

- 総会, 横浜 (2014 年 9 月)
10. 石井真美、梯アンナ、桑江優子、大澤政彦、魏 民、鰐淵英機、ヒト NASH 肝細胞癌におけるプロテオーム解析を用いた分枝メカニズムの検討. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2014 年 9 月)
 11. 藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、下村衣里、三島胡桃、房 赫、鰐淵英機、gpt delta ラットを用いた 2-AAF の肝発がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2014 年 9 月)
 12. 梯アンナ、石井真美、桑江優子、房赫、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、ヒト肝細胞癌における新治療ターゲットの検索: CNPY2 及び CACHD1. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2014 年 9 月)
 13. Yamano S, Wei M, Fujioka M, Wanibuchi H, Cancer initiating cekk of lung squamous cell carcinoma in mice might be cerived from the bronchiolar alveolar stem cell. 39th EAMO Congress, Madrid, Spain (2014. Sep)
 14. 鰐淵英機、魏 民、ヒ素の発がん機序の解明. 第 60 回日本病理学会秋期特別総会, 浦添 (2014 年 11 月)
 15. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、鰐淵英機、ハムスター BOP 二段階膵胆管発がんモデル を 用 い た 1,2-dichloropropane (1,2-DCP) の発がん修飾作用の検討. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 東京 (2015 年 1 月)
 16. Anna Kakehashi, Naomi Ishii, Min Gi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi, CNPY2 and CACHD1 as novel molecular markers of hepatocellular carcinoma. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 東京 (2015 年 1 月)
 17. 藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、下村衣里、三島胡桃、鰐淵英機、非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がんメカニズムの検討. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 東京 (2015 年 1 月)
 18. 三島胡桃、山野荘太郎、魏 民、鰐淵英機、ラット同所同種移植による新規腎癌肺転移モデルの確立及び評価. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 東京 (2015 年 1 月)
 19. 山野荘太郎、三島胡桃、山田健二、平山幸良、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用. 平成 26 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 (2015 年 2 月)
 20. 平山幸良、山野荘太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、三島胡桃、鰐淵英機、肝微小環境が及ぼす転移性腎癌への影響. 平成 26 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークシ

ヨップ, 大津 (2015 年 2 月)

21. 三島胡桃、山野莊太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎細胞癌肺転移新規モデルの構築及び評価. 第 14 回分子予防環境医学研究会, 大阪 (2015 年 2 月)
22. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、鰐淵英機、1, 2-DCP 投与によるハムスターおよびマウスの肝毒性メカニズムの検討. 第 14 回分子予防環境医学研究会, 大阪 (2015 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 最終体重および臓器重量

	最終体重 (g)	絶対重量(g)			相対重量(%)		
		肝臓	腎臓	脾臓	肝臓	腎臓	脾臓
0ppm 1,4-dioxane	340.88	8.682	2.069	0.704	2.546%	0.607%	0.207%
0.2ppm 1,4-dioxane	338.04	8.471	2.039	0.706	2.507%	0.605%	0.209%
2.0ppm 1,4-dioxane	341.66	8.847	2.126	0.715	2.583%	0.623%	0.210%
20ppm 1,4-dioxane	351.58	9.086	2.114	0.725	2.579%	0.602%	0.206%

Table. 2 GST-P 陽性細胞巢の解析

Group	2 cell \leq Mean \pm SD
0 ppm 1,4-dioxane	0.69 \pm 0.51
0.2 ppm 1,4-dioxane	0.48 \pm 0.33
2.0 ppm 1,4-dioxane	0.22 \pm 0.35
20 ppm 1,4-dioxane	0.51 \pm 0.21

Table. 3 点突然変異体頻度の解析 (*gpt* assay)

Groups	Animal No.	Cm ^R colonies	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm SD
0 ppm 1,4-dioxane	111	1208000	9	7.5	8.0 \pm 3.2
	112	457000	3	6.6	
	113	622000	4	6.4	
	121	730000	10	13.7	
	122	991000	6	6.1	
0.2 ppm 1,4-dioxane	211	269000	6	22.3	11.4 \pm 8.1
	212	461000	8	17.4	
	213	767000	4	5.2	
	221	891000	3	3.4	
	222	566000	5	8.8	
2.0 ppm 1,4-dioxane	311	412000	3	7.3	7.5 \pm 3.2
	312	683000	8	11.7	
	313	882000	4	4.5	
	321	473000	2	4.2	
	322	830000	8	9.6	
20 ppm 1,4-dioxane	411	443000	5	11.3	9.8 \pm 7.5
	412	876000	9	10.3	
	413	189000	4	21.2	
	421	955000	4	4.2	
	422	1056000	2	1.9	

