

201426013B

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

食品添加物等における遺伝毒性・  
発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究  
平成24-26年度 総合研究報告書

研究代表者 鰐渕 英機  
平成27（2015）年 5 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究--1

鰐淵 英機

資料1 新規前がん病変マーカーの開発に関する研究-----29

資料2 *gpt delta*ラットを用いた*in vivo*変異原性試験に関する研究-----82

資料3 遺伝子のメチル化異常に関する研究-----108

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----116

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

研究代表者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

**研究要旨**

*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験法の汎用性を高めることを目的とし、これまで困難であった微量組織の変異原性解析を可能にする新たな抽出解析法の開発に成功した。我々が開発した *gpt delta* ラットを用いた発がん性・遺伝毒性の短期包括的評価モデルに本改良 DNA 抽出法を導入することによって、採取の容易な肝臓や腎臓だけでなく、膀胱粘膜および甲状腺のような微小组織の変異原性を評価することが可能となり、さらに我々のモデルの汎用性を高めることができた。また、*gpt delta* ラットを用いた 1,4-ジオキサンの肝臓における変異原性および肝発がん性を検討した結果、1,4-ジオキサンは *in vitro* において変異原性陰性であるが、*in vivo* においては変異原性陽性であることが初めて明らかとなった。さらに、1,4-ジオキサンの肝臓における変異原性および発がん性には実際的な閾値が存在することが示唆された。本モデルは化学物質の低用量域における変異原性および発がん性の評価においても有用であることを示した。膀胱がんの前がん病変マーカーの開発試験では、oncomodulin と matrix metalloproteinase-3 を組み合わせて使用することにより、化学物質の膀胱発がん性を予測できる可能性が強く示唆された。マウス肺扁平上皮がん発がん機序の解析では、発がん過程早期において気管支肺胞幹細胞領域にて、Scal, CD133, CD44, c-kit, c-myc および klf4 等幹細胞マーカーの発現上昇が認められた。さらに、ERK MAPK, PI3K/Akt および TGFbeta signaling pathway の関連遺伝子において発現上昇が認められた。肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発に重要な知見を提供した。エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発試験で、非遺伝毒性肝発がん物質であるダンマル樹脂を投与したラット肝臓で発現低下がみられた遺伝子から、DNA メチル化異常候補遺伝子として 16 遺伝子を選定した。さらに、*de novo* メチル化に関与する DNMT3b およびヒストンの脱アセチル化を誘導する HDAC の発現減少が認められたことから、エピジェネティック修飾機構の異常が示唆された。加えて、肝上皮細胞を用いた細胞培養系が、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ならびに DNA メチル化異常などの毒性・発がんリスクを短期的に検出する細胞培養系となりうる可能性が示された。

研究分担者

魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科  
辻内 俊文 近畿大学理工学部

## A. 研究目的

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 2 年間必要であり、その莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの化学物質に対応することが困難なためである。これまでに、我々は平成 21-23 年度厚生労働科学研究で、食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究において、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットと F344 ラットを用いて、前がん病変を指標とした二段階発がん性試験である包括的短期発がんリスク評価試験法を開発した。検索した被験物質は、肝発がん性を示す 3 物質で変異原性陰性のダンマル樹脂、変異原性陽性の IQ、*in vitro* 変異原性偽陽性であるコウジ酸で、これらは開発した試験法では、いずれも肝発がん促進作用陽性であるが、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性は、それぞれ陰性、陽性、陰性となりこれまでの試験では変異原性偽陽性であるコウジ酸の *in vivo* 変異原性陰性が明らかになりこれが非遺伝毒性であることを初めて明らかにし、この試験法の肝発がん性評価システムとしての有効性を証明した。

本研究では、この試験法がリスク評価システムにおいて有用であることをさら

に検証するため、肝臓、膀胱、甲状腺及び腎臓において発がん性・変異原性を有する食品添加物あるいは食品中化学物質についてできる限り多くの物質について検索し、データを蓄積する。また、短期に発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発を肝以外にも肺、胃、大腸、腎、膀胱などの臓器においてもさらに進めた。

これまでの *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験法では、甲状腺や膀胱粘膜のような微小组織では変異原性解析が困難である。現行の Transpack DNA isolation kit を用いた DNA 抽出法は、甲状腺や膀胱粘膜のような微量試料に対応していないため、変異原性解析に必要な genomic DNA を十分量得ることができない。また、古典的 genomic DNA 抽出法であるフェノール・クロロホルム DNA 抽出法は、十分な収量を得ることが可能であるが、その最終産物にフェノール・クロロホルムの残留が生じやすく、これらの残留がラムダファージへの形質転換効率を大きく下げる要因となっている。本年度は、微量試料における変異原性評価可能な収量を得られ、かつ形質転換を阻害しない安定的 genomic DNA 抽出技術の開発を目的とする。加えて、新たな DNA 抽出法の有用性を確認するため、各種被験物質の微量試料中における *in vivo* 変異原性を評価した。

