

Table.2 *gpt* mutation spectra in thyroid

		Non-treatment	2.0% Kojic acid
Base substitution			
Transition			
	G:C to A:T	5 (31%)	4 (25%)
	A:T to G:C	1 (6%)	2 (13%)
Transversion			
	G:C to T:A	5 (31%)	6 (38%)
	G:C to C:G	1 (6%)	1 (6%)
	A:T to T:A	2 (13%)	1 (6%)
	A:T to C:G	0 (0%)	0 (0%)
deletion			
	Single bp	1 (6%)	1 (6%)
	Over 2bp	0 (0%)	0 (0%)
Insertion			
		1 (6%)	1 (6%)
Total		16 (100%)	16 (100%)

Table.3 Spi^r mutant frequencies in thyroid

Organ	Groups	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$)	Plaques within XL-1 Blue MRA (P2)	Mutant Frequency ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Thyroid	Non-treatment	611	4.20	2	0.48	0.65 \pm 0.16
		612	3.78	2	0.53	
		613	4.32	3	0.69	
		621	3.83	3	0.78	
		622	3.60	2	0.56	
		623	4.57	4	0.88	
	2.0% Kojic acid	411	3.62	4	1.11	0.61 \pm 0.27
		412	3.87	2	0.52	
		413	3.00	2	0.67	
		421	3.61	1	0.28	
		422	3.39	2	0.59	
		423	3.88	2	0.52	

Table.4 *gpt* mutant frequencies in bladder mucosa

Treatment	Sample No.	Cm ^R colonies (× 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (× 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Non-treatment	111+112	2.23	1	0.45	0.53 ± 0.11
	113+121	2.05	1	0.49	
	122+123	2.15	1	0.47	
	131+132	1.36	1	0.73	
	133+141	4.45	4	0.45	
	142+143	1.76	1	0.57	
0.05% BBN	211+212	2.18	6	2.94	4.01 ± 0.72*
	213+221	5.56	22	3.96	
	222+223	4.67	20	4.28	
	231+232	3.64	18	4.95	
	233+241	3.04	12	3.95	
2.5%Propolis	311+312	2.06	2	0.97	0.58 ± 0.24
	313+321	2.42	1	0.41	
	322+323	2.66	2	0.75	
	331+332	1.98	1	0.51	
	333+341	5.02	2	0.40	
	342+343	2.42	1	0.41	
5.0%Sodium ascorbate	411+412	4.33	2	0.46	0.63 ± 0.35
	413+421	4.25	4	0.94	
	422+423	4.34	6	1.38	
	431+432	4.13	1	0.24	
	433+441	6.77	4	0.59	
	442+443	5.33	1	0.19	

* :Significantly different from control group.

Table.5 Spi⁺ mutant frequencies in bladder mucosa

Treatment	Sample No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$)	Spi ⁺ mutants	Mutant Frequency ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Non-treatment	111+112	0.42	2	0.48	0.49 \pm 0.19
	113+121	0.39	2	0.51	
	122+123	0.33	1	0.30	
	131+132	0.36	3	0.83	
	133+141	0.32	1	0.31	
	142+143	0.21	1	0.48	
0.05% BBN	211+212	0.20	9	4.54	4.23 \pm 0.54*
	213+221	0.16	8	5.03	
	222+223	0.49	19	3.89	
	231+232	0.34	13	3.85	
	233+241	0.29	11	3.84	
2.5%Propolis	311+312	0.28	1	0.36	0.41 \pm 0.10
	313+321	0.48	2	0.42	
	322+323	0.20	1	0.50	
	331+332	0.66	2	0.30	
	333+341	0.59	2	0.34	
	342+343	0.18	1	0.57	
5.0%Sodium ascorbate	411+412	0.22	1	0.45	0.51 \pm 0.24
	413+421	0.21	2	0.97	
	422+423	0.21	1	0.47	
	431+432	0.24	1	0.42	
	433+441	0.42	2	0.47	
	442+443	0.35	1	0.29	

* :Significantly different from control group.