Table. 4 *gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析

Type of mutation		0 ppm dioxane	0.2 ppm dioxane	2.0 ppm dioxane	20 ppm dioxane
Transition	G:C to A:T	7 (33.3%) ^a 1.7 ± 1.2 ^b	6 (37.5%) 2.2 ± 2.5	9 (45.0%) 3.0 ± 1.4	8 (44.4%) 3.3 ± 2.7
	A:T to G:C	1 (4.8%) 0.2 ± 0.5	3 (18.8%) 1.7 ± 2.2	3 (15.0%) 1.0 ± 0.9	0 (0%) 0 ± 0
Transversion	G:C to T:A	2 (9.5%) 0.5 ± 0.7	2 (12.5%) 0.6 ± 0.9	2 (10.0%) 0.5 ± 0.7	4 (22.2%) 1.2 ± 1.1
	G:C to C:G	1 (4.8%) 0.3 ± 0.7	1 (6.3%) 0.2 ± 0.5	3 (15.0%) 0.8 ± 0.7	2 (11.1%) 0.4 ± 0.6
	A:T to T:A	1 (4.8%) 0.2 ± 0.7	0 (0%) 0 ± 0	1 (5.0%) 0.3 ± 0.7	0 (0%) 0 ± 0
	A:T to C:G	4 (19.0%) 1.1 ± 1.0	1 (6.3%) 0.2 ± 0.5	1 (5.0%) 0.2 ± 0.5	1 (5.6%) 0.2 ± 0.4
Deletion	single bp	4 (19.0%) 0.9 ± 0.9	3 (18.8%) 1.0 ± 1.3	1 (5.0%) 0.2 ± 0.5	2 (11.1%) 0.4 ± 0.6
	Over 2bp	0 (0%) 0 ± 0	0 (0%) 0 ± 0	0 (0%) 0 ± 0	0 (0%) 0 ± 0
Insertion		1 (4.8%) 0.3 ± 0.7	0 (0%) 0 ± 0	0 (0%) 0 ± 0	1 (5.6%) 0.2 ± 0.4
	Total	21 (100%) 5.2 ± 1.1	16 (100%) 5.2 ± 2.1	20 (100%) 5.8 ± 1.1	18 (100%) 5.4 ± 0.8

^aNumber of mutations (%)^bMutation frequency ($\times 10^{-6}$)

Table. 5 欠失変異体頻度の解析 (Spi⁻ assay)

Groups	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA	Plaques within XL-1 Blue MRA (P2)	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm SD
0 ppm 1,4-dioxane	111	1455000	4	2.7	4.4 \pm 3.4
	112	912000	7	7.7	
	113	1680000	4	2.4	
	121	1239000	1	0.8	
	122	724000	6	8.3	
0.2 ppm 1,4-dioxane	211	1004000	5	5.0	4.6 \pm 1.9
	212	998000	6	6.0	
	213	1099000	5	4.5	
	221	1379000	2	1.5	
	222	819000	5	6.1	
2.0 ppm 1,4-dioxane	311	600000	2	3.3	4.9 \pm 2.1
	312	1464000	4	2.7	
	313	835000	5	6.0	
	321	626000	5	8.0	
	322	640000	3	4.7	
20 ppm 1,4-dioxane	411	778000	5	6.4	4.4 \pm 1.7
	412	1296000	5	3.9	
	413	501000	3	6.0	
	421	1412000	4	2.8	
	422	1599000	5	3.1	

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的、かつ包 *gpt delta* ラットを用いた多臓器発がん性試験法の変異原性評価における有用性を検討することである。昨年度は、医薬品・化粧品などの抽出・精製・反应用溶剤として用いられる合成有機化合物であり、また水道水中に微量存在する 1,4-ジオキサンの 5000 ppm 投与群において *in vivo* 変異原性が陽性であることを明らかにした。これまでに、Ames 試験などの *in vitro* 変異原性試験で陰性で、*in vivo* 変異原性試験で陽性を示す物質は殆ど報告されていないため、得られた結果について精査する必要がある。本年度は、1,4-ジオキサンの遺伝毒性について再確認することを目的として 0 および 5000 ppm 投与群間の *gpt* アッセイによる *in vivo* 変異原性の解析を再実施した。その結果、前年度の解析と同様に変異体頻度の有意な増加および変異スペクトラムのパターンが認められ、1,4-ジオキサンの変異原性を再確認することができた。本研究で得られた成果は 1,4-ジオキサンのリスク評価に寄与するものである。