また、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-ジオキサソリンについて、肝臓における変異原性及び発がん性を *gpt delta* ラットを用いて検討した。

発がん性を検索できる新規早期前がん病変マーカー開発を目的とし、ラット腎臓発がん、マウス肺発がんおよびラット膀胱発がんの新規前がん病変マーカーの同定を行った。

発がんにはメチル化異常が関与する場合も多く、食品中化学物質誘発の発がん性臓器におけるメチル化異常等を検索し、DNA メチル化異常を指標とする発がん性評価を試みる。これまでに、我々は 1 年間慢性毒性試験および 2 年間発がん性試験を実施し、食品添加物であったダンマル樹脂はラット肝発がん性を有することを明らかにしてきた（平成 18-20 年度厚生労働科学研究）。また、*gpt delta* ラットを用いて、ダンマル樹脂が *in vivo* 変異原性陰性であったことから非遺伝毒性肝発がん物質であることを明らかにした（平成 21-23 年度厚生労働科学研究）。これらの結果から、ダンマル樹脂は非遺伝毒性的な発がんメカニズムを介して肝発がん作用を示す可能性が考えられた。本研究でダンマル樹脂投与によるエピジェネティック修飾機構の変化について評価を行った。加えて、ダンマル樹脂誘発ラット肝発がん過程において、酸化ストレスの誘導の有無を検討した。

細胞培養を用いた毒性・発がんリスクを短期間に評価する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、リゾフォスファチジン酸 (LPA) 受容体遺伝子発現と細胞運動能を指標に、被検物質における肝発がんイニシエーション・プロモーション活性ならびに DNA メチル化異常などの毒性・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安全性評価に応用することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 微量試料からの DNA 抽出法の開発

[材料]

新規 DNA 抽出法の開発にあたり、以前に我々がダンマル樹脂の発がん性・遺伝毒性短期包括的評価モデルの有用性評価試験（前年度報告書参照）でサンプリングを行った膀胱および肝凍結試料を用いた。

[genomic DNA の抽出]

肝臓 10 mg に lysis buffer を加え、試料を粉砕した。13500 rpm にて 10 分間遠心を行い、上清を除去し、digestion buffer、RNase および Proteinase K を加え、55°C にて一時間インキュベーションを行った。Wide bore チップで粘性の高い沈殿物を回収して TE buffer で溶解し、以降の試験に供した。

[パッケージング効率の測定]

得られた genomic DNA 10  $\mu$ l を用いて Transpack packaging extract kit で *in vitro* packaging を行い、大腸菌株 (E. coli. C) の菌液に回収したファージを加え、37°C 20 min (静置) の後、回収フ

フェージを大腸菌株に感染させた。感染後の菌液をスプレートにまいて 37°C で 1 日間培養を行い、感染フェージ由来の形質転換プラークを得た。形質転換数をパッケージング効率として評価を行った。

[膀胱粘膜を用いた新規 DNA 抽出法の確認]

膀胱粘膜について肝臓と同様に抽出を行い、パッケージング効率の測定を行った。なおその際、膀胱粘膜を 2 サンプル分バッチ処理して評価に供した。

## 2. *gpt delta* ラット甲状腺におけるコウジ酸の *in vivo* 変異原性の検討

6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットに実験開始より第 5 週まで基礎飼料を与え、第 5 週よりコウジ酸をそれぞれ 0、2% 混餌投与し、第 18 週まで飼育後解剖屠殺した。甲状腺における変異頻度について *gpt* アッセイ法を用いて検討し、併せて *gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析を行った。その際、甲状腺試料からの DNA 抽出には今回新たに開発した微量試料向けの抽出法を用いて試験に供した。

## 3. *gpt delta* ラット膀胱粘膜におけるプロポリスの *in vivo* 変異原性の検討

6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットに基礎飼料、2.5% プロポリス混餌投与群、0.05% BBN 飲水投与群および 5.0% Sodium ascorbate 混餌投与群を設け、それぞれ実験開始から 13 週間投与し、実験

開始後 13 週で膀胱粘膜における *gpt* および Spi<sup>-</sup>アッセイを行った。併せて *gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析を行った。その際、膀胱粘膜からの genomic DNA の抽出には新たに開発した抽出法を用いて genomicDNA を抽出し、2 サンプル分を 1 つにバッチ処理し、試験に供した。

## 4. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法を用いた 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性の検討

