

**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）
分担研究報告書（平成 26 年度）**

畜水産食品中に含まれる動物用医薬品等の安全性確保に関する研究

分担課題：発がん初期過程の細胞周期解析

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究要旨

本研究では、動物用医薬品等の発がん性に関して、細胞周期異常に着目した短期発がん予測系の確立を目的として、ラットを用いて発がん物質反復投与時の発がん標的臓器での細胞増殖性と細胞周期関連分子の発現及びアポトーシスの誘導性を経時的に検討した。平成 25 年度は、2/3 肝部分切除群、肝発がん物質（methyleugenol、thioacetamide）投与群及び非発がん肝毒性物質（acetaminophen、 α -naphthyl isothiocyanate、promethazine）投与群を設定し、肝切除後ないし投与開始後 3、7、28 日での肝臓での解析を実施した結果、投与開始後 28 日目で肝発がん物質特異的に M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻が生じる可能性を報告した。平成 26 年度は、同上の実験で G₁/S 期チェックポイント制御分子の発現変動を検討した。その結果、肝発がん物質特異的な反応として、投与開始後 28 日目に *Rb12* の mRNA 発現減少、*Mdm2* の mRNA 発現増加、リン酸化 *Mdm2* 陽性細胞及び DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の増加が生じ、G₁/S 期チェックポイント機能の破綻が示唆された。また平成 26 年度は、肝発がんの陽性対照物質（methapyrilene、thioacetamide）、肝発がん性が指摘されている動物用医薬品（carbadox、leucomalachite green）、肝発がんプロモーター（ β -naphthoflavone、oxfendazole）、非発がん肝毒性物質（acetaminophen、promethazine）の 7、28 ないし 90 日間反復投与を実施して同様の検討を行った結果、細胞増殖誘導性に乏しい肝発がん物質・肝発がんプロモーターは最長 90 日間の反復投与によっても反応性を示さず、28 日間以上の長期投与による有効性は見出せなかった。更に、腎発がん性陽性の対照物質（1-amino-2,4-dibromoantraquinone、1,2,3-trichloropropane）、腎発がん性が指摘されている動物用医薬品（nitrofurantoin）、非発がん腎毒性物質（1-chloro-2-propanol、triamterene、carboxin）の 3、7 ないし 28 日間反復投与を実施し、肝臓とは異なる発がん標的性での細胞周期関連分子の経時的な反応性を検討した。その結果、腎発がん物質には、投与開始後 28 日目で発がん物質特異的な M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を示すものの、細胞周期障害性は強くないものや、細胞周期障害性を伴わない発がん機序を推定させる物質があると判断された。

A. 研究目的

動物用医薬品等の化学物質の発がん性評価手法であるげっ歯類を用いた発がん性試験は、長期間に及ぶ投与のため、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題があり、短期発がん検出系の確立が求められている。殊に評価上問題となることの多い非遺伝毒性発がん物質に関しては、多数の発がん標的に共通する検出の手立てがなく、有効な手法開発が望まれている。一方、ラットやマウスの肝臓ないし腎臓に発がん性のある化学物質の投与過程早期において、腫瘍性病変とは異なる巨大核の出現がしばしば見出されており、ゲノムの異数性を反映し、発がん標的的部位に一致して、投与期間と共に増加することより、巨大核の出現に至る細胞内の分子過程に発がんの鍵となるものが存在する可能性が強く示唆されている。National Toxicology Program で行われた発がん性試験では、肝発がん性を示す物質の特徴として、ラットなどの亜急性毒性・慢性毒性試験等において、肝重

量増加、肝細胞過形成と変性、巨大核の出現、チトクローム P450 酵素誘導の所見が多ければ多いほど、肝発がん性の陽性頻度が高くなることが報告されている (Allen *et al.*, 2004)。特に、肝発がんの初期過程を与える可能性の高い巨大核の出現はゲノムの異数性を示し、遺伝子傷害の蓄積あるいは核分裂機構の障害を反映した前がん病変と位置付ける研究者もいる (Brown *et al.*, 2007; Adler *et al.*, 2009)。我々は既に、げっ歯類を用いた発がん物質の 28 日間反復投与により、増殖活性の亢進と共に、アポトーシスの亢進および G₂/M 期関連分子発現細胞の増加を誘発することと、肝発がん物質の thioacetamide (TAA) と腎発がん物質の ochratoxin A に共通して、M 期スピンドルチェックポイント制御分子である Mad2 のキネトコアへの局在を阻止する Ubiquitin D (Ubd) の G₂ 期からの異常発現を誘発することを見出している。このことは、発がん物質の投与早期から、M 期スピンドルチェックポイント制御機構からすり抜ける細胞