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・反应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、*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。したがって、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。昨年度実施した *gpt delta* F344 ラットを用いた *in vivo* 変異原性解析の結果、点突然変異を検出する *gpt* assay において、対照群と比較して 1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で有意な変異体頻度の増加および変異スペクトラムの変動が認められた。これまでに、Ames 試験などの *in vitro* 変異原性試験で陰性で、かつ *in vivo* 変異原性試験で陽性を示す物質は殆ど報告されていないため、得られた結果についてよく精査する必要がある。本年度はその再確認を目的として以降の試験を実施した。

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

[変異体頻度の解析 (*gpt* assay)]

昨年度飼育を実施し、1,4-ジオキサンの16週間飲水投与試験で得られた *gpt delta* F344 ラット肝臓より、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 genomic DNA を用いて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、さらに37°C、20分間振とうにて回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させた。ファージ感染後の 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 インキュベーターにて 72 時間培養を行い、*gpt* 遺伝子の不活化による変異体コロニーを得た。さらに、得られた変異体について 6-TG を含む M9 寒天培地および 6-TG を含む M9 寒天培地それぞれにスクレーピングを実施し、72 時間の培養後、6-TG を含む M9 寒天培地でコロニー形成がみられたものを *gpt* 変異体として以降の試験で取り扱った。また、感染ファージ由来のプラスミドによる総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。突然変異体頻度の算出については、得られた変異体数を総形質転換コロニー数で除することで算出した。

gpt 遺伝子変異体の変異スペクトラを評価するため、得られた変異体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' -TACCACTTTATCCCGGTCAGG-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 Tm 値 58°C、36 サイクルにて増幅した。PCR 反応には KOD plus neo (TOYOBO) を用いた。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' -CTATTGTAACCCGCTGAAG-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]

統計学的解析は Statlight program (Yukms Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、F 検定を用いて等分散性を評価した。2 群検定において、等分散性であった場合は Student's T 検定を、分散にばらつきがみられた場合は Welch's T 検定を用いて評価を行った。また、全ての平均値は Mean ± SD として表し、P < 0.05 以下のものを統計学的に有意であるとみなした。

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

点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイの結果を Table.1 に示す。変異体頻度が無処置群では $5.13 \pm 1.83 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm 投与群では $23.59 \pm 12.63 (\times 10^{-6})$ であった。変異体頻度は、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 2 に示す。各変異頻度について、Transition 変化である G:C to A:T 変化は無処置群では $1.02 \pm 1.69 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm 投与群では $1.61 \pm 2.18 (\times 10^{-6})$ 、A:T to G:C 変化は無処置群では $0.41 \pm 1.08 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm 投与群では $6.88 \pm 5.05 (\times 10^{-6})$ であった。また、Transversion 変化である G:C to T:A 変化は無処置群では $0.64 \pm 1.26 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm 投与群では $1.12 \pm 2.80 (\times 10^{-6})$ 、G:C to C:G 変化は無処置群では $0.50 \pm 1.38 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm 投与群では $1.95 \pm 3.21 (\times 10^{-6})$ 、A:T to T:A 変化は無処置群では $1.02 \pm 1.55 (\times 10^{-6})$ 、5000 ppm 投与群では $2.20 \pm 2.63 (\times 10^{-6})$ 、A:T to C:G 変化は無処置群では $0.70 \pm 1.55 (\times$

10⁶)、5000 ppm 投与群では 0.96 ± 2.31 (×10⁶) であった。deletion において、1bp 欠失変化は無処置群では 0.14 ± 0.47 (×10⁶)、5000 ppm 投与群では 0.61 ± 1.48 (×10⁶)、2bp 以上の欠失変化は無処置群では 0、5000 ppm 投与群では 0.13 ± 0.55 (×10⁶) であった。Insertion 変化において 1bp 挿入変異は無処置群では 0.33 ± 1.14 (×10⁶)、5000 ppm 投与群では 0.16 ± 0.66 (×10⁶)、2bp 以上の挿入変異は無処置群では 0、5000 ppm 投与群では 0 であった。*gpt* 遺伝子の変異頻度は A:T to G:C 変化において、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。さらに、モノクローナル変異を除いた変異頻度は無処置群と比較して 5000 ppm 投与群で有意な増加が確認された。