[実験 1] 1,4-ジオキサンの高用量域における変異原性及び肝発がん性の検討

*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。突然変異を検出する *gpt* アッセイ及び欠失変異を検出する Spi<sup>-</sup>アッセイを施行し、肝臓における変異原性を検索した。また、肝臓における前がん病変の指標である肝 GST-P 陽性細胞巢の発生を定量解析し、発がん性評価を行った。

[実験 2] 1,4-ジオキサンの低用量域における変異原性及び肝発がん性の検討

*gpt delta* ラットに 1,4-ジオキサンを 0、0.2、2、20 ppm の用量で 16 週間飲水投与し、1,4-ジオキサンの肝臓における変異原性及び発がん性を検討した。

[実験 3] 1,4-ジオキサンの F344 ラットにおける肝発がん性の検討

F344 ラットに 1,4-ジオキサンを 0、2、20、200、2000、5000 ppm の用量で 16 週

間飲水投与し、肝発がん性評価を行った。

## 5. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

[検体]

6週齢A/J雌マウス30匹を用いて、NTCU 0.01 M/75 $\mu$ l acetone/mouse の用量で、週2回、合計4週間マウスの背中に滴下し、実験開始8週後に動物を屠殺した。そのうち、20匹は、フローサイトメトリーに興じた。また、10匹は、肺を摘出し、各動物からホルマリン固定パラフィンブロックを作製した。

[病理組織学的解析]

肺におけるホルマリン固定パラフィン包埋標本から連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色により形態学的解析、CC10及びSPC抗体を用いた気管支肺胞幹細胞(BASC)の形態計測及び、Ki67およびTUNEL染色による細胞増殖能及びアポトーシス能の検討を行った。扁平上皮分化マーカーである、CK5/6, CK14, CK19, podoplanin, p63について検討した。また、BASCにおける細胞増殖能、扁平上皮分化能及びRev1発現を検討するため、BASCマーカーであるSca-1とKi67, p63及びRev1の共発現を二重染色法により確認した。

[フローサイトメトリー]

### ① サンプル調整

まずマウスに対し0.1mlヘパリンを投与し、血液凝固を抑制する前処置を行っ

た。ジエチルエーテル麻酔下で、放血致死させた後、胸腔を開いた後に冷PBS 10mlを用いて右心室から灌流を行い、肺から血漿及び血球成分を可能な限り取り除いた。灌流後、すぐにdispase (50 IU/ml)と1% LMP agarose を各1mlずつ気管から注入し、on iceにて肺を固まらせた。その後、各肺葉を分離し、1mm<sup>3</sup>以下になるように細切を行った後、collagenase/dispase (最終濃度: 2 mg/ml)6 mlの中に入れて37°Cで45分インキュベートを行った。その後、100及び40 $\mu$ mのセルストレーナーを用いて凝集物を除去し、残存する赤血球を溶解した後、細胞数を測定した。

### ② 細胞染色

1x10<sup>6</sup>個/100 $\mu$ lに細胞濃度を調整し、Sca-1-FITC, CD45-PE及びPecam-PEの3種類の抗体を用いてそれぞれ1:100の希釈濃度でon iceで30分インキュベート後、洗浄を行ってからフローサイトメトリーに興じた。また、フローサイトメトリーにかける10分前に7AADの染色を行い、死細胞の除去を行った。

### ③ 細胞分取

フローサイトメトリー(Aria II:BD)を用いてダブリングした細胞及び死細胞を除いた後、Pecam及びCD45が陰性の領域で、さらにSca-1陰性(neg)、Sca-1弱陽性(dim)及びSca-1陽性(pos)の3つの分画から細胞を分取した。各分画からは、20万細胞以上を分取し、プロテオーム解析に興じた。

#### [プロテオーム解析]

フローサイトメトリーで分取した細胞を lysis buffer である T-PER を用いて蛋白を抽出し、以下の工程に興じた。これより得られたサンプルから各 4  $\mu$ g の蛋白質をバッチし、iTRAQ 試薬でラベリング、もしくはラベリングなしで、陽イオン交換カラムによる精製、Sep-pak カラムによる脱塩処理を行った後、QSTAR Elite LC-MS/MS (Applied Biosystems Japan) を用い蛋白の網羅的発現解析を行った。

#### [発現蛋白の検討]

上記により解析を行ったデータに関して、ProteinPilot software 及びバイオマーカー検索やシグナル伝達解析に有用である Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて sca-1 pos の分画に特異的に発現する蛋白を選出した。

#### [mRNA 発現解析]

フローサイトメトリーにて分取した細胞を、RNA 抽出キットである RNeasy Micro キット (Qiagen) を用いて、抽出した。これにより得られたサンプルより、既知肺幹細胞マーカーである Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc 及び klf4 について発現検討を行った。