別添 4

と共に、G₂/M 期停止やアポトーシスに陥る細胞の増加を招いていることを示唆し、発がん過程早期のメカニズムとして短期発がん予測系への応用が期待される (Taniai et al., 2012, Yafune et al., 2013)。しかし、M 期スピンドルチェックポイント以外の細胞周期制御機構の傷害の有無や、28 日間投与で細胞増殖活性亢進を示さない発がん物質・発がんプロモーターの長期間投与した際の反応性の変化、肝発がん物質で認められた細胞周期制御障害の肝臓とは異なる発がん標的臓器での反応性については未検討である。

平成 25 年度は、ラットに 2/3 肝部分切除及び肝発がん物質、非発がん肝毒性物質の反復投与を実施し、切除後ないし投与開始後 3、7 ないし 28 日間での細胞増殖性と細胞周期関連分子の発現及びアポトーシスの誘発性を経時的に解析し、発がん物質特異的な反応の出現時期を検討した。その結果、投与開始後 28 日目で、肝発がん物質特異的に M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻が生じる可能性が示唆された。平成 26 年度は、25 年度に解析を実施した肝臓を標的とした実験サンプルを用いて、発がん物質の短期間投与による M 期スピンドルチェックポイント以外の細胞周期制御機構、特に G₁/S 期チェックポイントにおける制御異常の可能性の有無を検討した。また、28 日間投与で細胞増殖活性亢進を示さない発がん物質・発がんプロモーターを長期間投与した際の反応性を検討する目的で、典型的な肝発がんプロモーター物質と共に、肝発がん性が指摘されているものの増殖活性などが検討されていない動物用医薬品をラットに対して最大 90 日間反復投与した。その際、28 日間投与で細胞増殖亢進が確認できている肝発がん物質を陽性対象として実施した。さらに、28 日間反復投与によって生じた肝発がん物質に特異的な細胞周期制御障害が異なる発がん標的臓器でも認められるかを検討する目的で、腎発がん物質と非発がん腎毒性物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与を実施した。これらの肝臓ないし腎臓の発がん標的組織について、免疫組織化学手法による細胞増殖指標、アポトーシス指標および細胞周期関連分子群の発現分布と免疫二重染色法による Ubd の G₂ 期

における発現の変化、real-time RT-PCR 方による細胞周期チェックポイント関連遺伝子ないし DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の変化を解析した。

B. 研究方法

動物実験

5 週齢の雄性 F344 ラットを日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、粉末基礎飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) と自由飲水にて馴化した。動物はバリア動物室のポリカーボネートケージにて、12 時間の明暗サイクル 23±3°C で、湿度 50±20%にて飼育した。

(1) 肝発がん物質投与に起因する G₁/S 期チェックポイント制御異常の検討

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=20)、2/3 肝部分切除処置 (PH) 群 (n=22)、methyleugenole (MEG) 群 (n=22)、TAA 群 (n=20)、acetaminophen (APAP) 群 (n=20)、 α -naphthyl isothiocyanate (ANIT) 群 (n=20)、promethazine (PMZ) 群 (n=22) に分けた。無処置対照群、PH 群、MEG 群、PMZ 群は、基礎飼料と水道水にて飼育し、その他の群はそれぞれ、400 ppm (TAA)、10,000 ppm (APAP)、1000 ppm ~ 600 ppm (ANIT) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、MEG (1000 mg/kg 体重) 群と PMZ (200 ~ 100 mg/kg 体重) 群においては、それぞれ MEG と PMZ を毎日強制経口投与した。ANIT および PMZ 投与群では投与開始 3 日後に摂餌量の減少と体重減少が認められたため、投与量を変更した。投与開始後 3、7 日後に各群半数ずつ深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、肝臓を摘出した。その後追加実験として、動物を無処置対照群 (n=10)、PH 群 (n=11)、MEG 群 (n=11)、TAA 群 (n=10)、APAP 群 (n=10)、ANIT 群 (n=10)、PMZ 群 (n=11) に分け、それぞれ 400 ppm (TAA 群)、10,000 ppm (APAP 群)、600 ppm (ANIT 群)、1000 ~ 800 mg/kg 体重 (MEG 群)、100 mg/kg 体重 (PMZ 群) の混餌ないし強制経口投与を 28 日間行った。MEG 投与群で、投与開始後 11 日目において全身状態の悪化から 1 匹安楽殺を行い、以

別添 4

後投与量を変更した。MEG および TAA は肝発がんの陽性対照物質として選択し、過去に行われたラットを用いた発がん性試験で肝臓に腫瘍形成が認められる用量を投与量として設定した (Becker, 1983; NTP, 2000)。