D. 考察

昨年度までに我々は 1,4-ジオキサンがラット肝臓において、5000 ppm 投与群において *in vivo* 変異原性を示すことを明らかにしている。Ames 試験などのような *in vitro* の変異原性試験は偽陽性・偽陰性になるものも多く、特異性が低いことがよく知られている。しかし、今回の 1,4-ジオキサンのような、*in vitro* 変異原性試験で陰性でかつ *in vivo* 変異原性試験で陽性を示す物質は殆ど報告されていないため、本年度ではその再現性の確保を目的として再度 1,4-ジオキサンのラット肝臓における *in vivo* 変異原性について点突然変異を検出する *gpt* アッセイを実施し、その変異頻度および変異スペクトラムについて解析を実施した。その結果、1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で変異原性を有することが再確認できた。また、その変異スペクトラについても 5000 ppm 投与群有意な増加を示す変異スペクトラ (A:T to G:C 塩基置換) が存在することがあらためて確認できた。また、1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で得られた変異体にモノクローナルな遺伝子変化がみられたことから、昨年度報告における 1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で GST-P 陽性細胞巢の増加がみられたことと相関する結果が得られた。したがって、1,4-ジオキサンが 5000 ppm ではじめて *in vivo* 変異原性を示すこと、さらに 5000

ppm でモノクローナルな細胞増殖が生じることが確認できた。

E. 結論

本研究によって 1,4-ジオキサンが 5000 ppm で *in vivo* 変異原性を示すこと、さらにモノクローナルな細胞増殖がみられることがこれまでの報告と同様であることが再確認することができた。しかし、その変異原性を示す濃度が 5000 ppm と非常に高濃度であるため、1,4-ジオキサン単独による影響よりも、DNA 付加体形成や酸化ストレスの増加や 1,4-ジオキサンの生体内代謝物の影響などが考えられ、今後 1,4-ジオキサンの代謝メカニズムや DNA 付加体形成能などについて検討する必要がある。本研究で得られた成果は 1,4-ジオキサンのリスク評価に寄与するものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada T, Wei M, Toyoda T, Yamano S, Wanibuchi H. Inhibitory effect of raphanobrassica on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. Food Chem Toxicol, 70, 107-113, 2014.
2. Tago Y, Fujii T, Wada J, Kato M, Wei M, Wanibuchi H, Kitano M. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing Phaffia rhodozyma extract. J Toxicol Sci, 39, 373-382, 2014.
3. Kakehashi A, Kato A, Ishii N, Wei M, Morimura K, Fukushima S, Wanibuchi H. Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA (A) receptor-mediated signaling. PLoS One, 9, e113610, 2014.
4. Kuwae Y, Kakehashi A, Wakasa K, Wei M, Yamano S, Ishii N, Ohsawa M, Wanibuchi H. Paraneoplastic Ma Antigen-Like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in

- Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 44, 106-115, 2015.
5. Wei M, Xie Xiao-Li, Yamano S, Kakehashi A, Wanibuchi H. Isoleucine, leucine and their role in experimental models of bladder carcinogenesis. *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition*, Vol 1, 253-260, 2015.
 6. Gi M, Fujioka M, Yamano S, Shimomura E, Ishii N, Kakehashi A, Takeshita M, Wanibuchi H. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. *Toxicol Sci*, 2015 (in press).
2. 学会発表
1. 山野荘太郎、魏 民、藤岡正喜、鰐淵英機、マウス肺扁平上皮癌において気管支肺胞幹細胞がオリジンである可能性. 第103回日本病理学会総会, 4月24~26日, 広島, 2014.
 2. 梯アンナ、桑江優子、石井真美、魏 民、鰐淵英機、ヒト肝細胞癌におけるLC-MS/MS及び*in vitro*機能解析を用いた新規特異的候補分子ターゲットの検討. 第103回日本病理学会総会, 4月24~26日, 広島, 2014.
 3. 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103回日本病理学会総会, 4月24~26日, 広島, 2014.
 4. 福島昭治、魏 民、梯アンナ、鰐淵英機、化学発がん物質のリスク評価における閾値問題. 第41回日本毒理学学会学術年会, 7月2~4日, 神戸, 2014.
 5. 石井真美、梯アンナ、魏 民、佐谷秀行、鰐淵英機、ヒト肝細胞癌組織における癌幹細胞マーカーとしてのCD44v9の検討. 第11回日本病理学会カンファレンス, 8月1~2日, 神戸, 2014.
 6. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、三島胡桃、鰐淵英機、ハムスター-BOP二段階胆膵管発がんモデルを用いた1,2-dichloropropaneの発がん修飾作用の検討. 第29回発癌病理研究会, 9月1~3日, いわき, 2014.
 7. 三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏 民、下村衣里、鰐淵英機、EHEN誘発ラット腎発がんにおける発がん機序の解明PI3K/Akt/mTOR signaling pathway及びNADPH oxidaseの役割. 第29回発癌病理研究会, 9月1~3日, いわき, 2014.
 8. 山野荘太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用. 平成26年度がん若手研究者ワークショップ, 9月3~6日, 茅野, 2014.
 9. 魏 民、下村衣里、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、武下正憲、房 赫、鰐淵英機、ハムスター化学発がんモデルを用いた1,2-dichloropropaneの発がん修飾作用の検討. 第73回日本癌学会学術総会, 9月25~27日, 横浜, 2014.
 10. 石井真美、梯アンナ、桑江優子、大澤政彦、魏 民、鰐淵英機、ヒトNASH肝細胞癌におけるプロテオーム解析を用いた分枝メカニズムの検討. 第73回日本癌学会学術総会, 9月25~27日, 横浜, 2014.
 11. 藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、下村衣里、三島胡桃、房 赫、鰐淵英機、gpt deltaラットを用いた2-AAFの肝発がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討. 第73回日本癌学会学術総会, 9月25~27日, 横浜, 2014.