#### [マイクロアレイ解析]

フローサイトメトリーにて分取した細胞を、RNA 抽出キットである RNeasy Micro キット (Qiagen) を用いて、抽出した。これより得られたサンプルより、

GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて比較検討した。Genespring ソフトウェアより同定された遺伝子の発現量データを取得したのち、IPA ソフトウェアを用いてパスウェイについて検討を行った。

### 6. 膀胱発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発

[実験 1] マイクロアレイを用いた膀胱がんて異常発現する遺伝子の同定

発がん機序が異なると思われる膀胱発がん物質、すなわち、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 誘発ラット膀胱がん、dimethylarsinic acid (DMA) 誘発ラットの膀胱がんに対し Affymetrix GeneChip を用いて遺伝子の mRNA 発現解析を行った。対照群としての同週齢の無処置ラット膀胱粘膜を用いた。

[実験 2] 膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子の同定

実験 1 で同定した膀胱がんて異常発現する遺伝子の中で BBN により誘発された早期増殖性病変においても過剰発現する遺伝子を同定し、膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子とした。実験は、6 週齢雄 F344 ラットに 0.05%BBN を 2、4、8 週投与し、リアルタイム RT-PCR を用いて誘発した膀胱病変における mRNA 発現を検索した。

[実験 3] 他の膀胱発がん物質あるいは膀胱を標的にしない発がん物質を短期投



与した膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子の発現の検討

実験2で同定した12種類候補遺伝子について、7種類の膀胱発がん物質（BBN, DMA, 2-acetylaminofluorene、phenethyl isothiocyanate、benzyl isothiocyanate、sodium *ortho*-phenylphenate、uracil）および3種類の非膀胱発がん物質である（肝発がん物質 diethylnitrosamine、腎発がん物質 N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine および大腸発がん物質 1,2-dimethylhydrazine）をそれぞれ4週投与した F344 ラット膀胱粘膜における mRNA 発現を検索した。

[実験 4] 膀胱発がん促進物質を短期投与した膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子の発現の検討

Oncomodulin (OCM) と matrix metalloproteinase-3 (MMP3) について、膀胱発がん促進物質である Sodium ascorbate (NaAsc) および Propolis をそれぞれ4週投与した F344 ラット膀胱粘膜における mRNA 発現を検索した。

## 7. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

[検体]

5週齢の雄性 F344 ラット 12匹を1週間の馴化飼育後、6匹ずつ2群に分け、それぞれにダンマル樹脂を 0, 2%の濃度で混餌投与を4週間行った。

[酸化ストレスの指標である 8-OHdG の

定量的評価]

凍結肝臓組織より DNA Extractor WB kit (Wako) を用いて、ビーズ破砕した凍結肝約 500mg から genomic DNA を抽出し、Nuclease P1 にて DNA を消化処理後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて 8-OHdG 値および dG 値の測定を行い、8-OHdG 値を dG 値で除して定量的評価に供した。

[遺伝子網羅的発現量解析]

DNA メチル化やヒストン修飾に代表されるエピジェネティックな修飾による遺伝子発現変化を評価するために、マイクロアレイによる遺伝子網羅的発現量解析を行い、得られたデータについて Ingenuity Pathway analysis (IPA) software にて遺伝子パスウェイ解析を行った。さらに、quantitative RT-PCR 法 (qPCR 法) にて標的遺伝子 mRNA レベルを検討した。

## 8. DNA メチル化異常の短期検出系の開発

培養細胞は、肝上皮細胞 (WB-F344) を用い、10%FBS 含有 DMEM 培地で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下にて継代培養した。肝上皮細胞に、発がん物質 (エチオニン、N-nitrosodiethylamine (DEN) phenobarbital (PB)、okadaic acid (OA)、clofibrate)、エストロゲン・合成エストロゲン (17β-estradiol (E<sub>2</sub>)、ethinyl estradiol (EE)、diethylstilbestrol (DES))、内分泌かく

乱物質 (bisphenol A (BPA)、4-nonylphenol (4-NP))、さらに過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を種々の濃度で 24 時間ごとに 2 回前処理を行った。これら被検物質で処理した細胞より RNA を抽出し cDNA を作製したのちに、real-time RT-PCR 法にて LPA 受容体 (LPA1、LPA2、LPA3) 遺伝子発現レベルを計測した。細胞運動能の検索には、Cell Culture Insert (8.0mm pore size) を用い、upper chamber には被検物質で処理した細胞を播き、lower chamber には 5% charcoal stripped FBS を加え、24 時間培養後に lower chamber に移動した細胞をギムザ染色を行って計数した。

## 9. 倫理面への配慮

大阪市立大学の動物飼育施設における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エーテル麻酔下にて実施した。