(2) 肝発がん物質・肝発がんプロモーターの最大 90 日間反復投与での反応性の検討

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=20)、methapyrilene (MTP) 群 (n=20)、carbadox (CRB) 群 (n=20)、leucomalachite green (LMG) 群 (n=20)、 β -naphthoflavone (BNF) 群 (n=20)、oxfendazole (OX) 群 (n=20)、promethazine (PMZ) 群 (n=22) に分けた。無処置対照群、PMZ 群は、基礎飼料と水道水にて飼育し、その他の群はそれぞれ、1000 ppm (MTP 群)、300 ppm (CRB 群)、1160 ppm (LMG 群)、10,000 ppm (BNF 群)、500 ppm (OX 群) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、PMZ (100 mg/kg 体重) 群においては、PMZ を毎日強制経口投与した。投与開始後 7、28 日目に各群半数ずつ深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、肝臓を摘出した。その後 28 日間の反復投与で増殖活性の亢進を示さない肝発がん物質・肝発がんプロモーターの反応性を検討する目的で、動物を無処置対照群 (n=10)、MTP 群 (n=11)、TAA 群 (n=11)、CRB 群 (n=10)、TAA 群 (n=10)、LMG 群 (n=10)、BNF 群 (n=10)、OX 群 (n=10)、PMZ 群 (n=11) に分け、それぞれ 1000 ppm (MTP 群)、400 ppm (TAA 群)、300 ppm (CRB 群)、1160 ppm (LMG 群)、10,000 ppm (BNF 群)、500 ppm (OX 群)、10,000 ppm (APAP 群)、100 mg/kg 体重 (PMZ 群) の 90 日間反復投与を行った。CRB および LMG は動物用医薬品として選択した。CRB は設定用量で肝発がん性が報告されており (Sykora & Vortel, 1986)、LMG は肝発がん性が疑われており、2 年間の発がん性試験で肝腺腫の発生頻度が増加傾向を示した投与濃度の倍の濃度を設定した (Culp et al., 2006)。MTP (Lijinsky & Kovatch, 1986)、TAA (NTP, 2004) は肝発がんの陽性対照物質として、BNF (Dewa et al., 2009)、OX (Shoda et al., 2000) は肝発がんプロモーターとし

て選択し、過去に行われた発がん性試験ないし二段階発がんモデルを用いた 6 週間のプロモーション後に、肝臓に腫瘍ないし前がん病変の形成が認められる用量を投与量として設定した (Shoda et al., 2000; Dewa et al., 2009)。

(3) 腎発がん物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与における腎臓での反応性の検討

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=30)、nitrofurantoin (NFT) 群 (n=33)、1-amino-2,4-dibromoantraquinone (ADAQ) 群 (n=33)、1,2,3-trichloropropane (TCP) 群 (n=33)、1-chloro-2-propanol (CPN) 群 (n=30)、triamterene (TAT) 群 (n=30)、carboxin (CBX) 群 (n=30) に分けた。無処置対照群、TCP 群は、基礎飼料と蒸留水にて飼育し、投与群はそれぞれ、5000 ~ 3000 ppm (NFT 群)、25,000 ppm (ADAQ 群)、1200 ppm (TAT 群)、2000 ppm (CBX 群) を混ぜた飼料と蒸留水にて飼育し、CPN 群は 3300 ppm を混ぜた蒸留水と基礎飼料にて飼育した。また、TCP 群においては、TCP を 125 mg/kg 体重の割合で毎日強制経口投与した。NFT 投与群では投与開始後 10 日目に摂餌量の減少と体重減少が認められたため、投与量を変更した。投与開始後 3、7、28 日後に各群全動物数の 3 分の 1 ずつ深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、腎臓を摘出した。NFT は動物用医薬品であり、腎発がん性が報告されている (NTP, 1989)。ADAQ、TCP は腎発がん物質として選択し、過去に行われた発がん性試験にて、腎臓に腫瘍の形成が認められる用量を投与量として設定した (NTP, 1993; NTP 1996)。

それぞれの動物実験で採取した肝臓および腎臓は、4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定し、その後パラフィン包埋し、免疫組織化学的解析に供した。また、肝臓組織については、臓器摘出後液体窒素により直ちに凍結し、解析に使用するまで -80°C の環境下にて保存した。

