位大腸粘膜の NF- κ B 関連遺伝子に変化が見られたが有意ではなかった。

D. 考察

実験 1 の結果から、AOM は *Lgr5* 発現細胞を標的細胞のひとつにしており、大腸 microadenoma の幾つかは AOM によるイニシエーションを受けた *Lgr5* 発現細胞がモノクローナルな増殖を来した病変であると推察された。実験 2 の結果からはデオキシコール酸が中遠位大腸では腫瘍性病変のプロモーターとして、近位大腸ではイニシエーターおよびプロモーターとして作用することが示された。

E. 結論

AOM 誘発マウス大腸前癌病変に幹細胞由来と考えられる microadenoma を確認した。また、デオキシコール酸の混餌投与は AOM 誘発大腸前癌病変および大腸腺癌の発生を促進するとともに、単独でも近位大腸に腫瘍性病変を形成することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ninomiya F, Yokohira M, Kishi S, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T, Kuno T, Imaida K. Gender-dependent effects of gonadectomy on lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female and male A/J mice. *Oncol Rep.* 30:2632-8. 2013
2. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Hatano Y, Tomita H, Kuno T, Saito K, Hara A. IDO1 plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice. *J Immunol.* 191:3057-64. 2013
3. Kuno T, Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A, Mori H, Terasaki M, Matsuda S, Tanaka T. Organomagnesium suppress inflammation-associated colon carcinogenesis in male Crj:CD-1 mice. *Carcinogenesis.* 34:361-9. 2013
4. Binh NH, Satoh K, Kobayashi K, Takamatsu M, Hatano Y, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Hara A. Galectin-3 in preneoplastic lesions of glioma. *J Neurooncol.* 111:123-32. 2013

2. 学会発表

1. 炎症関連 TSOD マウス大腸発癌に対する ACE 阻害薬 enalapril の修飾効果. 久野壽也、田中卓二、三輪貴生、小川博史、遠藤奨、後藤滉平、原明；第 20 回日本がん予防学会 平成 25 年 7 月，東京
2. Deoxycholic acid, secondary bile acid promotes AOM-induced colorectal carcinogenesis in distal colon of mice but not proximal colon. Kuno T, Tanaka T, Takamatsu M, Hatano Y, Tomita H, Hirose Y, Hirata A, Hara A; The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 2013, Yokohama
3. マウス大腸発癌に及ぼすデオキシコール酸の影響. 久野壽也、田中卓二、内木綾、佐藤慎哉、鈴木周吾、高橋智；第 30 回日本毒性病理学会総会 平成 26 年 1 月，徳島
4. マウス大腸発癌における大腸上皮幹細胞の関与. 久野壽也、田中卓二、平田暁大、原明、高橋智；第 103 回日本病理学会総会 平成26年4月，広島

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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。

遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発

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

本研究では、DCP のマウスおよびハムスターにおける肝・胆道系および肝薬物代謝酵素発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。昨年度に行った DCP の B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターを用いた 3 日間強制胃内投与試験では、500 mg/kg BW の用量でマウスおよびハムスターに広範囲な小葉中心性肝細胞壊死を誘発することを明らかとした。また、マウスおよびハムスターの DCP 投与群で、非壊死領域の肝細胞における GST-T1 の発現が対照群に比較して増加したことから、GST-T1 が DCP の毒性発現機序に関与する可能性が示唆された。本年度では、さらなる肝毒性機序の解明を目指し、B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターに前年度より低い用量の DCP（125 ないし 250 mg/kg BW）で 4 週間強制胃内投与を行い、DCP の肝胆道系および肝薬物代謝酵素に及ぼす影響を検討した。その結果、マウスおよびハムスター共に、125 および 250 mg/kg BW 投与群の全例で肝細胞におけるびまん性脂肪変性が認められた。一方、マウスおよびハムスターの胆管上皮では、病理組織学的所見を認めず、Ki-67 陽性率で、対照群と DCP 投与群との間に有意な差を認めなかった。肝細胞の薬物代謝酵素に対する検討では、マウスおよびハムスター共に、小葉中心部（壊死発生部位）が CYP2E1 陽性であったことから、CYP2E1 が DCP 誘発肝細胞障害の発症に重要である可能性が示唆された。一方、GST-T1 の発現では、対照群に比較して DCP 投与群で壊死発生部位である小葉中心部で減少し、小葉周辺部では増強したことから、GST-T1 は、DCP の解毒酵素として働く可能性が強く示唆された。また、マウスとハムスターの DCP 投与群で CYP2A4 の発現増加が認められた。以上より、マウスおよびハムスターにおいては、DCP による肝細胞毒性が認められ、CYP2E1、CYP2A4 および GST-T1 による DCP の代謝が毒性発現機序に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、大阪の印刷工場労働者において胆管がんが多発しており、既知の胆管がん発症機序であるウイルス感染、膵・胆管合流異常、結石や肝吸虫による発がん機序と異なる化学物質による発がん機序の可能性が示唆されている。現在、dichloromethane (DCM) 及び 1,2-dichloropropane (DCP) などを含む有機溶剤の長期間にわたる高濃度曝露が胆管がん発症の原因として疑われている。一方、ラットとマウスを用いたがん原性試験において DCM および DCP の胆管発がん性は認められていないが、胆道系発がん高感受性であるハムスターを用いた一般毒性と発がん性の検討はまだなされていない。また、DCM および DCP の代謝に P450 酵素群及び glutathione S transferase T1 (GST-T1) の関与を示唆する報告があるが、代謝経路の詳細に関する報告はまだなされていない。本研究では、DCM および DCP のハムスターおよびマウスにおける肝・胆道系および肝薬物代謝酵素発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。昨年度では、B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターに DCP および DCM を 500 mg/kg BW の用量で 1 日 1 回、3 日間強制胃内投与