## C. 研究結果

### 1. 微量試料からの DNA 抽出法の開発

改良 DNA 抽出法で得られた genomic DNA は *in vitro* パッケージング操作を阻害する物質の混入がなく、またその収量は *in vivo* 変異原性解析に必要な量を十分に満たしていた。これを *in vitro* パッケージングし、そのパッケージング効率を計測した結果、変異原解析に必要である総形質転換数 (250,000 の形質転換ファージ) が得られた。

### 2. *gpt delta* ラット甲状腺における

### コウジ酸の *in vivo* 変異原性の検討

甲状腺においてコウジ酸投与による変異頻度の有意な変化は認められなかったことから、コウジ酸は肝臓だけでなく、甲状腺に対して変異原性を有さないことが明らかとなった。

### 3. *gpt delta* ラット膀胱粘膜におけるプロポリスの *in vivo* 変異原性の検討

*gpt* 遺伝子の膀胱粘膜における突然変異頻度は、無処置群と比較して、0.05% BBN 投与群で有意に増加したが、Sodium ascorbate およびプロポリス投与群では有意な差は認められなかった。Spi<sup>-</sup>アッセイにおいては、無処置群と比較して、0.05% BBN 投与群で有意に増加したが、Sodium ascorbate およびプロポリス投与群では有意な差は認められなかった。

### 4. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法を用いた 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性の検討

[実験 1] 1,4-ジオキサンの高用量域における変異原性及び肝発がん性の検討

*gpt delta* ラット肝臓における 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性を検討した結果、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。*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

ヨンの頻度が 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。

[実験 2] 1, 4-ジオキサンの低用量域における変異原性及び肝発がん性の検討

肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢(2 cell 以上)の面積あたりの数が、無処置群と比較して投与群で有意な変化は認められなかった。

点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイの結果、変異体頻度は無処置群と比較して、有意な差はみられなかった。また、*gpt* 遺伝子の各変異スペクトラムにおける変異頻度は無処置群と比較して、有意な差はみられなかった。欠失変異を検出する *Spi*-アッセイにおいても、変異体頻度は、無処置群と比較して、投与群で有意な差は認められなかった。

[実験 3] 1, 4-ジオキサンの F344 ラットにおける肝発がん性の検討した結果、

GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの数が無処置群と比較して 200 ppm 投与群より有意な増加が認められた。また、細胞増殖能の指標である BrdU の標識率が 5000 ppm 投与群で有意な増加がみられた。

## 5. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

肺扁平上皮がんモデルにおけるさらなる発がん機序解明のため、発がん過程早期に認められた気管支肺胞幹細胞 (BASC) における既知肺幹細胞マーカーにおける

遺伝子発現量解析及び遺伝子発現における網羅的解析を行った。サンプリングとして、前年度同様フローサイトメトリーを用いて BASC が豊富に存在することが知られている *Sca-1<sup>pos</sup>CD31<sup>neg</sup>Pecam<sup>neg</sup>* の分画において溶媒対照群及び NTCU 投与群それぞれから分取した。既知遺伝子として、今回は *Sca1*, *CD133*, *CD44*, *c-kit*, *c-myc* 及び *klf4* に着目し、検討した結果、いずれのマーカーにおいても NTCU 投与群において、溶媒対照群と比較し増加を認めた。特に、*c-kit* 及び *c-myc* においては、それぞれ約 40 倍及び 10 倍と顕著に高い値を示した。これらのことから、NTCU 投与により増加した *Sca-1<sup>pos</sup>CD31<sup>neg</sup>Pecam<sup>neg</sup>* 分画での幹細胞マーカーの発現増加が認められた。

マイクロアレイ法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、IPA ソフトウェアを用いて種々の signaling pathway を検討した結果、ERK MAPK, PI3K/Akt 及び TGF beta signaling pathway の関連遺伝子における発現上昇が認められた。

## 6. 膀胱発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発

[実験 1] マイクロアレイ解析の結果、BBN 誘発膀胱がん と DMA 誘発膀胱がん で共通に発現量が 2 倍以上の差を示した遺伝子が 139 種類認められた。これらのうち、過剰発現量上位 10 遺伝子と Ingenuity パスウェイ解析によりがん発生に重要な役割を担っていると思われる 13 遺伝子 (3 遺伝子が共通であった) (合

13 遺伝子 (3 遺伝子が共通であった) (合計 20 遺伝子を膀胱がん早期検出マーカー候補として選抜した。

[実験 2] 実験 1 で選抜した 20 遺伝子の発現量を検討した結果、BBN 投与 2 週から連続して発現量が有意に上昇した 12 種類の遺伝子を同定した。これらの遺伝子を膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子とした。

