

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と、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。