を行った。その結果、胆管において、両化合物でハムスターおよびマウス投与群に毒性変化を認めなかった。一方、肝臓において、マウスおよびハムスターの DCP 投与群のみ全例に広範囲な小葉中心性肝細胞壊死が認められた。このことから、DCP は DCM と比較し、強い肝毒性を有することが明らかとなった。しかし、いずれの群においても胆管上皮傷害は認められなかった。また、マウスおよびハムスターの DCP 投与群で、非壊死領域の肝細胞における GST-T1 の発現が対照群に比較して増加したことから、GST-T1 が DCP の毒性発現機序に関与することが示唆されたが、肝細胞壊死が広範囲のためその他の代謝酵素を含めた詳細検討は行えなかった。そこで、本年度は、DCP 誘発肝毒性の機序解明にフォーカスして、B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターに前年度より低い用量の DCP（125 ないし 250 mg/kg BW）で 4 週間強制胃内投与を行い、DCP の肝胆道系および肝薬物代謝酵素に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1. 動物実験

7 週齢雄性 B6C3F1 マウス 15 匹を日本チャール

ス・リバー株式会社より購入した。7週齢雄性シリアンハムスター15匹を日本エスエルシー株式会社より購入した。マウスとハムスターとも、1週間の馴化飼育の後、各群5匹ずつ3群に分けた。

被検物質投与群にそれぞれにDCP(和光純薬、1,2-dichloropropane dichloromethane、純度：>98%)を125ないし250 mg/kg BWの用量で、5回/週、4週間強制胃内投与を行った。溶媒対照群にはコーン油(和光純薬)を投与した。全動物は、一般状態を毎日観察し、週1回体重、飲水量および摂餌量を測定した。実験開始より4週間後に、全動物を麻酔下で、腹部大動脈から採血後に脱血致死させ、と殺・剖検を行い、肝臓を摘出し、重量を測定した。全群において肝臓のホルマリン固定パラフィン標本を作製し、病理組織学的検討ならびにCYP2E1、Glutathione S-transferase T1(GST-T1)、Ki-67の免疫組織化学的検討を行った。また、マウスの肝臓凍結サンプルからRNAを抽出し、quantitative RT-PCRを用いて薬物代謝酵素であるシトクロームP450スーパーファミリー1-4各分子種のmRNA発現を検討した。その中で変動が認められたCYP1A1およびCYP2A4については、ハムスターおよびマウスの肝臓凍結サンプルからタンパク質を抽出し、Western blot法を用いてその発現量を検討した。

2. 統計学的解析

体重、摂餌量、臓器重量およびP450各分子種の発現量の平均値についてBarlett法による等分散検定を行った。等分散の場合はパラメトリックのDunnnett法による両側検定を行い、不等分散の場合はノンパラメトリックのSteel法による両側検定を行った。病理組織学的検査における発生頻度の差の検定については、Fisherの直接確率検定を行った。

3. 倫理面への配慮

動物実験は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設において行われ、動物実験の開始前には実験計画書を大阪市立大学実験動物委員会に提出し、その承諾を得た上で動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないために麻酔下にて実施した。

C. 研究結果

1. 一般状態

最終体重、生存率、絶対および相対肝重量を表1に示す。

マウスのDCP投与群で死亡例は認められなかった。最終体重が各投与群の間に有意な差は認められなかったが、絶対および相対肝重量が対照群に比較して125および250 mg/kg BW投与群で有意に増加した。

ハムスターにおいて、125 mg/kg BW投与群で第1週に、250 mg/kg BW投与群で第1、3、および4週

に、1例ずつ死亡が認められた。最終体重が対照群に比較して250 mg/kg BW投与群で統計学的に有意な差は認められなかったものの、顕著に低下した。相対肝重量が250 mg/kg BW投与群で有意に増加したが、絶対肝重量には有意な変化は認められなかったため、相対肝重量の増加は体重の減少に伴ったものと考えられた。

2. 肝臓における病理学的所見

マウスとハムスターとともに、125および250 mg/kg BW投与群の全例にびまん性に脂肪変性が認められた。しかし、いずれの群においても胆管上皮にはDCP投与による変化は認められなかった(表2)。

3. マウス肝臓における薬物代謝酵素の発現

免疫組織化学染色の結果を表2に示す。小葉中心部の肝細胞にCYP2E1の発現が認められた。125および250 mg/kg BW投与群でCYP2E1の発現がDCP投与による変化は認められなかったが、昨年度の実験で得られた500 mg/kg BW DCPを投与したマウスの肝臓について検討したところ、肝細胞壊死がCYP2E1陽性領域内で起こっていることを見いだした(図1)。

GST-T1の発現が小葉中心部の肝細胞に認められ、その発現量が対照群に比較して125および250 mg/kg BW投与群で減少した(図2)。胆管上皮細胞においてもGST-T1の発現が認められたが、DCP投与による変化は認められなかった。

マウス肝臓におけるP450スーパーファミリー1-4各分子種のmRNA発現量を検討した結果(図3A)、CYP2A4およびCYP4A14の発現量が125および250 mg/kg BW投与群で、CYP1A1が250 mg/kg BW投与群で有意に増加した。一方、CYP2C29およびCYP3A11が両DCP投与群で有意に減少した。なお、CYP1A2、CYP1B1、CYP2B10、CYP2E1およびCYP4A10が対照群とDCP投与群の間に有意な差は認められなかった。さらに、CYP1A1およびCYP2A4について、Western blot法を用いてタンパク質の発現量を検討した結果(図3B)、CYP2A4の発現量が対照群に比較して125および250 mg/kg BW投与群で増加したことが確認された。一方、CYP1A1の発現量にはDCP投与による変化は認められなかった。CYP4A14の蛋白質発現解析に適した抗体が入手できなかったため、そのタンパク質発現量の検討は行わなかった。

