

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
—肝発がん促進シグナルの解析—

分担研究者 吉田 敏則 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 准教授

研究要旨

我々はこれまでに薬物代謝酵素誘導剤 (CYP inducer) により産生される活性酸素種(ROS)が肝発がん促進過程に関与する可能性を示してきた。しかし、CYP inducer であってもミクロソームで ROS を産生しない場合や ROS 産生が酸化ストレスの増強に繋がらない場合でも肝発がん促進作用が見られることがあり、その機序は明確になっていない。そこで今回、非ミクロソーム ROS 産生源である NADPH oxidase (NOX)に着目して、ラット肝発がん促進過程において細胞増殖亢進を来たす非遺伝毒性発がん機序への NOX の関与を検討した。ラット肝二段階発がんモデルを用い、*N*-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週間からプロモーターとして malachite green (MG)を単独あるいは NOX 阻害剤(Apocynin; APO ; 飲水投与)あるいは抗酸化剤(酵素処理イソクエルシトリン ; EMIQ ; 飲水投与)と併用して混餌投与を 8 週間行った。試験期間中、高 NOX 環境を構築するため高脂肪飼料を給餌した。プロモーター投与 1 週間後に定法に従い部分肝切除を行った。投与期間終了時に血液を採取し、血液生化学的検査を実施すると共に、肝臓を採取し、病理組織学的検索並びに免疫組織化学的解析を行った。血液生化学的検査により全群に高脂血症が確認された。肝臓の検索の結果、MG 投与により肝前がん病変指標の glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞集数が増加し、GST-P 陽性巢内の Ki-67 陽性細胞率および active caspase-3 陽性細胞率が増加傾向を示した。APO の併用によりそれらの増加は抑制ないし抑制傾向を示した。NOX 複合体の構成成分である p22^{phox}、p47^{phox} 及び NOX4 の発現を検討したところ、GST-P 陽性巢内の p22^{phox} 及び p47^{phox} 陽性細胞率が APO 投与により抑制ないし抑制傾向を示した。NOX4 の発現に投与の影響はなかった。以上より、MG による肝前がん病変形成には NOX、特に p22^{phox} の関与が示唆された。

A. 研究目的

動物医薬品などの化学物質は、生体内に摂取されると、肝臓における第 I 相の酸化を触媒する cytochrome P450 (CYP)により親電子性の反応代謝物に変換され、これによる蛋白、脂質、核などに対する様々な分子学的異常が肝発がんの発生に関連することが古典的に知られている。分担研究者の所属する研究グループでは、薬物代謝酵素誘導剤（以下、CYP inducer という）による CYP の誘導がミクロソームにおける活性酸素種(ROS)の産生増加およびそれによる酸化ストレス発現を惹起することにより肝発がん促進作用を示すことを報告してきた(Kuwata et al., 2011; Shimamoto et al., 2011; Morita et al., 2011; Tawfeeq et al., 2011; Hayashi et al., 2012)。しかし、CYP inducer であってもミクロソームで ROS 産生しない場合や ROS 産生が酸化ストレスの増強に繋がらない場合でも肝発がん促進作用が生じるなど、CYP 誘導、ROS 産生および酸化ストレスが必ずしも分子学的連動

性を示さないことも明らかとなり、ROS に曝露された肝細胞の細胞増殖機序に繋がる新たな視点からの分子細胞学的機序の解明が求められている。

細胞内における ROS 産生源としてミクロソームやミトコンドリアが広く知られているが、膜蛋白である NADPH oxidase (NOX)と発がんとの関連性が近年、注目されている (Block and Gorin, 2012)。NOX2 (gp91^{phox}) が好中球やマクロファージなどの貪食細胞における抗菌作用を担う中心的な分子として 1999 年に報告されて以来、NOX2 のホモログ (NOX1、3、4、5 並びに DUOX1 および 2) が相次いで発見され、がん細胞における ROS 産生源としての役割が明らかになりつつある。一部の NOX の触媒サブユニットは細胞膜に加えて、小胞体、ミトコンドリアおよび核膜にも分布し、当初の概念よりも幅広く分布かつ機能していることが明らかとなっている (Choi et al., 2015)。さらに、NOX は調整サブユニットとして細胞膜成分 (p22^{phox}) と細胞質成分 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox},

Rac 1) を合わせ持ち、これら触媒および調整サブユニットの種々の組み合わせにより NOX 複合体が構成され、様々な細胞において標的分子の酸化反応を調節している。