Table.6 Final body weights, liver weights, amount of 1,4-dioxane intake, GST-P analysis

1,4-dioxane (ppm)	No. of rats	Final body weights (g)	liver		Average 1,4-dioxane intake		GST-P positive foci (2 cell <) (number/area)
			Absolute weight (g)	Relative weight (%)	Daily intake (mg/kg b.w.)	Total (mg/kg b.w.)	
0	8	363 ± 16	11.1 ± 0.8	3.1 ± 0.2	0	0	1.26 ± 1.41
200	7	375 ± 16	11.8 ± 0.9	3.1 ± 0.1	18.7	2097.3	1.57 ± 0.94
1000	7	360 ± 11	11.3 ± 0.6	3.1 ± 0.1	92.3	10339.3	2.48 ± 1.51
5000	8	337 ± 19*	11.0 ± 0.7	3.3 ± 0.1*	440.2	49302.8	13.00 ± 5.50**

* p<0.01 v.s. 0 ppm group

** p<0.05 v.s. 0 ppm group

Table.7 Mutation frequencies of 1,4-dioxane (*gpt* assay)

Treatment of 1,4-dioxane	Animal no.	Total colonies	Total 6-TG mutants	Mutation frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm SD
0ppm	111	1,068,000	3	2.8	4.3 \pm 2.6
	112	720,000	4	5.6	
	113	900,000	3	3.3	
	114	804,000	2	2.5	
	121	376,000	3	8.0	
	122	486,000	4	8.2	
	123	744,000	1	1.3	
	124	706,000	2	2.8	
200ppm	211	910,000	7	7.7	6.5 \pm 3.1
	212	854,000	2	2.3	
	213	718,000	3	4.2	
	214	450,000	2	4.4	
	221	862,000	7	8.1	
	222	668,000	5	7.5	
	223	518,000	6	11.6	
	311	748,000	8	10.7	
1000ppm	312	700,000	5	7.1	7.9 \pm 2.9
	313	464,000	2	4.3	
	314	902,000	7	7.8	
	321	800,000	5	6.3	
	322	616,000	4	6.5	
	323	462,000	6	13.0	
	411	364,000	4	11.0	
	412	510,000	7	13.7	
5000ppm	413	536,000	10	18.7	13.2 \pm 7.1*
	414	588,000	8	13.6	
	421	664,000	11	16.6	
	422	644,000	4	6.2	
	423	602,000	1	1.7	
	424	578,000	14	24.2	

* p<0.01 v.s. 0 ppm group

Table.8 *gpt* gene mutation spectra of 1,4-dioxane

Type of mutation	Treatment of 1,4-dioxane			
	0	200ppm	1000ppm	5000ppm
Base substitution				
Transition				
G:C to A:T	13 (59.1) ^a 2.5 ± 1.7 ^b	14 (43.8) 2.8 ± 1.7	9 (24.3) 1.9 ± 1.4	14 (23.7) 3.2 ± 2.3
A:T to G:C	2 (9.1) 0.3 ± 0.6	1 (3.1) 0.2 ± 0.4	6 (16.2) 1.1 ± 1.2	18 (30.5) 4.0 ± 3.1 *
Transversion				
G:C to T:A	4 (18.2) 0.9 ± 1.5	6 (18.8) 1.1 ± 0.8	4 (10.8) 0.8 ± 1.1	9 (15.3) 2.0 ± 1.8
G:C to C:G	0 (0) 0	1 (4.5) 0.3 ± 0.8	2 (5.4) 0.5 ± 0.9	2 (3.4) 0.4 ± 0.8
A:T to T:A	0 (0) 0	4 (12.5) 1.0 ± 2.2	7 (18.9) 1.5 ± 1.0 *	8 (13.6) 1.7 ± 1.8 *
A:T to C:G	0 (0) 0	0 (0) 0	2 (5.4) 0.4 ± 1.0	3 (5.1) 0.8 ± 1.1
deletion				
Single bp	1 (4.5) 0.2 ± 0.5	1 (3.1) 0.2 ± 0.5	3 (8.1) 0.7 ± 1.1	4 (6.8) 1.0 ± 1.4
Over 2bp	1 (4.5) 0.3 ± 0.9	1 (3.1) 0.2 ± 0.4	3 (8.1) 0.7 ± 0.9	1 (1.7) 0.2 ± 0.6
Insertion				
Single bp	1 (4.5) 0.2 ± 0.4	3 (9.4) 0.7 ± 0.9	1 (2.7) 0.3 ± 0.8	0 (0) 0
Over 2bp	0 (0) 0	1 (3.1) 0.2 ± 0.6	0 (0) 0	0 (0) 0
Total	22 (100) 4.3 ± 2.6	32 (100) 6.5 ± 3.1	37 (100) 7.9 ± 2.9	59 (100) 13.2 ± 7.1 *