4. ハムスター肝臓における薬物代謝酵素の発現

免疫組織化学染色では、小葉中心部の肝細胞にCYP2E1の発現が認められ、その発現が対照群に比較して125 mg/kg BW投与群で変化は認められなかったが、250 mg/kg BW投与群では明らかな増強が認められた(図4)。さらに、昨年度の実験で得られた500 mg/kg BW DCPを投与したハムスターの肝臓について検討したところ、マウスと同様に肝細胞壊死がCYP2E1陽性領域内に起こっていることを見いだし

た (図 5)。

GST-T1 が対照群の肝小葉全体に発現が認められ、小葉中心部で周辺部より高い発現を示した。GST-T1 の発現が 125 mg/kg BW 投与群で対照群に比較して小葉中心部で軽度減少したが、小葉周辺部では軽度に増加した。さらに、250 mg/kg BW 投与群において、GST-T1 の発現が小葉中心部で認められなかったが、小葉周辺部では顕著に増加した (図 6)。

一方、胆管上皮細胞ではいずれの群においても CYP2E1 および GST-T1 の発現は認められなかった。

さらに、マウスの肝臓で DCP 投与により mRNA 発現の増加が認められた CYP1A1 および CYP2A4 について、Western blot 法を用いて検討した結果 (図 7)、CYP2A4 の発現量が対照群に比較して 125 および 250 mg/kg BW 投与群で増加した。一方、CYP1A1 の発現量には DCP 投与による変化は認められなかった。

5. マウスおよびハムスターの胆管上皮における細胞増殖能

マウスおよびハムスターの胆管上皮における Ki-67 陽性率は、各群の間に有意な差を認めなかった (図 8)。

D. 考察

マウスとハムスターとともに、DCP 投与による肝細胞壊死が CYP2E1 陽性領域内に認められたことから、CYP2E1 が DCP の肝毒性の発現には重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、興味深いことに、GST-T1 により代謝された際の代謝中間体が DCP の発がんに関与する可能性が報告されているが、本研究では、GST-T1 の発現が対照群に比較してマウスおよびハムスターの DCP 投与群で小葉中心部 (壊死の発生部位) の肝細胞で減少し、小葉周辺部 (壊死の非発生部位) の肝細胞では増強した。これらのことから、GST-T1 が肝細胞においては DCP の解毒酵素として働いていることが強く示唆された。今後の予定として、CYP2E1 欠損マウスを用いて、CYP2E1 の DCP の肝毒性の発現における役割を明らかにすると同時に、DCP が CYP2E1 の欠損によって作り出された GST-T1 の高活性化状態下で肝胆道系に及ぼす影響を検討する。

また、本研究では DCP 投与群で胆管上皮に組織学的変化および細胞増殖能の変動は認められなかったが、投与期間が短いため、DCP の胆管系に及ぼす影響を明らかにするためには、今後長期投与試験ならびに二段階胆管発がんモデルを用いた検討が必要と考えられた。

E. 結論

本研究の条件下では、DCP がマウスおよびハムスターにおいて肝毒性を示すことが明らかとなった。一方で、胆管上皮における DCP の毒性は特定できなかった。また、CYP2E1, 2A4 および GST-T1

が DCP の代謝及びその肝毒性の発現に関与することが示唆された。本研究は DCP の胆管発がんリスク評価モデルの開発に有用な基礎データを提供できたものと考えられる。

F. 健康危険情報

1,2-ジクロロプロパンがマウスおよびハムスターでは肝毒性を示す。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, 390-400, 2013.
2. 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.
3. 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 cytokeratin 19 expression and preoperative serum CYFRA21-1 levels in human lung squamous cell carcinoma. *Osaka City Med J*, 59, 35-44, 2013.
4. 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.

5. 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.
6. 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.

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. 梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、長野嘉介、西脇富久美、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 (2013 年 8 月)
3. 魏 民、山野荘太郎、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)
4. 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)

H. 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
3. その他 なし

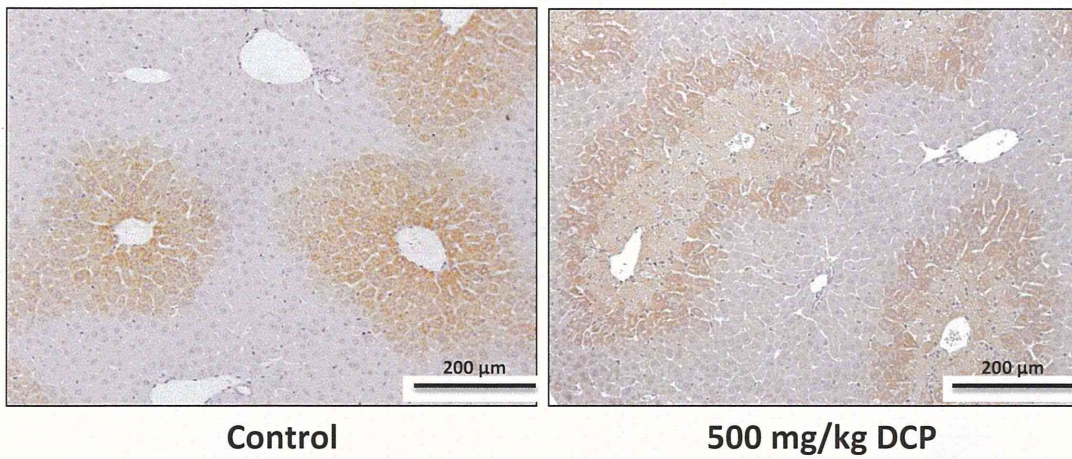


図 1. マウス肝臓における CYP2E1 の発現(3 日間試験)