免疫組織学的解析及びアポトーシスの解析

免疫組織化学的検索として、採取した肝臓ないし

別添 4

腎臓を PFA 固定後、エタノール系列で脱水、パラフィン包埋した後、薄切し、一部は HE 染色を施した。免疫組織学的検索については、次の手順で行った。Ki-67、p21^{Cip1} については、脱パラフィン処理した組織切片を、内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3% 過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、Ki-67 はオートクレーブ 121°C で 10 分間、p21^{Cip1} はマイクロウェーブ □□°C で □□ 分間にて反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて正常ウマ血清でブロッキングし、マウス抗 Ki-67 抗体 (200 倍希釈; Dako, Denmark) マウス抗 p21^{Cip1} 抗体 (1000 倍希釈; Abcam, UK) を用いて 4°C で一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, USA) を用い、3,3'-ジアミノベンジジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。更に phosphorylated-histone H3 (p-Histone H3)、topoisomerase II alpha (TopoIIα)、Ubd、cleaved caspase 3、phosphorylated-Mdm2 (p-Mdm2) の免疫組織学的解析については、次の手順で行った。脱パラフィン処理した肝組織切片を、p-Histone H3、TopoIIα、Ubd は □□ mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、オートクレーブ 121°C で 10 分間、cleaved caspase 3 および p-Mdm2 は Target retrieval solution 3-in-1 (pH 9.0) (Dako) に浸漬し、オートクレーブ 121°C で 10 分間にて反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3% 過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、正常ヤギ血清でブロッキングし、ウサギ抗 p-Histone H3 抗体 (□□□倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA) ウサギ抗 TopoIIα 抗体 (□□□倍希釈; Abcam) ウサギ抗 Ubd 抗体 (□□□倍希釈; Proteintech Group, USA) ウサギ抗 cleaved caspase 3 抗体 (□□□倍希釈; Cell Signaling Technologies, USA) p-Mdm2 (400 倍希釈; Cell Signaling Technologies) を用いて一晩反応させた。次いで二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) を用い、3,3'-ジアミノベンジ

ジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

また腎臓組織については、更にアポトーシスの程度を検討するために、ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, MA, USA) を用いて TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 検出法による解析を行った。脱パラフィンした組織を 20 μg/ml proteinase K で 15 分間室温に静置した。内在性のペルオキシダーゼ活性は 3.0% 過酸化水素で抑制した。発色および対比染色は免疫組織化学染色と同様に行った。

また、腎臓について、Ubd と TopoIIα ないし p-Histone H3 との免疫二重染色を行い、Ubd は二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) を用い、3,3'-ジアミノベンジジンにより発色させ、TopoIIα および p-Histone H3 は二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC-AP kit (Vector Laboratories) を用い、Vector Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories) により発色させた。

陽性細胞の組織形態学的解析

肝臓に免疫組織化学染色を施した後、Ki-67、p-Histone H3、TopoIIα、Ubd、p21^{Cip1}、p-Mdm2 は 200 倍視野で無作為に 10 視野選択して陽性細胞数を視覚的に計数し、cleaved caspase 3 は 100 倍視野で無作為に 5 視野選択して陽性細胞数を視覚的に計数した。また、腎臓に Ki-67、p-Histone H3、TopoIIα、Ubd の免疫組織化学染色ないし TUNEL アッセイを施した後、400 倍視野で左右腎臓の髄質外帯 (OSOM) から無作為に 5 視野ずつ選択して陽性尿細管上皮細胞数を視覚的に計数した。そして、総細胞数を WinROOF image analysis and measurement software を用いて計数し、陽性細胞数の総細胞数に対する割合を求めた。

また、腎臓を用いて、Ubd と TopoIIα ないし p-Histone H3 との免疫二重染色を行った後、Ubd と TopoIIα ないし p-Histone H3 が共発現する尿細管上皮細胞数、Ubd もしくは TopoIIα ないし p-Histone H3

別添 4

が単独で発現する細胞数を計数した。

Real-time RT-PCR による mRNA 発現の定量解析

肝発がん物質に誘導される G₁/S 期チェックポイント制御異常の検討のための動物実験において、平成 25 年度での解析により、投与開始後 28 日目で増殖活性の亢進が認められた MEG、TAA、PMZ 群について、各投与期間で各群 6 匹の動物を無作為に選出し、real-time RT-PCR による解析を行った。肝臓組織は-80°C から取り出し、RNeasy Mini kit によって total RNA を抽出後、2 µg の total RNA より cDNA を合成した。PCR 反応は SYBR[®]Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用い、Step OnePlus™ Real-time PCR System (Life Technologies) にて、製造元のプロトコールに従って実施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Life Technologies) を用いて設計した。各遺伝子の mRNA 発現量は、無処置対照群での発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとして *Hprt1* の検量線を求め、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) にて算出した。用いたプライマーは Table 1 に示した。