12. 梯アンナ、石井真美、桑江優子、房 赫、藤岡正喜、魏 民、鰐渕英機、ヒト肝細胞癌における新治療ターゲットの検索：CNPY2 及び CACHD1. 第 73 回日本癌学会学術総会, 9 月 25~27 日, 横浜, 2014.
13. Yamano S, Wei M, Fujioka M, Wanibuchi H, Cancer initiating cekk of lung squamous cell carcinoma in mice might be cerived from the bronchiolar alveolar stem cell. 39th EAMO Congress, 26-30 September, Madrid, Spain, 2014.
14. 鰐渕英機、魏 民、ヒ素の発がん機序の解明. 第 60 回日本病理学会秋期特別総会, 11 月 20 日, 浦添, 2014.
15. Anna Kakehashi, Naomi Ishii, Min Gi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi, CNPY2 and CACHD1 as novel molecular markers of hepatocellular carcinoma. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 1 月 29~30 日, 東京, 2015.
16. 藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、下村衣里、三島胡桃、鰐渕英機、非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がんメカニズムの検討. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 1 月 29~30 日, 東京, 2015.
17. 三島胡桃、山野荘太郎、魏 民、鰐渕英機、ラット同所同種移植による新規腎癌肺転移モデルの確立及び評価. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 1 月 29~30 日, 東京, 2015.
18. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、鰐渕英機、ハムスターBOP 二段階膵胆管発がんモデルを用いた 1,2-dichloropropane(1,2-DCP) の発がん修飾作用の検討. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 1 月 29~30 日, 東京, 2015.
19. 山野荘太郎、三島胡桃、山田健二、平山幸良、藤岡正喜、魏 民、鰐渕英機、腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用. 平成 26 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ, 2 月 5~6 日, 大津, 2015.
20. 平山幸良、山野荘太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、三島胡桃、鰐渕英機、肝微小環境が及ぼす転移性腎癌への影響. 平成 26 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ, 2 月 5~6 日, 大津, 2015.
21. 三島胡桃、山野荘太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、鰐渕英機、腎細胞癌肺転移新規モデルの構築及び評価. 第 14 回分子予防環境医学研究会, 2 月 13~14 日, 大阪, 2015.
22. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、鰐渕英機、1,2-DCP 投与によるハムスターおよびマウスの肝毒性メカニズムの検討. 第 14 回分子予防環境医学研究会, 2 月 13~14 日, 大阪, 2015

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 1,4-ジオキサン投与ラット肝臓における変異体頻度 (*gpt* assay)

Dose of 1,4-dioxane	Animal No.	Cm ^R colonies	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm SD
0 ppm	111	932500	7	7.51	5.13 \pm 1.83
	112	467500	2	4.28	
	113	1286500	5	3.89	
	114	1901000	5	2.63	
	121	166500	1	6.01	
	122	465000	3	6.45	
5000 ppm	411	1048500	18	17.17	23.59 \pm 12.63 *
	412	1281500	22	17.17	
	413	444500	15	33.75	
	414	1140500	16	14.03	
	421	743500	11	14.79	
	422	358500	16	44.63	

* : $p < 0.05$ (0 ppm vs 5000 ppm)