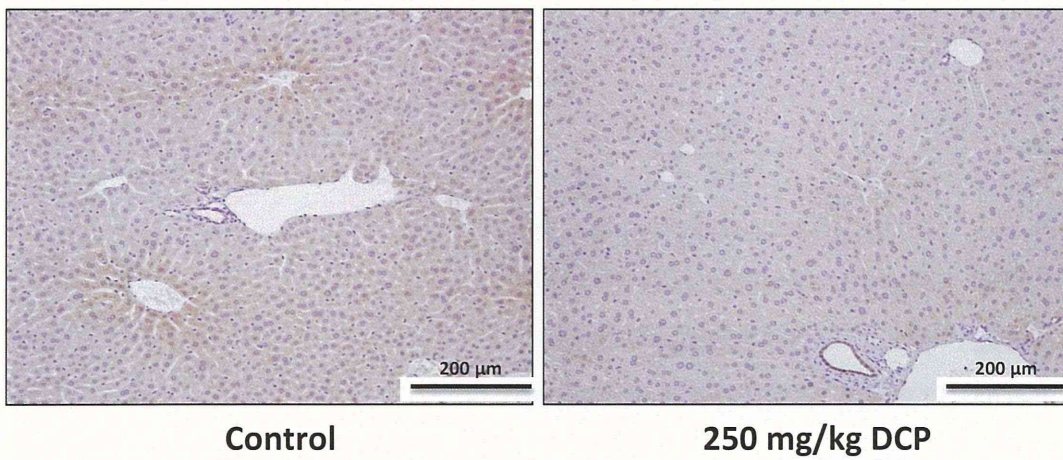


図 2. マウス肝臓における GST-T1 の発現(4 週間試験)

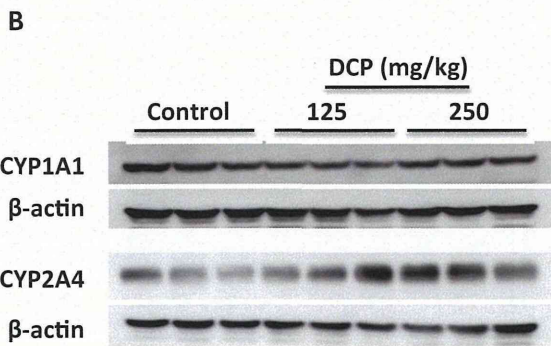
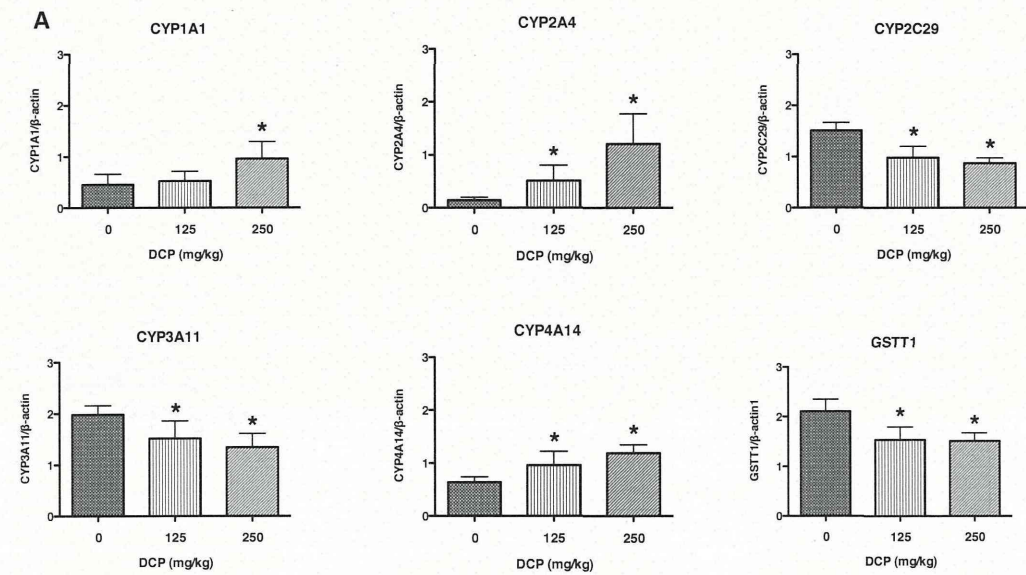
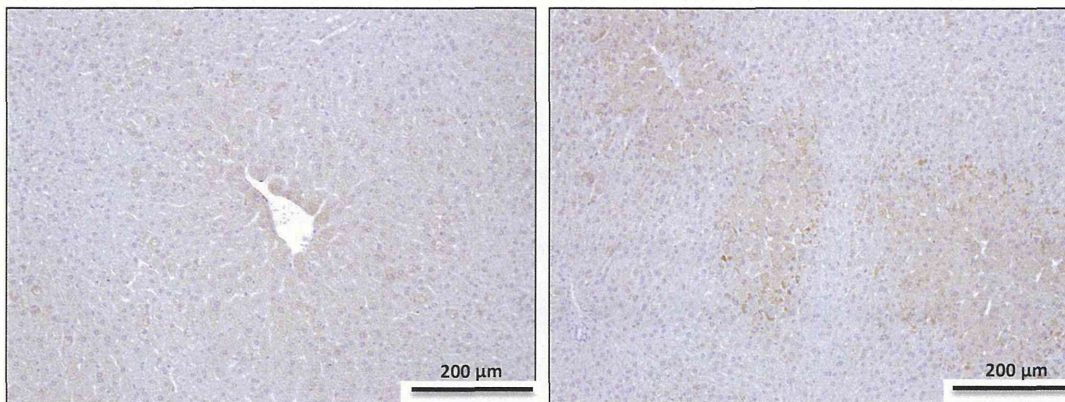