統計解析

定量データについて平均値および標準偏差を求めた。Bartlett 検定で等分散を確認した後、一元配置分散分析を行った。Bartlett 検定で当分散が認められた場合は Dunnett 多重比較検定を行った。Bartlett 検定で等分散が認められなかった場合、Steel 検定を実施した。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与と強制経口投与が主体であり、また、動物はすべて深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、東京農工大学の利用規定および米国国立衛生研究所 (NIH) が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

(1) 肝発がん物質投与に起因する G₁/S 期チェックポイント制御異常の検討

i) mRNA 発現

無処置対照群、MEG 群、TAA 群、PMZ 群から、各投与期間で各群 6 匹ずつ選び、real-time RT-PCR 法による解析を行い、結果は Table 2 に示した。

投与開始後 3 日目では、G₁/S 期チェックポイント関連分子のうち、*Cdkn1a* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した。*Cdkn2a*、*Rb1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Rbl2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に減少した。*Tp53*、*Mdm2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Tp53* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka*、*Bub1*、*Plk1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。*Aurkb* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Mad111* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に減少した。*Mad211* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。DNA 損傷関連遺伝子のうち、*Atm*、*Chek1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。*Brca1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Brca2*、*Chek2*、*Esco1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。*Brcc3* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Esco1*、*Rad17* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Gadd45a* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した。*Rad50* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して変動は認められなかった。

別添 4

投与開始後 7 日目では、G₁/S 期チェックポイント関連分子のうち、*Cdkn1a*、*Mdm2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した。*Cdkn1a* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。*Cdkn2a*、*Tp53* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。*Tp53* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Rb1*、*Rbl2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka*、*Mad2l1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群で有意に減少した。*Aurkb*、*Bub1*、*Plk1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に減少した。*Mad1l1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。DNA 損傷関連遺伝子のうち、*Brcal* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に減少した。*Brc2*、*Chek1*、*Chek2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群で有意に減少した。*Brc3* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Esco1*、*Rad17* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。*Esco1*、*Gadd45a*、*Rad17* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Gadd45a* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。*Rad50* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群で有意に減少した。*Atm* の mRNA レベルは各処置群で無処置対照群と比較して変動は認められなかった。

投与開始後 28 日目では、G₁/S 期チェックポイント関連分子のうち、*Cdkn1a*、*Mdm2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した。*Cdkn1a* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。*Cdkn2a*、*Tp53* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Rbl2* の mRNA レベルは

無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に減少した。*Rb1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurkb*、*Mad2l1*、*Plk1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した。*Aurka* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Mad1l1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に減少した。*Bub1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群で有意に増加した。DNA 損傷関連遺伝子のうち、*Chek1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した。*Esco1*、*Gadd45a*、*Rad17*、*Rad50* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Atm*、*Esco1l* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群で有意に減少した。*Esco1*、*Rad17* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。*Brcal*、*Brc2*、*Chek2* の mRNA レベルは各処置群で無処置対照群と比較して変動は認められなかった。

ii) 免疫組織化学染色による分子分布

投与開始後 3 日目では、p-Mdm2 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した (Fig. 1A)。投与開始後 7 日目では、p-Mdm2 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群、PMZ 群で有意に増加した (Fig. 1B)。投与開始後 28 日目では、p-Mdm2 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した (Fig. 1C)。

(2) 肝発がん物質・肝発がんプロモーターの最大 90 日間反復投与での反応性の検討

i) 免疫組織化学染色による分子分布

投与開始後 7 日目では、Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群で有意に増加し、CRB 群、LMG 群、OX 群で有意に減少した (Fig. 2A)。p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、CRB 群、

別添 4

OX 群で有意に減少した (Fig. 2B)。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群で有意に増加し、CRB 群、OX 群で有意に減少した (Fig. 2C)。Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群で有意に増加し、CRB 群、LMG 群、OX 群で有意に減少した (Fig. 2D)。p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、CRB 群、LMG 群で有意に増加した (Fig. 2E)。cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群で有意に増加した (Fig. 2F)。

投与開始後 28 日目では、Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、PMZ 群で有意に増加した (Fig. 3A)。p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、PMZ 群で有意に増加した (Fig. 3B)。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群で有意に増加し、CRB 群で有意に減少した (Fig. 3C)。Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、PMZ 群で有意に増加し、CRB 群で有意に減少した (Fig. 3D)。p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、CRB 群で有意に増加した (Fig. 3E)。cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群で有意に増加した (Fig. 3F)。

投与開始後 90 日目では、Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、TAA 群で有意に増加した (Fig. 4A)。p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、TAA 群で有意に増加し、CRB 群、APAP 群で有意に減少した (Fig. 4B)。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、TAA 群で有意に増加した (Fig. 4C)。Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、TAA 群で有意に増加した (Fig. 4D)。p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、TAA 群、CRB 群、LMG 群、OX 群、APAP 群、PMZ 群で有意に増加した (Fig. 4E)。cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP 群、TAA 群、OX 群で有意に増加した (Fig. 4F)。