Table. 2 1,4-ジオキサン投与ラット肝臓における *gpt* 遺伝子の変異スペクトラ解析

Type of mutation		0 ppm 1,4-dioxane		5000 ppm 1,4-dioxane	
Transition	G:C to A:T	6 (27.3%) ^a		12 (16.2%)	
		1.02 ± 1.69 ^b		1.61 ± 2.18	
	A:T to G:C	2 (9.1%)		26 (35.1%)	
		0.41 ± 1.08		6.88 ± 5.05 *	
Transversion					
	G:C to T:A	3 (13.6%)		4 (5.4%)	
		0.64 ± 1.26		1.12 ± 2.80	
	G:C to C:G	2 (9.1%)		6 (8.1%)	
		0.50 ± 1.38		1.95 ± 3.21	
	A:T to T:A	4 (18.2%)		18 (24.3%)	
		1.03 ± 1.26		2.20 ± 2.63	
	A:T to C:G	3 (13.6%)		3 (4.1%)	
		0.70 ± 1.55		0.96 ± 2.31	
Deletion					
	single bp	1 (4.5%)		3 (4.1%)	
		0.14 ± 0.47		0.61 ± 1.48	
	Over 2bp	0 (0%)		1 (1.4%)	
		0		0.13 ± 0.55	
Insertion					
		1 (4.5%)		1 (1.4%)	
		0.33 ± 1.14		0.16 ± 0.66	
	Total	22 (100.0%)		74 (100.0%)	
		4.67 ± 1.27		16.07 ± 4.37 *	

^a Number of mutations (%)

^b Mutation frequency ($\times 10^6$)

* : $p < 0.05$ (0 ppm vs 5000 ppm)

遺伝子のメチル化異常に関する研究

研究分担者 辻内俊文 近畿大学 教授

研究要旨

被検物質における発がん性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安全性評価に応用することを目的とする。肝上皮細胞に肝発がんイニシエーター・プロモーターを短期処理し、リゾフォスファチジン酸（LPA）受容体（LPA1, LPA2, LPA3）遺伝子発現レベルを検索したところ、肝発がんイニシエーター・プロモーターでは異なる LPA 受容体発現が誘導された。細胞運動能は、肝発がんイニシエーターにより促進、肝発がんプロモーターにより抑制された。本研究結果より、肝上皮細胞を用いた細胞培養系が、肝発がんイニシエーター・プロモーター活性検索の実験系となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

がんは複数の遺伝子変異を蓄積しながら質的に異なる多段階のステップを経て発生することが知られている。発がん過程で生じる遺伝子異常は大きく 2 つに大別され、突然変異や欠失など DNA 分子の塩基配列そのものに変異がみられる genetic な異常と、DNA メチル化異常など塩基配列そのものには変化はなく遺伝子発現調節が異常をきたす epigenetic な異常がある。発がん過程における genetic ならびに epigenetic な異常を検出する系は、ヒトがん症例や動物実験で作成した病変を用いた検索に限られ、培養細胞系を用いた短期でかつ簡便な同定法はいまだ開発されていない。

本研究は、肝発がんイニシエーター・プロモーターを肝上皮細胞に処理し、リゾフォスファチジン酸（LPA）受容体遺伝子の発現パターンと細胞運動能を指標

に、被検物質におけるイニシエーション・プロモーション活性、DNA メチル化異常などの毒性を短期的に検出する系を確立し、食品添加物として含まれる種々の化合物の安全性評価に応用することを目的とする。

B. 研究方法

培養細胞は、ラット肝上皮細胞（WB-F344）を用い、10%FBS 含有 DMEM 培地にて 37°C・5%CO₂ の条件下で継代培養した。前処理として、細胞に肝発がんイニシエーターである N-nitrosodiethylamine（DEN）を、また肝発がんプロモーターである phenobarbital（PB）、okadaic acid（OA）、clofibrate を種々の濃度で 24 時間ごとに 2 回処理した。細胞運動能解析には Cell Culture Insert（8.0mm）を用いて、upper chamber には肝発がん物質で前処理した細胞を播き、lower chamber

には 5% charcoal stripped FBS を加え、16 時間培養後に lower chamber に移動した細胞数をギムザ染色を行い計測した。さらに、LPA 遺伝子発現解析には、肝発がん物質で処理した細胞より RNA を抽出した後 cDNA を作製し、real-time RT-PCR 法にて遺伝子発現レベルを検索した。

(倫理面への配慮)