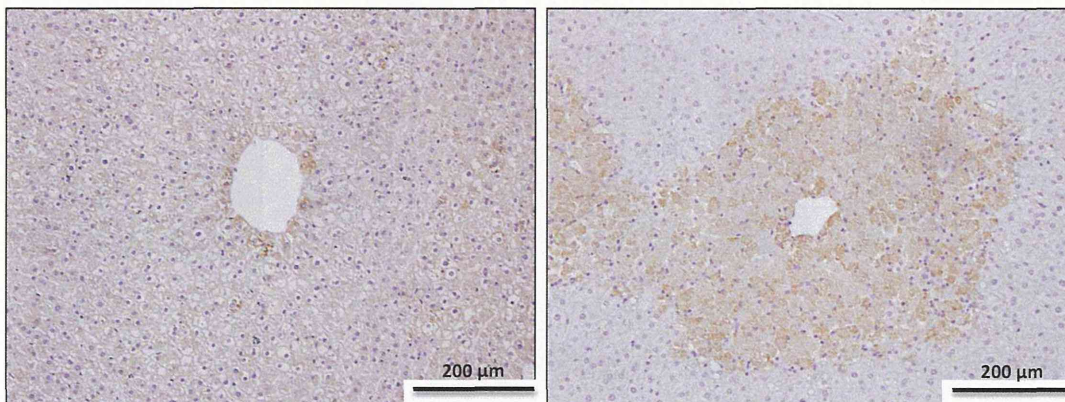
図3. マウス肝臓における P450 分子種の発現. A:mRNA 発現量 (Q-PCR 法) ; B:蛋白質発現量 (Western blot 法)



Control

250 mg/kg DCP

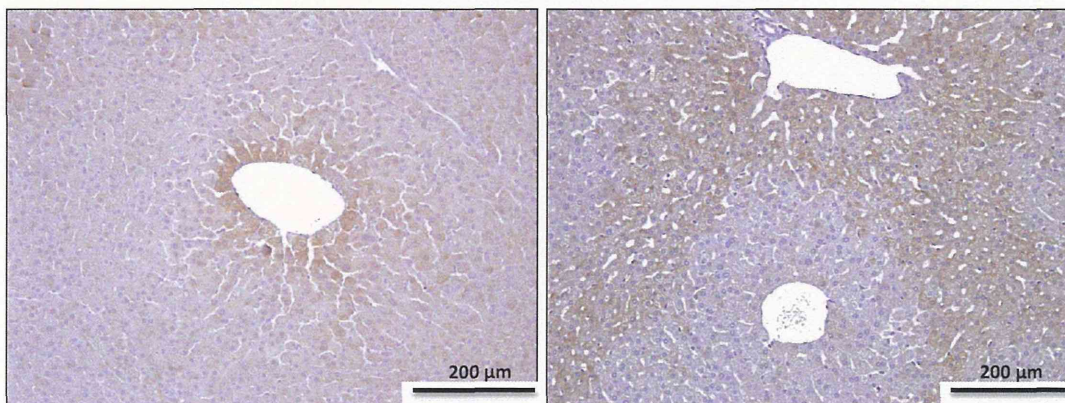
図 4. ハムスター肝臓における CYP2E1 の発現 (4 週間試験)



Control

500 mg/kg DCP

図 5. ハムスター肝臓における CYP2E1 の発現 (3 日間試験)



Control

250 mg/kg DCP

図 6. ハムスター肝臓における GST-T1 の発現 (4 週間試験)

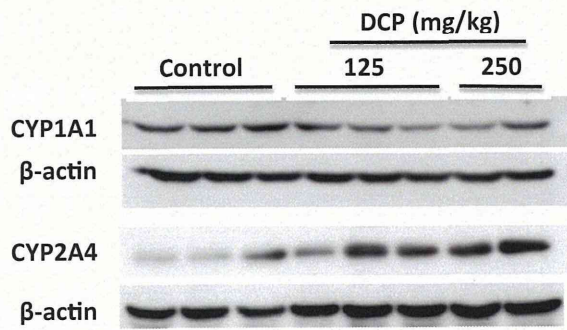


図 7. ハムスター肝臓における CYP1A1 および CYP2A4 の発現 (Western blot 法)

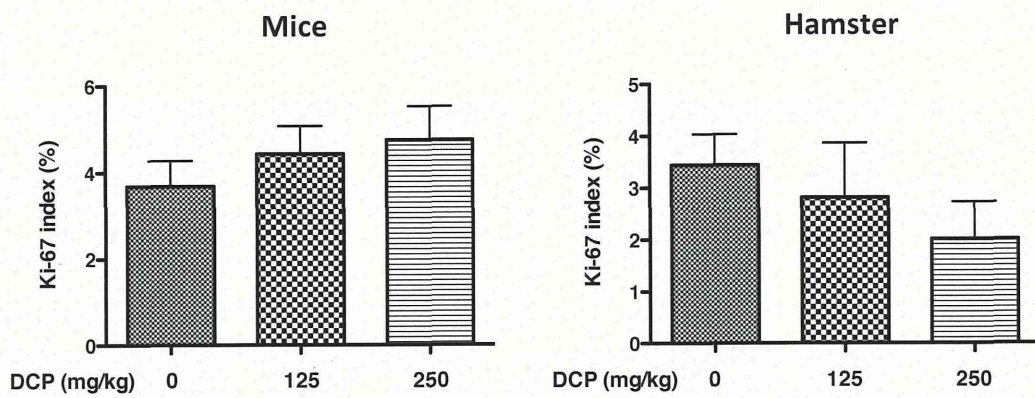


図 8. 胆管上皮における Ki-67 陽性率 (4 週間試験)