[実験 3 および 4] 12 種類の遺伝子のうち 2 種類 (OCM、MMP3) の mRNA 発現量は無処置膀胱粘膜に比較して全ての膀胱がん物質において有意に増加した。一方、すべての膀胱がん促進物質では OCM の有意な増加が認められたが、MMP3 の異常発現は認められなかった。さらに、非膀胱がん物質である DEN (肝がん物質)、ENEN (腎がん物質) および DMH (大腸がん物質) をそれぞれ 4 週間投与した膀胱粘膜における OCM と MMP3 の mRNA 発現量を検索したところ、MMP3 の発現量は ENEN および DMH の投与により有意に増加したが、OCM の発現量はいずれの投与群においても有意な変動はみられなかった。

## 7. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

マイクロアレイによる網羅的発現量解析および IPA 解析により、ダンマル樹脂投与によって発現量比 (log 比) が 2 倍以上発現減少のみられたがん関連遺伝子 16 種類を DNA メチル化異常候補遺伝子として選定した。また、qPCR 法による CYP 関連遺伝子の定量的発現量解析を行った結

果、無処置群と比較して *cypla1*, *2b1*, *2e1*, *3a2*, *3a3* で有意な発現上昇がみられた。

また、*de novo* メチル化関連遺伝子である DNMT3b およびヒストン脱アセチル化酵素 HDAC がダンマル樹脂投与群で発現減少がみられたため、DNMT1, *3a*, *3b* および HDAC1, *2*, *3* について qPCR 法にて遺伝子発現量を評価した結果、DNMT1, HDAC1, *2* で減少傾向が、DNMT3b で有意な減少がみられた。IPA パスウェイ解析の結果、異物代謝酵素誘導系、PXR/RXR activation および Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 誘導系が有意に誘導されていることが示唆された。

## 8. DNA メチル化異常の短期検出系の開発

肝上皮細胞に種々の濃度の被検物質を短期処理し LPA 受容体遺伝子発現レベルと細胞運動能を検索し、以下の結果をえた。

- (1) エチオニン処理により LPA3 遺伝子発現が有意に上昇し、細胞運動能の上昇がみられた。
- (2) DEN 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。
- (3) 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。
- (4) OA および *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。
- (5) E<sub>2</sub> および EE 処理細胞では、LPA3 遺伝

動能の上昇が見られた。

(6) DES 処理した細胞では、LPA1 遺伝子発現は有意に上昇し、細胞運動能は低下した。

(7) BPA 処理により LPA1 遺伝子発現が有意に上昇し、4-NP 処理では LPA3 遺伝子発現が有意に上昇した。細胞運動能に対して BPA は抑制的、4-NP は促進的に作用した。

(8) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理細胞では LPA3 遺伝子発現の有意な上昇が見られた。また細胞運動能も上昇した。

#### D. 考察

今回新たに開発した微量試料 DNA 抽出法によってその収量は *gpt* アッセイを行う上で必要な最低量を十分に満たし、またパッケージング反応を阻害する物質の混入もみられず、形質転換フェージの総数は 250,000 程度得られた。*gpt* アッセイ、Spi<sup>-</sup>アッセイに最低限必要な形質転換フェージ数(200,000)を上回る形質転換フェージが得られたため、本抽出法は微量資料における変異原性の評価を行うことが可能であることが確認できた。

今回開発した DNA 抽出法の有用性を評価するため、各種被験物質を用いて甲状腺および膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の解析を行った。コウジ酸投与における甲状腺およびプロポリス投与における膀胱粘膜における *gpt* アッセイおよび Spi<sup>-</sup>アッセイの結果、いずれのアッセイも陰性であった。これらのことより、コウジ酸およびプロポリスは *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなった。

コウジ酸は復帰突然変異試験、染色体異常試験で陽性を示しているものの、*in vivo* 変異原性試験であるマウス小核試験において陰性を示している。本研究は今まで明らかでなかった甲状腺における遺伝毒性をコウジ酸が有していないことを初めて明らかにした。*gpt* 遺伝子の変異スペクトラ解析の結果、無処置群と比較してコウジ酸が甲状腺において有意な遺伝子変化を示さないことが明らかとなった。

プロポリスの遺伝毒性については復帰突然変異試験および染色体異常試験で陽性であることが報告されているものの、マウス小核試験では陰性であることが報告されている。今回の結果はプロポリスが膀胱粘膜において変異原性を有さないことを初めて明らかとし、その発がん促進メカニズムに非遺伝毒性メカニズムが関与していることが示唆された。