該当せず。

C. 研究結果

(1) DEN の処理により、LPA1 遺伝子発現は低下し、LPA3 遺伝子発現は有意に増加した。細胞運動能は DEN 処理によって有意な上昇がみられた。

(2) PB 処理にて LPA1 遺伝子発現は有意に上昇し、LPA3 遺伝子発現は低下した。PB は細胞運動能を有意に低下させた。

(3) OA ならびに clofibrate 処理によって、LPA1 遺伝子発現は有意に上昇するとともに細胞運動能は低下した。

(4) DEN 処理によって上昇する細胞運動能は LPA3 ノックダウンによって抑制した。また、PB 処理によって低下する細胞運動能は LPA1 ノックダウンにより上昇した。

D. 考察

LPA 受容体を介する LPA シグナル伝達経路は、細胞増殖・形態形成、分化、運動、アポトーシスからの回避など様々な細胞生物学的応答を制御することが知られている。生理活性脂質である LPA をリガンドとする LPA 受容体は、これまでに LPA1~LPA6 が同定されている。これらの受

容体の細胞機能は異なり、また細胞に応じた特異的な作用を呈する。これまでの研究で、肝上皮細胞 (WB-F344) において、LPA1 は細胞運動能を抑制し LPA3 は促進することが判明している。また、がん細胞を用いた研究においても、LPA 受容体を介する細胞内シグナルは、がん細胞の増殖、浸潤・転移、造腫瘍性、血管新生、抗がん剤抵抗性に関与することが報告されている。

本研究では、肝発がんイニシエーター・プロモーター処理による LPA 受容体遺伝子発現レベルへの影響を検討する目的で、肝発がんイニシエーターとして DEN、肝発がんプロモーターとして PB・OA・clofibrate を肝上皮細胞に短期処理した。DEN 処理した肝上皮細胞において LPA3 遺伝子発現が誘導され、PB・OA・clofibrate で処理を行うと LPA1 遺伝子発現が誘導されることから、肝発がんイニシエーション・プロモーション活性の違いによって発現誘導される LPA 受容体遺伝子が異なることが明らかとなった。しかしながら、これら肝発がんイニシエーター・プロモーターの短期処理によって発現誘導されるそれぞれの LPA 受容体の発がん過程における生物学的意義は不明である。一方、LPA1 遺伝子突然変異は、DEN を用いて誘発したラット肝細胞癌において高頻度に検出されることや、神経芽細胞腫を用いた実験系で LPA1 は細胞運動・浸潤能に抑制的に作用するのに対し、変異型 LPA1 は細胞運動・浸潤能を促進することが示されている。したがって、DNA による肝発が

ん過程においてLPA3発現上昇と突然変異を生じたLPA1が重要な役割を演じることが示唆される。

被検物質におけるイニシエーション・プロモーション活性の有無を検索するためには、動物を用いた発がん実験が今まで有用な検出系である。ヒト生体内で生じる発がん過程を傍証する上で、動物実験系は、動物そのものを使用すること、マーカーとなる病変発生までに時間を有すること、標本作製までの過程が煩雑であること、実験経費が高価なこと、など簡便な方法とは言えない。本研究では、肝発がんイニシエーション・プロモーション活性の判別にはおおよそ2日の実験時間で判定することができる。また、遺伝子発現調節機構のひとつに遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化状態が遺伝子発現を調節することから、LPAシグナル伝達経路を指標とする肝上皮細胞を用いた肝発がんイニシエーション・プロモーション活性の検索のみならずDNAメチル化状態のスクリーニングへの応用が可能となるかもしれない。今後は、肝発がん作用判別の特異性を高めるために、肝発がん物質以外の他臓器に対する発がん物質も含めてさらなる検索が必要と考える。

E. 結論

肝発がんイニシエーターはLPA3遺伝子発現を上昇し、肝発がんプロモーターはLPA1遺伝子発現を上昇することから、肝発がんイニシエーション・プロモーション活性の違いは異なるLPA受容体遺伝子