表1 マウスおよびハムスターの生存率、最終体重および肝臓重量

Treatment	Dose of DCP (mg/kg BW)	Experimental duration	Initial number of animals	Number of surviving animals (%)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Absolute liver weight (g)	Relative liver weight (%)
Mouse								
Control	0	3 days	5	5 (100)	28 ± 1	28 ± 1.5	1.20 ± 0.12	4.25 ± 0.25
DCP	500	3 days	5	4 (80)	28 ± 1	27 ± 1.9	1.23 ± 0.05	4.53 ± 0.51
Control	0	4 weeks	5	5 (100)	26 ± 1	25.2 ± 1.6	0.93 ± 0.05	3.69 ± 0.16
DCP	125	4 weeks	5	5 (100)	27 ± 1	25.9 ± 1.1	1.04 ± 0.03 **	4.03 ± 0.20 *
DCP	250	4 weeks	5	5 (100)	27 ± 1	26.1 ± 0.8	1.10 ± 0.06 ***	4.20 ± 0.14 ***
Hamster								
Control	0	3 days	5	5 (100)	118.8 ± 7	119.9 ± 7.2	5.24 ± 0.19	4.37 ± 0.14
DCP	500-250	3 days	5	4 (80)	118.4 ± 6	106.6 ± 5.5*	5.19 ± 0.10	4.91 ± 1.17
Control	0	4 weeks	5	5 (100)	124 ± 2	146.8 ± 7.1	5.46 ± 0.48	3.72 ± 0.22
DCP	125	4 weeks	5	4 (80)	122 ± 10	140.3 ± 16.9	5.45 ± 0.74	3.88 ± 0.07
DCP	250	4 weeks	5	2 (40)	120 ± 8	123.5 ± 1.7	5.27 ± 0.21	4.27 ± 0.11 *

Significantly different from respective control at *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

表2 マウスおよびハムスターの肝臓における病理学的所見、CYP2E1 お GSTT1 の発現

	Experiment duration	Histopathological findings		CYP2E1			GSTT1		
		Fatty change	Centrilobular necrosis	Hepatocyte			Hepatocyte		
				Centrilobular area	Periportal area	Bile duct epithelial cells	Centrilobular area	Periportal area	Bile duct epithelial cells
Mouse									
Control	3 days	0/5 (0)	0/5 (0)	++	-	-	+	++	++
500 mg/kg DCP	3 days	5/5 (100%)	5/5 (100%)	++	-	-	-	+	++
Control	4 weeks	0/5 (0)	0/5 (0)	++	-	-	++	-	++
125 mg/kg DCP	4 weeks	5/5 (100%)	0/5 (0)	++	-	-	+	-	++
250 mg/kg DCP	4 weeks	5/5 (100%)	0/5 (0)	++	-	-	+	-	++
Hamster									
Control	3 days	0/5 (0)	0/5 (0)	+	-	-	+	-	-
500→250 mg/kg DCP	3 days	5/5 (100%)	5/5 (100%)	++	+++	-	-	+++	-
Control	4 weeks	0/5 (0)	0/5 (0)	+	-	-	+++	+	-
125 mg/kg DCP	4 weeks	5/5 (100%)	0/5 (0)	+	-	-	+	++	-
250 mg/kg DCP	4 weeks	5/5 (100%)	0/5 (0)	++	-	-	-	+++	-

(-: negative; +: weak; ++: moderate; +++: strong)

肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発に関する研究

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 助教

研究要旨

本研究はマウスおよびラットの肺腫瘍モデルにおける早期病変について、将来の腫瘍化の推定が可能なマーカーの同定を目的とした。腺系腫瘍は、Pulmonary Surfactant Protein C (SP-C) 抗体陽性のII型肺胞上皮由来、扁平上皮異型細胞はClara cell secretory protein (CCSP) 抗体陽性のクララ細胞由来であることが判明した。また、肺早期病変である過形成病変において、Napsin Aの肺胞壁内細胞への高発現の有無により、腫瘍化の判別が可能であることが明らかになった。肺発がんの早期病変における組織型および潜在腫瘍化の判別に有用と期待される。Napsin Aの発現は肺サーファクタンとプロテイン-Bの発現に若干相同性を示した。

A. 研究目的

ラットの肺腫瘍誘発物質としては、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) (2週間の飲水投与) が知られている。しかし、肺腫瘍発生までには約30週間と長期を要する。マウスでは、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)の腹腔内投与による肺腫瘍モデルが存在するが、これも肺腫瘍発生までに最短で12週間を要する。

これらのモデルにおいて、早期に過形成病変が出現するが、将来、軽快するものと悪性化するものが混在している。本研究では肺発癌の早期病変における将来の悪性化を予想することが可能なマーカーの検索を目的とした。このマーカーにより、物質の発癌修飾作用についての評価をより短期間で行うことができると期待される。さらに、早期病変で起こる悪性化のメカニズムについて、新たな病理組織学的知見を得られる可能性がある。

実験1として、肺増殖性病変の起源に着目し、クララ細胞のマーカーであるClara cell secretory protein (CCSP)とII型肺胞上皮細胞のマーカーであるPulmonary Surfactant Protein C (SP-C)の発現を、NNK誘発マウス肺腫瘍(腺系)、N-nitrosotris-(2-chloroethyl) urea (NTCU)腹腔内投与により誘発された肺扁平上皮異形成、およびDHPN誘発ラット肺腫瘍(腺系)について検討を行った。

実験2では肺の早期腫瘍性病変の同定に有用なマーカーの候補についての検索を目的とした。NNKはマウスには腫瘍を誘発する代表的物質である。しかし、F344雄ラットに投与した時には、早期に過形成を誘発するが、その後、徐々に病変は消失してしまう。一方、DHPNにより誘発された過形成は経時的に腺腫、腺癌へ進展する。DHPN投与により肺に生じた代表的な腫瘍性病変について、複数の抗体を検討し、候補となるマーカーの検索を行った。