^aNumber of mutations (%)

^b Mutation frequency (× 10⁶)

* : p value < 0.05 (vs 0 ppm group)

Table.9 Mutation frequencies of 1,4-dioxane (*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	932,500	7	7.51	5.13 \pm 1.83
	112	467,500	2	4.28	
	113	1,286,500	5	3.89	
	114	1,901,000	5	2.63	
	121	166,500	1	6.01	
	122	465,000	3	6.45	
5000 ppm	411	1,048,500	18	17.17	23.59 \pm 12.63*
	412	1,281,500	22	17.17	
	413	444,500	15	33.75	
	414	1,140,500	16	14.03	
	421	743,500	11	14.79	
	422	358,500	16	44.63	

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

Table.10 *gpt* gene mutation spectra of 1,4-dioxane

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

本研究は、肝上皮細胞の LPA 受容体遺伝子発現と細胞運動能を指標に、毒性・発がんリスクを短期的に検出する細胞培養系を確立することを目的とする。種々の発がん物質を肝上皮細胞（WB-F344）に短期処理し、LPA 受容体遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR 法で検索したところ、肝発がんイニシエーター処理により LPA3 遺伝子発現の上昇が見られ、プロモーターでは LPA1 遺伝子発現が上昇した。また、肝発がん作用の違いにより特異的な細胞運動能の制御が見られた。本研究より、種々の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 メチル化異常を、肝上皮細胞を用いた細胞培養系にて短期的に検出する可能性が示唆された。

A. 研究目的

がんは、質的に異なる多段階のステップを経て前がん病変より発生する。さらに、がんの発生にいたる過程において種々の遺伝子異常が蓄積することが知られている。遺伝子変異には、DNA 分子の塩基配列そのものに変化を生じる genetic な変異と、塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現に異常をきたす DNA メチル化異常などの epigenetic な変異がある。これら genetic ならびに epigenetic な遺伝子異常は、がんの発生のみならず浸潤・転移、血管新生など様々ながんの増悪化に重要な役割を演じることが、ヒトがん症例や動物発がん実験系を用いた多くの研究によって明らかとなっている。さらに、がんの発生要因に関する研究も動物実験を主体に研究が進められ、環境中に存在し発がん作用を及ぼす物質が多数見出されている。一方、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

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%CO₂ 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_2)、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_2O_2) 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。

(倫理面への配慮)

該当せず。

C. 研究結果

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_2 およびEE処理細胞では、LPA3遺伝子発現の有意な上昇が見られ、細胞運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_2O_2 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

LPAは、脂質・グリセロール・リンを骨格とする生理活性物質である。LPAはGタンパク共役型膜受容体であるLPA受容体と特異的に結合し、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。これまでにLPA受容体は、LPA1~LPA6の6種類が同定されている。これらの受容体の細胞機能は同一ではなく、また細胞依存性に特異的な作用を呈する。また、がん細胞においても、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、血管新生ならびに抗がん剤抵抗性に関与することが報告されている。本研究で用