*gpt delta* ラットを用いた 1,4-ジオキサンの肝臓における変異原性及び肝発がん性を検討した結果、肝臓における遺伝子変異頻度及び GST-P 陽性細胞巢の発生は 2~20 ppm までは対照群と変化なく、200 ppm 以上で増加傾向を、5000 ppm で有意な増加を示した。これらのことから、1,4-ジオキサンは *in vitro* において変異原性陰性であるが、*in vivo* においては変異原性陽性であることが初めて明らかとなった。また、*gpt delta* ラットにおいて 1,4-ジオキサンの肝発がん性が認められた。さらに、1,4-ジオキサンの変異原性および発がん性には実際的な閾値が存在することが示唆された。

マウス肺扁平上皮がんの早期検出マーカーの実験では、発がん過程早期に気管支肺胞幹細胞 (BASC) の増生が関与することを明らかにしてきたが、本年度では遺伝子発現に着目し、Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc 及び klf4 について検討した。いずれのマーカーにおいても既知肺幹細胞マーカーとして知られており、幹細胞能の亢進を検討するうえで有用なマーカーである。結果より特に顕著に発現上昇を示したマーカーとして、c-kit 及び c-myc が同定された。そのため、肺扁平上皮がんの発がん性の検討に有用である可能性が考えられた。また、マイクロアレイ解析の結果から IPA ソフトウェアを用いて、発現変動を示した遺伝子がどの signaling pathway に属するかを検討した。その結果、ERK MAPK, p38 MAP, PI3K/Akt および TGF beta signaling pathway の関連する遺伝子が多数同定され、多くの遺伝子で発現上昇していた。NTCU 投与群の BASC における細胞増殖能の増加や、幹細胞能の亢進においてこれらの signaling pathway の関与が示唆された。これらのことより、発がん機序に即した分子生物学的に意義を有するマーカー開発を行う可能性を示した。

BBN および DMA 誘発膀胱がんサンプルと、7 種類の膀胱発がん物質、2 種類の膀胱発がん促進物質および 3 種類の非膀胱発がん物質をそれぞれ 4 週投与したラット膀胱粘膜サンプルにおける mRNA 発現を検索した結果、すべての膀胱発がん物質について、OCM と MMP3 両者とも、膀胱が

んサンプルおよび膀胱粘膜サンプルにおいて共通に過剰発現を示した。さらに、OCM だけがすべての膀胱発がん促進物質について膀胱粘膜サンプルでの過剰発現を認めた。加えて、いずれの非膀胱発がん物質でも、膀胱粘膜サンプルにおける OCM の異常発現は認められなかった。以上より、OCM と MMP3 を組み合わせて使用することにより、化学物質の膀胱発がん性を予測できる可能性が強く示唆された。

## E. 結論

ゲノム DNA 抽出・精製法などを改良することにより、膀胱粘膜及び甲状腺などの微小组織における変異原性アッセイ法の開発に成功した。さらに、*gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法と微小组織の変異原性アッセイ法を組み合わせることで、これまで困難であった膀胱粘膜や甲状腺などの微小组織を標的とする化学物質の変異原性を評価することに成功し、*gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法の汎用性を高めることができた。加えて、本試験法は化学物質の低用量域における変異原性及び発がん性の評価に有用であることを示した。

また、Oncomodulin と MMP3 は膀胱がん性の早期検出マーカーとして有用であるから、これらを利用することにより、膀胱発がん物質検出のスクリーニングシステム確立に有用であると考えられた。加えて、肝上皮細胞を用いた細胞培養系が、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ならびに DNA メチル化

異常などの毒性・発がんリスクを短期的に検出する細胞培養系となりうる可能性が示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kato M, Wei M, Yamano S, Kakehashi A, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. DDX39 acts as a suppressor of invasion for bladder cancer. *Cancer Sci*, 103, 1363-1369, 2012.
2. Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Tamano S, Shirai T, Wanibuchi H, Fukushima S. Lack of Hepatocarcinogenicity of Combinations of Low Doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline and Diethylnitrosamine in Rats: Indication for the Existence of a Threshold for Genotoxic Carcinogens. *J Toxicol Pathol*, 25, 209-214, 2012.
3. Xie XL, Wei M, Yunoki T, Kakehashi A, Yamano S, Kato M, Wanibuchi H. Long-term treatment with l-isoleucine or l-leucine in AIN-93G diet has promoting effects on rat bladder carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*, 50, 3934-3940, 2012.
4. Xie XL, Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Okabe K, Tajiri M, Wanibuchi H. Dammar resin, a non-mutagen, inducts oxidative stress and metabolic enzymes in the liver of *gpt* delta transgenic mouse which is different from a mutagen, 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoxaline. *Mutat Res*, 748, 29-35, 2012.
5. Punvittayagul C, Pompimon W, Wanibuchi H, Fukushima S, Wongpoomchai R. Effects of pinocembrin on the initiation and promotion stages of rat hepatocarcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 2257-2261, 2012.
6. Chung K, Nishiyama N, Wanibuchi H, Yamano S, Hanada S, Wei M, Suehiro S, Kakehashi A. AGR2 as a potential biomarker of human lung adenocarcinoma. *Osaka City Med J*, 58, 13-24, 2012.
7. 山野 莊太郎、魏 民、加藤 実、鰐 渕英機. 第2節 膀胱がんモデル動物. *Animal models 疾患モデルの作成と利用：がん*, 560-568, エル・アイ・シー, 2012.
8. 加藤 実、魏 民、鰐 渕英機. 尿路上皮腫瘍の遺伝子異常と予後との関連. *腫瘍病理識別診断アトラス腎盂・尿管・膀胱癌*, 237-244, 文光堂, 2012.