検討した複数の抗体はCyclin D1、Napsin A、p27、Thyroid transcription factor 1 (TTF-1)、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 β E12、CK 5/6、surfactant proteins-A (SP-A)、p53、Endothelial growth factor receptor (EGF-R)、estrogen receptor α (ER α)、progesterone receptor (PR)、carcinoembryonic antigen1 (CEA)、p16、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、chromogranin A および synaptophysin の19種類である。

実験3では実験2の結果から候補として絞ったマーカーについて、NNK誘発過形成(将来消失する過形成)、およびDHPN誘発過形成(将来腫瘍化する過形成)に対して比較検討を行った。特に、将来消失する過形成病変と腫瘍化する過形成病変で染色性に相違が認められるかという点に着目した。なお、実験2から絞られた候補マーカーは、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1 およびER α の5種類である。

実験4は、ラット肺の炎症性変化におけるNapsin Aの発現を確認するための実験を行った。各種微粒子2mgを気管内投与後、28日目のラット肺を用いて、Napsin Aの発現を検討した。炎症を誘発する微粒子としては、quartz、NiO およびCuOの3種類を用いた。

さらに実験5として、Napsin Aは肺サーファクタンとBの成熟に関与していることから、その発現機序解明を目的として、サーファクタンプロテイン(SP)-A、B、C、Dについて染色を行い、napsin Aの発現と比較検討を行った。用いた材料はDHPN誘発F344雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)及びquartz誘発F344雄ラット肺(炎症性変化、28日目)の固定標本である。

B. 研究方法

(実験1) NNK 誘発 A/J 雌マウス肺腫瘍(腺系腫瘍、16週)およびN-nitroso-tris-chloroethylurea (NTCU) 誘発 A/J 雌マウス肺扁平上皮異形成(20週)、DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)の固定標本を用い、SP-C(sc-1379, Santa Cruz, CA, USA, 1:50) および Clara cell secretory protein (CCSP, CC10) (sc-9773, Santa Cruz, CA, USA, 1:2000) について二重免疫染色を行い評価した。

(実験2) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)の固定標本を用い、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 β E12、CK 5/6、SP-A、p53、EGF-R、ER α 、PR、CEA、p16、PCNA、chromogranin A および synaptophysin について免疫染色を行い評価した。用いた抗体の情報および希釈倍率等に関しては表1に示す。

(実験3) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍(過形成、腺系腫瘍、12週および30週)およびNNK 誘発 F344 雄ラット肺過形成病変(12週および30週、NNK 単独群30週では病巣がほぼ見られないので、NNK 投与後に2mg quartz 微粒子/0.2ml 生理的食塩水の懸濁液を気管内投与した NNK+quartz 群について検討した)の固定標本を用い、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1 および ER α について免疫染色を行い評価した。

(実験4) 微粒子の気管内投与後28日後のF344 雄ラット肺の固定標本を用い、Napsin A について免疫染色を行い評価した。微粒子は quartz、NiO および CuO の3種類であり、いずれも2mg/0.2ml 生食の用量で被験微粒子を気管内投与した。

(実験5) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)及び quartz 誘発 F344 雄ラット肺(炎症性変化、28日目)の固定標本を用いて、SP-A、B、C、D についてそれぞれ免疫染色を行った。用いた抗体の情報は表2に示す。

(倫理面への配慮)

いずれの実験も動物実験に先立ち、香川大学、総合生命科学研究センター、動物実験部門の動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

C. 研究結果

(実験1) NNK 誘発 A/J 雌マウス肺および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺ではいずれも肺胞上皮過形成病変、腺腫、腺癌が見られた。DHPN 誘発 F344 雄ラット肺では腺癌の結節の一部に扁平上皮化生が見られた。マウスおよびラットともに、肺胞上皮過形成性病変、腺腫、腺癌のいずれも SP-C に強く陽性を示した(図1、図3)。肺胞上皮過形成性病変および腺系腫瘍部に CCSP の発現は見られなかった。

一方、NTCU 誘発 A/J 雌マウス扁平上皮異形成(図2) および、DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腺癌中の扁平上皮化生成分(図3)ではいずれも CCSP に陽性を示していた。

(実験2) DHPN 誘発の肺過形成病変および腺腫に関して、良好に染色された抗体は、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER α 、CK 34 β E12 および CK 5/6 の7種類であった(図4)。このうち、CK 34 β E12 および CK 5/6 に関しては扁平上皮化生を示す部分に陽性像を示していた。しかし、これらは、過形成病変の鑑別には適さないと判断した。以上より、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1 および ER α が、さらに詳細な検討を行うべきマーカーの候補として挙げられた。

(実験3) NNK および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺病変に対して、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER α のいずれも病変部が良好に染色された(図5)。

一方で、DHPN 誘発過形成病変と NNK 誘発過形成病変を比較すると、その発現に差が見られたのは Napsin A および TTF-1 であった。いずれも、DHPN 誘発過形成病変においては、肺胞壁を構成する細胞に強く発現を示したが、NNK 誘発過形成性病変では肺胞壁の細胞の発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内の成分では発現が見られた。また、Napsin A は TTF-1 と比べて染色性が良好であった。以上から、Napsin A のラットの肺胞壁内細胞への高発現は malignant potential を示唆すると考えられた。

実験3におけるその他の所見は以下の通りである。Napsin A は腫瘍において、悪性度が高いと発現が低下していた。一方で、ER α は悪性度が上昇すると発現が上昇する傾向が見られた。TTF-1 は悪性度の違いによる発現の変化は見られなかった。