いた肝上皮細胞 (WB-F344) では、LPA1 は細胞運動能を抑制し LPA3 は促進することがこれまでの研究で判明している。

これらの知見をもとに本研究では、発がん物質、エストロゲン・合成エストロゲン、内分泌かく乱物質ならびに過酸化水素を肝上皮細胞に短期処理し、LPA 受容体遺伝子発現レベルへの影響を検索することで、被検物質に特異的な LPA 受容体遺伝子発現が誘導されるかを検索した。肝発がん物質として用いたエチオニンは、ラットに長期間食餌中に混和投与すると肝細胞癌が誘発される。また、肝発がんイニシエーターである DEN 及び肝発がんプロモーターである PB・OA・clofibrate を肝上皮細胞に処理した。エチオニン・DEN で処理した肝上皮細胞においては 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、肝発がん作用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。DEN を用いて誘発したラット肝細胞癌において LPA1 遺伝子突然変異が高頻度に検出されることや、神経芽細胞腫 (B103) 細胞において LPA1 は細胞運動・浸潤能を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から、DNA による肝発がん過程では 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考えられる。さらに、H₂O₂ 処理した肝上皮細胞の LPA3 遺伝子発現レベルは上昇し細胞運動能は促進した。炎症巣で発生する活性酸素は、がん細胞の

増殖・浸潤・転移に促進的に作用する。したがって、LPA3 はがん細胞の増殖・浸潤・転移に対して促進的に作用することが示唆される。

エストロゲンと乳がん発生との関連についてはこれまでに多くの報告がある。本研究で用いた E₂ には腎発がん活性、EE には肝発がんプロモーション活性、DES は生殖器に対する発がん性を有する。これらエストロゲンを肝上皮細胞に処理すると、異なる LPA 受容体遺伝子発現とそれに伴う運動性の変化が誘導された。これら肝上皮細胞に対する反応性の差異をもたらす原因は不明であるが、標的発がん臓器の差異に依存する可能性がある。さらに本研究では、食品添加物として含まれる種々の化合物に対する評価系を確立するために、内分泌かく乱物質についても検索を行った。BPA は LPA1 遺伝子発現を、4-NP は LPA3 遺伝子発現を上昇させた。

被験物質における発がん性や内分泌かく乱物質としての作用の有無を検索するためには、動物を用いた実験系がまだまだ有用である。ヒト生体内で生じる毒性・発がん性を傍証する上で、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、など決して簡便な方法とは言えない。本研究で用いた肝上皮細胞系は、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 受容体遺伝子発現レベルを指標とする肝上皮細胞を用いた肝発がん性・内分泌かく乱作用の検索のみならず DNA メチル化異常のスクリーニングへの応用が可能となることが考えられる。

E. 結論

被検物質の発がん作用の違いにより、肝上皮細胞における特異的な LPA 受容体遺伝子発現レベルの誘導と細胞運動能の制御が見られた。本研究結果より、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. 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-O-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.
 13. Hirane M, Araki M, Dong Y, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Inhibitory effects of LPA1 on cell motile activities stimulated by hydrogen peroxide and 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 (441) 47-52.
 14. Honoki K, Tsujiuchi T. Senescence bypass in mesenchymal stem cells: a potential pathogenesis and implications of pro-senescence therapy in sarcomas. *Expert Rev Anticancer Ther.* 13 (2013) 983-996.
 15. Tanabe E, Kitayoshi M, Hirane M, Araki M, Dong Y, Fukushima N, Tsujiuchi T. Downregulation of activation factors of endothelia and fibroblasts via lysophosphatidic acid signaling in a mouse lung cancer LL/2 cell line. *J Recept Signal Transduct Res.* 2013 (33) 286-290.
 16. Inoue S, Tanabe E, Shibata A, Hirane M, Araki M, Dong Y, Fukushima N, Tsujiuchi T. Ethionine regulates cell motile activity through LPA receptor-3 in liver epithelial WB-F344 cells. *Mol Cell Biochem* 2013 (383) 173-177.
 17. Shibata A, Tanabe E, Inoue S, Kitayoshi M, Okimoto S, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Hydrogen peroxide stimulates cell

- motile activity through LPA receptor-3 in liver epithelial WB-F344 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 (433) 317-321.
18. 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* 2014(79)112-118.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Kato K, Yoshikawa K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Opposite roles of LPA₁ and LPA₃ on cell motile and invasive

- activities of pancreatic cancer cells. *Tumor Biol.* 2012 (33) 1739-1744.
27. 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 LPA₁ and LPA₃ in mammary tumor FM3A cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012 (32) 209-213.
28. Kitayoshi M, Kato K, Tanabe E, Yoshikawa K, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of endothelial cell migration by constitutively active LPA₁-expressing tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 (422) 339-343.
29. 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.
30. 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.
2. 学会発表
1. 福嶋伸之、田中亜以子、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. 大阪府)).
6. Honoki K, Fujii H, Kido A, Tsukamoto S, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Receptor type-specific role of Lysophosphatidic acid signaling for migration and invasion in sarcoma cells. (第 72 回日本癌学会総会. 2013 年 10 月 3 日~5 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)).