発現誘導が関与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii S, Hirane M, Fukushima K, Tomimatsu A, Fukushima N, Tsujiuchi T. Diverse effects of LPA₄, LPA₅ and LPA₆ on the activation of tumor progression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 461 (2015) 59-64
2. Ishii S, Hirane M, Kato S, Fukushima N, Tsujiuchi T. Opposite effects of GPR120 and GPR40 on cell motile activity induced by ethionine in liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 456 (2015) 135-138.
3. Ishii S, Hirane M, Kitamura Y, Mori S, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Role of GPR120 in cell motile activity induced by 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate in liver epithelial WB-F344 cells. *Mol Cell Biochem.* 400 (2015) 145-151.
4. Morimoto Y, Ishii S, Ishibashi J, Katoh K, Tsujiuchi T, Kagawa N, Fukushima N. Functional lysophosphatidic acid receptors expressed in *Oryzias latipes*. *Gene.* 551 (2014) 189-200.
5. 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 (393) 17-22.
6. Araki M, Kitayoshi M, Dong Y, Hirane M, Ozaki S, Mori S, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Inhibitory effects of lysophosphatidic acid receptor-5 on cellular functions of sarcoma cells. *Growth Factors.* 2014 (32) 117-122.
 7. 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.
 8. Tsujiuchi T, Araki M, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histol Histopathol* 2014 (29) 313-321.
 9. 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 (34) 201-204.
 10. 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.* 79 (2014) 112-118.
 11. 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* 2014 (34) 201-204.
 12. 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.
2. 学会発表
 1. 福嶋伸之、田中亞以子、辻内俊文、岩森正男. 多価不飽和脂肪酸は活性酸素産生と MAP キナーゼ経路活性化を介して卵巣がん細胞死を引き起こす. (第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 日~18 日. 国立京都国際会館(京都府))
 2. 石井章一、森本祐司、石橋潤一、辻内俊文、加川尚、福嶋伸之. メダカ L P A 受容体遺伝子の発現と機能. (第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 日~18 日. 国立京都国際会館(京都府))
 3. 平根未来、董燕、朴木寛弥、辻内俊文. 化学発がん物質により誘発されるラット肝細胞運動能への LPA シグナル伝達

経路の関与. (第73回日本癌学会総会.
2014年9月25日~27日. パシフィコ
横浜. 神奈川県))

4. 福嶋伸之、石井章一、森本祐司、石橋
潤一、辻内俊文、加川尚. メダカリゾ
ホスファチジン酸受容体の発現と機能.
(第37回日本神経科学大会
Neuro2014. 2014年9月11日~13日.
パシフィコ横浜(神奈川県))
5. 石井章一、辻内俊文、加川尚、福嶋伸
之. メダカ LPA 受容体遺伝子の発現と
機能. (生体機能と創薬シンポジウム
2014. 2014年8月28日-29日. 近畿大
学. 大阪)

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レイアウト（参考）

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
Wei M, Xie Xiao-Li, Yamano S, Kakehashi A, Wanibuchi H.	Isoleucine, leucine and their role in experimental models of bladder carcinogenesis.		Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition	Humana Press		2015	253-260

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
Tanaka M, Mun S, Harada A, Ohkawa Y, Inagaki A, Sano S, Takahashi K, Izumi Y, Osada-Oka M, Wanibuchi H, Yamagata M, Yukimura T, Miura K, Shiota M, Iwao H.	Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions.	PLoS One	9	e96785	2014
Yamada T, Wei M, Toyoda T, Yamano S, Wanibuchi H.	Inhibitory effect of raphanobrassica on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils.	Food Chem Toxicol	70	107-113	2014
Tago Y, Fujii T, Wada J, Kato M, Wei M, Wanibuchi H, Kitano M.	Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing Phaffia rhodozyma extract.	J Toxicol Sci	39	373-382	2014
Kakehashi A, Kato A, Ishii N, Wei M, Morimura K, Fukushima S, Wanibuchi H.	Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling.	PLoS One	9	e113610	2014

Tanaka M, Yamaguchi M, Shiota M, Kawamoto Y, Takahashi K, Inagaki A, Osada-Oka M, Harada A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Iwao H, Ohkawa Y.	Establishment of neutralizing rat monoclonal antibodies for fibroblast growth factor-2.	Monoclon Antib Immunodiagn Immunother	33	261-269	2014
Morisaki T, Yashiro M, Kakehashi A, Inagaki A, Kinoshita H, Fukuoka T, Kasashima H, Masuda G, Sakurai K, Kubo N, Muguruma K, Ohira M, Wanibuchi H, Hirakawa K.	Comparative proteomics analysis of gastric cancer stem cells.	PLoS One	9	e110736	2014
Morimoto Y, Ishii S, Ishibashi J, Kato K. Tsujiuchi T, Kagawa N, Fukushima N.	Functional lysophosphatidic acid receptors expressed in Oryzias Latipes.	Gene	551	189-200	2014
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	393	17-22	2014
Araki M, Kitayoshi M, Dong Y, Hirane M, Ozaki S, Mori S, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T.	Inhibitory effects of lysophosphatidic acid receptor-5 on cellular functions of sarcoma cells.	Growth Factors	32	117-122	2014
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	446	585-589	2014
Tsujiuchi T, Araki M, Hirane M, Dong Y, Fukushima N.	Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology.	Histol Histopathol	29	313-321	2014
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	34	149-153	2014