(3)腎癌がん物質の 3, 7 ないし 28 日間反復投与に

おける腎臓での反応性の検討

i) 免疫組織化学染色による分子分布

投与開始後 3 日目では、Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群、TCP 群、CBX 群で有意に増加した (Fig. 5A)。p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群、TCP 群で有意に増加し、TAT 群で有意に減少した (Fig. 5B)。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群、TCP 群、CPN 群、CBX 群で有意に増加し、ADAQ 群、TAT 群で有意に減少した (Fig. 5C)。Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群、TCP 群、CBX 群で有意に増加し、ADAQ 群、TAT 群で有意に減少した (Fig. 5D)。TUNEL 陽性細胞率は、各処置群で無処置対照群と比較して変動は認められなかった (Fig. 5E)。

投与開始後 7 日目では、Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群、TCP 群で有意に増加した (Fig. 6A)。p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群で有意に増加し、CPN 群で有意に減少した (Fig. 6B)。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、TCP 群で有意に増加し、ADAQ 群、TAT 群で有意に減少した (Fig. 6C)。Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、TCP 群で有意に増加し、ADAQ 群、TAT 群で有意に減少した (Fig. 6D)。TUNEL 陽性細胞率は、NFT 群、TCP 群で有意に増加した (Fig. 6E)。

投与開始後 28 日目では、Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群、ADAQ 群、TCP 群、CBX 群で有意に増加した (Fig. 7A)。p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群、CBX 群で有意に増加した (Fig. 7B)。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、ADAQ 群、TCP 群、CBX 群で有意に増加した (Fig. 7C)。Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、ADAQ 群、TCP 群、CBX 群で有意に増加した (Fig. 7D)。TUNEL 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、CBX 群で有意に増加した (Fig. 7E)。

ii) Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の共発現細胞

別添 4

の分布

投与開始後 28 日目で増殖活性亢進が認められた NFT 群、ADAQ 群、TCP 群、CBX 群について、増殖活性と Ubd の発現異常の関与を検討する目的で、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色を行った。その結果、TopoII α 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、NFT 群、TCP 群、CBX 群で無処置対照群と比較して有意に増加した (Fig. 8A)。一方で、Ubd 陽性細胞のうち TopoII α を共発現する細胞の割合は、各処置群で無処置対照群と比較して変動は認められなかった。また、Ubd 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は ADAQ 群、TCP 群で無処置対照群と比較して有意に減少した (Fig. 8B)。一方で、p-Histone H3 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は各処置群で無処置対照群と比較して変動は認められなかった。

D. 考察

(1) 肝発がん物質投与に起因する G₁/S 期チェックポイント制御異常の検討

平成 25 年度の解析の結果、化学物質の投与初期に誘発される細胞増殖亢進時および、肝部分切除による再生性増殖時に生じる細胞周期関連分子発現の変動を経時的に解析した結果、肝発がん物質特異的に、増殖活性の亢進とともに、G₁/S 期チェックポイント機能の活性化とそれに伴うアポトーシスの増加、M 期スピンドルチェックポイント制御の破綻を示唆する結果が得られた。平成 26 年度は、G₁/S 期チェックポイント関連遺伝子、M 期スピンドルチェックポイント関連遺伝子および DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の定量解析を行うとともに、Rb 蛋白や p53 の分解を促進するリン酸化 Mdm2 の分布解析を行い、肝発がん物質特異的に誘発される細胞周期制御異常とそれに伴う DNA 損傷の蓄積について検討した。

解析の結果、肝発がん物質は全ての投与期間で、Rb ファミリー蛋白の 1 つである *Rbl2* の転写レベルが減少した (Cobrinik et al., 1996; Cobrinik, 2005)。しかしながら、非発がん肝毒性物質である PMZ も、7