7. 石井章一、辻内俊文、福嶋伸之. LPA1 の変異は小胞体への蓄積と情報伝達の異常を生じる. (第 86 回日本生化学大会. 2013 年 9 月 11 日～13 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)).
8. 福嶋伸之、辻内俊文、岩森正男. 脂肪酸による卵巣がん細胞 HNOA の細胞死抑制機構. (第 86 回日本生化学大会. 2013 年 9 月 11 日～13 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)).
9. 石井章一、辻内俊文、福嶋伸之. ラットがん組織から見出された LPA1 変異体の機能解析. (第 85 回日本生化学大会. 2012 年 12 月 14 日～16 日. 福岡国際会議場 (福岡県)).
10. 福嶋伸之、大久保慶、桑田聖平、辻内俊文、岩森正男. 卵巣がん細胞の生存および増殖に対する種々の脂肪酸の作用. (第 85 回日本生化学大会. 2012 年 12 月 14 日～16 日. 福岡国際会議場 (福岡県)).
11. 朴木寛弥、藤井宏真、城戸顕、塚本真治、辻内俊文. リゾフォスファチジン酸受容体阻害はヒト肉腫細胞の運動・浸潤能を抑制する. (第 71 回日本癌学会総会. 2012 年 9 月 19 日～21 日. ロイトン札幌 (北海道)).

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

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
山野 莊太郎、魏民、加藤 実、鰐淵英機	第 2 節 膀胱がんモデル動物	中村卓郎	ANIMAL MODELS 疾患モデルの作成と利用：がん	エル・アイ・シー	東京都	2012	560-568
加藤 実、魏民、鰐淵英機	尿路上皮腫瘍の遺伝子異常と予後の関連	都築豊徳、森永正二郎	腫瘍病理識別診断アトラス 腎盂・尿管・膀胱癌	株式会社文光堂	東京都	2012	237-244
鰐淵英機、山野 莊太郎、魏 民	肺がんモデル		細胞工学 Vol.31 No.12	学研メディカル秀潤社	東京都	2012	1384-1389
藤岡正喜、山野 莊太郎、魏 民、鰐淵英機	免疫組織染色の定量法		細胞工学	学研メディカル秀潤社	東京都	2014	316-322
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
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
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
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
Xie XL, Wei M,	Dammar resin, a non-mutagen, induces	Mutat Res	748	29-35	2012

Kakehashi A, Yamano S, Okabe K, Tajiri M, Wanibuchi H.	oxidative stress and metabolic enzymes in the liver of <i>gpt</i> delta transgenic mouse which is different from a mutagen, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline.				
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	2257-22 61	2012
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
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
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
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	32	328-334	2012
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	428	105-109	2012
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	25	225-228	2012
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	33	1899-19 05	2012

Kato K, Yoshikawa K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Opposite roles of LPA ₁ and LPA ₃ on cell motile and invasive activities of pancreatic cancer cells.	Tumor Biol	33	1739-1744	2012
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 ₁ and LPA ₃ in mammary tumor FM3A cells.	J Recept Signal Transduct Res.	32	209-213	2012
Kitayoshi M, Kato K, Tanabe E, Yoshikawa K, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T.	Enhancement of endothelial cell migration by constitutively active LPA ₁ -expressing tumor cells.	Biochem Biophys Res Commun	422	339-343	2012
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.	417	790-793	2012
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	316	91-96	2012
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
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
Shibata A, Tanabe E, Inoue S, Kitayoshi M,	Hydrogen peroxide stimulates cell motile activity through LPA receptor-3 in liver epithelial WB-F344 cell.	Biochem Biophys Res Commun	433	317-321	2013