9. 鰐渕英機、山野荘太郎、魏 民. 第5回肺がんモデル. 細胞工学, 31, 1384-1389, 学研メディカル秀潤社, 2012.
10. Kawai K, Li YS, Song MF, Ootsuyama Y, Kakehashi A, Wanibuchi H, Ootsuyama A, Norimura T, Kasai H. Methionine sulfoxide stimulates hepatocarcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse: Possible role of free radical-mediated DNA methylation. *Gene and Environment*, 34, 123-128, 2012.
11. Fukushima S, Wei M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Threshold for genotoxic carcinogens: The central concern in carcinogenic risk assessment. *Gene and Environment*, 34, 153-156, 2012.
12. Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Shibata A, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 suppresses cell migration activity of human sarcoma cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012 (32) 328-334.
13. Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Regulation of cell motile activity through the different induction of LPA receptors by estrogens in liver epithelial WB-F344 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 (428) 105-109.
14. Fukui R, Kato K, Okabe K, Kitayoshi M, Tanabe E, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of drug resistance by lysophosphatidic acid receptor-3 in mouse mammary tumor FM3A cells. *J Toxicol Pathol*. 2012 (25) 225-228.
15. Fukui R, Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Negative regulation of cell motile and invasive activities by lysophosphatidic acid receptor-3 in colon cancer HCT116 cells. *Tumor Biol*. 2012 (33) 1899-1905.
16. Kato K, Yoshikawa K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Opposite roles of LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>3</sub> on cell motile and invasive activities of pancreatic cancer cells. *Tumor Biol*. 2012 (33) 1739-1744.
17. Kitayoshi M, Fukui R, Tanabe E, Kato K, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Different effects on cell proliferation and migration abilities of endothelial cells by LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>3</sub> in mammary tumor FM3A cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012 (32) 209-213.
18. Kitayoshi M, Kato K, Tanabe E,



- Yoshikawa K, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of endothelial cell migration by constitutively active LPA<sub>1</sub>-expressing tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 (422) 339-343.
19. Kato K, Fukui R, Okabe K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Constitutively active lysophosphatidic acid receptor-1 enhances the induction of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 (417) 790-793.
  20. Hayashi M, Okabe K, Kato K, Okumura M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Different function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells. *Cancer Lett*. 2012 (316)91-96.
  21. Hoshi H, Sawada T, Uchida M, Iijima H, Kimura K, Hirakawa K, Wanibuchi H. MUC5AC protects pancreatic cancer cells from TRAIL-induced death pathways. *Int J Oncol*, 42, 887-893, 2013.
  22. Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep*, 3, 1224, 2013.
  23. 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 guman H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*, 42, 1034-1039, 2013.
  24. 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.
  25. 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.
26. 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.
  27. 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.
  28. 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.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 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.
  32. Kakehashi A, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens. *Cancers*, 5, 1332-1354, 2013.
  33. 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.
34. 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.
  35. Okabe K, Hayashi M, Kato K, Okumura M, Fukui R, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-3 increases tumorigenicity and aggressiveness of rat hepatoma RH7777 cells. *Mol. Carcinog*. 2013 (52) 247-254.
  36. Yoshikawa K, Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Okimoto S, Fukushima N, Tsujiuchi T. Involvement of oncogenic K-ras on cell migration stimulated by lysophosphatidic acid receptor-2 in pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res*. 2013 (319) 105-109.
  37. Takada J, Hoshi M, Oebisu N, Ieguchi M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Nakamura H. A Comparative Study of Clinicopathological Features Between Simple Bone Cysts of the Calcaneus and the Long Bone. *Foot Ankle Int*, 35, 374-382, 2014.
  38. 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.
  39. 藤岡正喜、山野荘太郎、魏 民、鰐 渕英機. 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.
  40. 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.
  41. 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.
  42. 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.

43. 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.
44. 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.
45. 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(11):e110736. 2014.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Tsujiuchi T, Araki M, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histol Histopathol* 2014 (29) 313-321.
51. 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.
52. 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