日目の時点で *Rbl2* の転写レベルの減少をもたらしており、投与開始後 28 日目より早い時期における *Rbl2* の発現減少は発がん物質特異的なものではないことが示唆された。PMZ は 28 日目の時点で増殖活性の亢進を示したが、この時点において *Rbl2* の転写レベルの減少は生じなかった。これらの結果から、肝発がん物質特異的に G₁/S チェックポイント機能の破綻をもたらされることで、G₁ 期にとどまらず S 期に進行してしまう細胞が増加し、それは反復投与開始後 28 日目で生じることが示唆された。*Rbl2* の発現減少は人の乳癌や子宮内膜癌で認められている (Milde-Langosch et al., 2001)。本研究では、肝発がん物質反復投与により投与開始後 3 日目から、p53 カスケードの下流に存在し、Rb 蛋白および p53 の分解を促進する *Mdm2* (Bhattacharya and Ghosh, 2014; Honda et al., 1997; Uchida et al., 2005) の発現増加および増加傾向を示した。肝発がん物質はさらに投与開始後 3 日目から、活性化型であり細胞質から核内に移行することで p53 を分解するリン酸化 Mdm2 (Ser166) (Malmlöf et al., 2007; Mayo and Donner, 2002) に陽性を示す肝細胞数の増加が、*Mdm2* の mRNA 発現増加と同様に認められた。一方で、非発がん物質である APAP および PMZ も 7 日目においても p-Mdm2 陽性細胞数の増加が認められたが、28 日目では認められなかった。投与開始後 28 日目では肝発がん物質特異的に *Mdm2* の mRNA 発現と核内におけるリン酸化 Mdm2 の発現を増加させ、素の活性化による p53 や Rb 蛋白の分解の促進が示唆された。p53 は遺伝子の損傷にตอบสนองして発現が増加し、損傷を修復するために p21^{Cip1} などの分子を誘導することで G₁ 期において細胞周期を停止させる (Bartek and Lukas, 2001; Speidel, 2015)。本研究では、肝発がん物質特異的に p21^{Cip1} 陽性細胞の増加とともに p21^{Cip1} をコードする *Cdkn1a*、*Bra1* に活性化され DNA 損傷を修復する *Brcc3* (Chen et al., 2006) と DNA 損傷にตอบสนองする G₂/M 期チェックポイント遺伝子である *Chek1* (Patil et al., 2013) の mRNA 発現を増加させており、p53 の分解促進に関連して DNA 損傷の蓄積が生じたことが考えられた。

別添 4

また、3日目および7日目の時点では、MEG、TAA および PMZ はいずれも M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子の mRNA 発現を減少させるか変化させなかった。一方、28日目の時点で MEG は *Aurkb*、*Bub1*、*Mad2l1* および *Plk1* の発現を、TAA は *Aurka*、*Aurkb*、*Mad2l1* および *Plk1* の発現を増加させたが、PMZ はこれらの遺伝子の発現を増加させなかった。M 期スピンドルチェックポイントは有糸分裂時に染色体の不接合が生じた際に、全ての動原体が有糸分裂紡錘体と結合するまで細胞周期を停止させ、娘細胞に染色体の異数性が生じないようにしている (Weaver and Cleveland, 2005)。M 期関連遺伝子の過剰発現は、乳がんや膀胱癌、胃癌などのがんでは認められ、この過剰発現は染色体不安定性や悪性化に関連していると考えられている (Honma et al., 2014; Yamamoto et al., 2006; Yuan et al., 2006; Zhang et al., 2012)。本研究で示された M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子の mRNA 発現増加は、M 期スピンドルチェックポイント機能が破綻した細胞の増加に加え、染色体の異常を是正するために M 期で細胞周期が停止している細胞が増加していることが考えられた。

(2) 肝発がん物質・肝発がんプロモーターの最大 90 日間反復投与での反応性の検討

28 日間で細胞増殖亢進を誘導する肝発がん物質を陽性対照として、動物用医薬品のうち肝発がん性が疑われる物質と肝発がんプロモーション作用を示す物質の 7、28 ないし 90 日間反復投与を実施し、免疫組織化学的解析を行った。その結果、投与開始後 7 日目では発がん物質特異的な反応は認められず、陽性対照物質である MTP および TAA は 28 日目以降で、細胞増殖活性の亢進とともに p-Histone H3、TopoII α および Ubd 陽性細胞数の増加とアポトーシスの増加を示し、今回検討した分子群の発がん物質に対する反応性が確認された。しかしながら、動物用医薬品で発がん性が指摘されている CRB および LMG、肝発がんプロモーターである BNF および OX では最長 90 日間の反復投与によっても反応性を示

さなかった。今後は、今回検討した物質のうち、細胞増殖誘導性に乏しい発がん物質およびプロモーターを用いて、発がんイニシエーション後の発がん促進早期での解析を行い、通常の投与では細胞増殖活性の亢進を伴わない場合での反応性の検討を行う。