(実験4) 炎症により発生する過形成病変は、発癌物質によって誘発される過形成と比べて腫瘍化する可能性は低いと推測される。この炎症性過形成について、Napsin A の肺胞壁内細胞への発現が乏しいのか検討を行った。Quartz、NiO および CuO を F344 雄ラットに気管内投与すると、28日目には肺に炎症性過形成病変が認められる。Napsin A はこれらの部に実験3での NNK 誘発過形成性病変とほぼ同様の染色性を示した(図6)。すなわち、肺胞壁内細胞への発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内成分への高発現が認められた。

(実験5) SP-A、B、C、D の染色病理組織像とそのまとめをそれぞれ図7および表3に示す。SP-A と D は比較的類似した染色性を示した。炎症における肺胞内粘液に強く発現を認めた(SP-A、D は肺胞免疫に関与している)。肺増殖性病変においては、最も SP-C の発現が強く認められた。臨床上、SP-A はヒトでの肺癌血清マーカーとして利用されているが、今回のラットにおける増殖性病変での発現は低かった。Napsin A の発現パターンは SP-B と若干の類似性を示したが、SP-A、C、D のいずれとも完全な一致は見られなかった。

(考察)

マウスおよびラットにおいて、発癌物質により誘発される肺腫瘍はほとんどが肺胞上皮の過形成を経た腺系腫瘍である。実験1によって、この起源がII型肺胞上皮であることが示唆された。今回、動物における肺扁平上皮癌の材料の入手が困難であったために扁平上皮癌についての検討は行うことが出来なかった。しかし、今回、NTCU誘発の扁平上皮異形成はクララ細胞起源であることが示唆された。NTCUによる肺扁平上皮癌の発生はすでに報告されており、この異形成病変は扁平上皮癌の早期病変と考えられる。

以上より、SP-CはII型肺胞上皮由来の腺系腫瘍、CCSPはクララ細胞由来の扁平上皮系腫瘍のマーカーである可能性が示唆された。さらに、肺における過形成病変および腺腫、腺癌の本態もII型肺胞上皮の増殖であることが明らかになった。

実験2, 3の結果、Napsin AはII型肺胞上皮で発現し、染色性も最も良好であった。線維化や炎症細胞浸潤による肺胞壁の増大はII型肺胞上皮の増殖に起因しない変化と考えられる。今回、増殖性変化を示唆するマーカー(細胞増殖、細胞周期)の検討も行ったが、炎症性過形成病変およびDHPNによる腫瘍性の過形成病変のいずれにも類似した発現を示し、過形成病変の鑑別には有効性が乏しいと考えられた。

実験4では、炎症に起因する過形成病変について、NNK誘発過形成病変と同様の染色性を示すことを確認した。NNKはマウスでは肺発がん物質として知られている。F344雄ラットでは、NNKにより発生した過形成病変が経時的に消失するとはいえ、潜在的に腫瘍化する可能性がないのかという点について否定出来ない。実験4の結果で、NNK誘発過形成病変と炎症性過形成が類似した染色性を示したことは、今回認められた過形成病変が可逆性であり、潜在腫瘍化能については乏しいという可能性を示唆する。

Napsin AはペプチダーゼA1ファミリーに属するペプシン様アスパラギン酸プロテアーゼで、肺サーファクタントBの成熟に関与していることから実験5を行った。肺サーファクタント(SP)は肺胞II型細胞で合成され、肺胞腔に分泌されて肺胞の全表面を覆う脂質-蛋白質複合体(リポ蛋白質)であり、表面張力を維持することにより肺虚脱を防ぐ作用や、気道から進入してくる病原体に対する自然免疫防御作用を有している。SPは、SP-A, B, C, Dが知られており、SP-BとSP-Cは疎水性が強く、SP-AとSP-Dは親水性である。SP-AとSP-Dは構造上、非常に相同性が高く、SP-AやSP-Dが肺胞免疫に関与しているとされる。今回の検討では、Napsin AとSPには類似した染色性を示すものの、完全に一致するSP subtypeは見られなかった。

今回の実験結果からの過形成病変の捉え方と鑑別を図8にまとめた。正常肺胞上皮細胞は発癌物質や炎症性化合物の影響により、いわゆる肺胞上皮過形成を生じる。この肺胞上皮過形成には、可逆性のものと非可逆性のものがあると推測される。可逆性の過形成は炎症に伴う、「炎症性可逆性過形成」といえる。非可逆性の過形成は将来、腺腫、腺癌と腫瘍化していく可能性が高い、「潜在腫瘍性過形成」といえる。これらの鑑別にNapsin Aは有効であり、肺胞上皮を構成する細胞の陽性率が高い場合は潜在腫瘍性過形成である可能性が高いと言える。

以上、Napsin Aは動物肺発がんモデルなどで早期に発生する過形成病変が将来腫瘍化する可能性を判別するマーカーとして有用であることが明らかとなった。肺に過形成病変が出現した際に、その将来的な影響を確認するためにも肺胞壁内細胞のNapsin Aの高発現を確認することは重要である。また、化学物質等の肺へのがん原性等をスクリーニング評価する際に、肺胞壁内細胞のNapsin A高発現を示す過形成病変を指標とすることも有用と考えられる。今後は、DHPNのみでなく、多種の発癌物質による誘発過形成病変に対して、napsin Aの有効性について検証予定である。

(結論)

ラット及びマウスに誘発される腺系腫瘍については、SP-C陽性のII型肺胞上皮由来、マウスの扁平上皮異型細胞はCCSP陽性のクララ細胞由来であることが明らかとなった。Napsin Aは、肺に発生する過形成病変の、将来腫瘍化する可能性についての判別に有用であることが判明した。また、Napsin Aの発現は肺サーファクタントとプロテイン-Bの発現に若干相同性を示した。

E. 研究発表

1. 論文発表

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K., Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66: 117-123, 2014.