(3) 腎発がん物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与における腎臓での反応性の検討

肝発がん物質の 28 日間反復投与によって生じた細胞周期制御異常の異なる標的臓器間での普遍性を検討する目的で、腎発がん物質と非発がん腎毒性物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与を実施し、免疫組織化学的解析を行った。その結果、投与開始後 3 日目では、腎発がん物質である NFT および TCP と非発がん腎毒性物質である CBX により腎尿細管上皮細胞の増殖活性が亢進し、7 日目では NFT および TCP のみで増殖活性が亢進した。28 日目では、腎発がん物質である NFT、ADAQ および TCP と非発がん腎毒性物質である CBX で増殖活性の亢進が認められた。その中で、ADAQ と TCP のみが TopoII α および Ubd 陽性細胞数の増加を示したが、NFT では p-Histone H3 陽性細胞数のみの増加を示した。いずれの腎発がん物質もアポトーシスの増加を示さなかった。さらに、28 日間の反復投与によって増殖活性の亢進が認められた、これらの群について免疫二重染色による解析を行った結果、ADAQ、TCP では、Ubd 陽性細胞での p-Histone H3 の発現割合が減少したが、NFT、CBX では変動を認めなかった。このことは、腎発がん物質である ADAQ および TCP では 28 日間反復投与により M 期にある Ubd 陽性細胞の減少を誘発していることを示唆しており、肝発がん物質の 28 日間反復投与と同様に M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を伴いながら増殖活性の亢進の生じている可能性が考えられた。しかし、これらの物質では p-Histone H3 の発現細胞やアポトーシスが増加していないことから、細胞周期障害性は強くないと判断された。一方、NFT は投与初期から持続的に細胞増殖活性を亢進するものの、28 日目では Ubd の異常発現を示さないことより、細胞周期障

別添 4

害性を伴わない発がん機序が推定された。

E. 結論

平成 25 年度に、肝発がん物質ないし肝毒性物質の投与初期に誘発される細胞増殖亢進時および、肝部分切除による再生性増殖時に生じる細胞周期関連分子発現の変動を経時的に解析した結果、28 日間反復投与によって、肝発がん物質では増殖活性の亢進に M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を伴う可能性が示唆された。平成 26 年度は、平成 25 年度に用いた材料を用いて更に解析を進めた結果、肝発がん物質特異的に G₁/S 期チェックポイント遺伝子である *Rbl2* の発現減少、Rb 蛋白や p53 の分解を促進する *Mdm2* 遺伝子の発現増加およびリン酸化 *Mdm2* 陽性細胞の増加、DNA 損傷関連遺伝子の発現増加が見出され、このことから、肝発がん物質では、28 日間投与により M 期スピンドルチェックポイント機能のみならず G₁/S 期チェックポイント機能も破綻させることが示唆された。また、肝発がん性が指摘されている動物用医薬品と肝発がんプロモーター物質の 7、28 ないし 90 日間反復投与例での解析の結果、細胞増殖誘導性に乏しい肝発がん物質・プロモーターは最長 90 日間の反復投与によっても反応性を示さず、28 日間以上の長期投与による有効性は見出せなかった。さらに、腎発がん物質では、28 日間の投与により *Ubd* の発現異常を伴う細胞増殖活性の亢進を示すものの、細胞周期障害性は強くないものや、細胞周期障害性を伴わない発がん機序を推定させるものがあると判断された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura, M., Abe H., Mizukami, S., Tanaka, T., Itahashi, M., Onda, N., Toshinori, Yoshida T., Shibutani, M.: Onset of hepatocarcinogen-specific cell proliferation and cell cycle aberration during the early stage of repeated

hepatocarcinogen administration in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 2015 (印刷中).

2. 学会発表

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラットの肝発がん物質投与初期での細胞増殖活性と細胞周期制御分子発現の関連性に関する解析、第 41 回日本毒性学会学術年会、神戸、2014. 7. 2-4

Masayuki Kimura, Hajime Abe, Takeshi Tanaka, Megu Itahashi Ayako Shiraki, Sayaka Mizukami, Toshinori Yoshida, Makoto Shibutani: Early time response of liver cells to facilitate cell cycle aberration by treatment with hepatocarcinogen in rats. 2nd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, Berlin, 2014. 8. 27-30

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラットへの肝発がん物質投与初期での肝臓における細胞増殖活性と細胞周期制御分子発現の変動、第 29 回発癌病理研究会、いわき、2014. 9. 1-2

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラットの肝発がん物質投与早期から生じる細胞周期の促進と制御異常の出現時期の検討、第 158 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014. 9. 9-12

木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラット 28 日間反復投与における発がん予測指標分子の肝発がん物質・プロモーターに対する 90 日間反復投与での反応性、第 31 回日本毒性病理学会学術集会、東京、2015. 1. 29-30

木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラット 28 日間反復投与における発がん予測指標分子の肝発がん物質・プロモーターに対する 90 日間反復投与での反応性、平成 26 年度「個体レベルでの

別添 4

がん研究支援活動」ワークショップ、滋賀、2015. 2.

5-6

2. 実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

3. その他