一般に、NOX は NADPH を基質として酸素一分子よりスーパーオキシドを産生し、superoxide dimutase により過酸化水素とし、Fenton 反応などを介してヒドロキシラジカルを産生し、また、好中球由来の myeloperoxidase の作用により次亜塩素酸を産生する (Kalyanaraman, 2013)。NOX はこのような ROS 産生源であると同時に細胞内情報伝達因子としての役割も担い、貪食細胞以外の実質細胞においても、TGF- β 1 (Boudreau et al., 2012)、NF κ B (Wang et al., 2011)、Wnt/ β -catenin (Kato et al., 2012)あるいは PI3K/Akt (Huang et al., 2012)などを介して、腫瘍細胞の増殖やアポトーシスの抑制、血管新生、浸潤、転移など、がんの進展に関わる主要経路として機能していることが示されている (Block and Gorin, 2012)。

肝臓において NOX の関与を示す病態としてエタノール誘発性のアルコール性肝障害 (Thakur et al., 2006)、虚血・再灌流モデル (Liu et al., 2008) および脂肪性肝疾患モデル (Chatterjee et al., 2012) が知られており、クッパー細胞の活性化に伴い NOX を介した ROS 産生が亢進することで病態が進行することが示されている。脂肪性肝疾患モデルは動物に高脂肪飼料を与えることで NOX の発現増加に関連して脂質過酸化を増加させ (Matsunami et al., 2010)、NOX 阻害剤である apocynin (APO) 投与により肝脂肪化が軽減することも明らかとなっている (Lu et al., 2006)。高脂肪食摂取による脂肪肝は非アルコール性脂肪性肝疾患と呼ばれ、非アルコール性脂肪肝炎やそれに続く肝線維症を経て肝臓がんになる進行性疾患として知られており、近年その発生頻度の増加がヒトの肝臓がんのリスクとなることが懸念されている (Sheedfar et al., 2013)。NOX が関連する化学物質投与の影響としては、peroxisome receptors-activated receptor α (PPAR α) の agonist で

ある Wy-14643 がクッパー細胞における NOX 介在性の ROS 産生により肝細胞の初期細胞増殖を誘導することが p47^{phox} の null マウスを用いた実験により示されている (Rusyn et al., 2000)。しかし、同様の実験系を用いた Wy-14643 の長期間暴露における検討では NOX に関連した細胞増殖の増加は明らかとなっておらず (Woods et al., 2007)、また、PPAR α agonist 以外の化学物質誘発性の肝臓がん過程における NOX の関与は検討されていないため、化学臓がんにおける NOX の関与についての戦略的な研究推進が期待される。

本事業の 25 年度の研究において、CYP1A および CYP2B inducers である piperonyl butoxide (PBO) をラット肝二段階発がんモデルに適用して検討したところ、NOX の関与する前癌病変の形成は検出できなかった。PBO 投与による NOX 関連遺伝子の発現が検出できなかった理由とし、PBO そのものが NOX 誘発性を有しなかった可能性に加え、標準的なラット肝二段階発がんモデルでは、試験系や観察期間を含め NOX 関連分子の変動をとることが難しかったことが挙げられる。従って、NOX の発現の高い肝内環境を設定するなどの実験系の改善が必要であると考えられる。このような背景を鑑み、NOX 高発現環境下において被験物質の肝臓がん性を検討することで、NOX の関与する肝臓がん促進過程を明確化できることを仮説とし、本年度は脂肪肝モデルをラット肝二段階発がんモデルに適用し、肝臓がん物質である malachite green (MG) による肝臓がん促進作用における NOX 阻害剤の併用投与による細胞増殖、アポトーシスならびに前がん病変形成に与える影響について検討した。

B. 研究方法

動物実験

6 週齢の雄性 F344 ラットを用い、脂肪肝モデルを併用した二段階発がんモデルによる発がんプロモーション実験を行った。試験開始時にイニシエーターである *N*-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔

内投与し、2 週後から MG を単独 (100 ppm)あるいは NOX 阻害剤 (Apocynin; APO, 2000 ppm)あるいは抗酸化剤 (酵素処理イソクエルシトリン; EMIQ, 15,000 ppm) と併用して混餌投与を 8 週間行った。試験期間中、高脂肪飼料 (D12451, Natural Diet 社製) を動物に給餌し、対照群には高脂肪飼料のみを与えた。動物は定法に従い、試験 3 週目に 2/3 部分肝切除を行った。MG は、DEN 飲水投与ラットで肝プロモーション効果を示した用量を設定した (Sundarrajan et al., 2000)。APO (Chirino et al., 2008) および EMIQ (Hara et al., 2014) もすでに報告のある投与用量を設定した。試験期間中、動物の体重、摂餌量および飲水量を毎週測定した。

投与期間終了後、イソフルランの深麻酔下にて血液を採取後、放血致死させ、肝臓を採取し、重量測定を行った。最終体重をもとに相対肝重量を算出した。血液より血漿を分離して血液生化学検査に供した。血液生化学的検査項目として、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、グルコース (GLU)、総コレステロール (T.CHOL) およびトリグリセライド (TG) を測定した。一部の肝臓は病理組織学的・免疫組織化学的の検索用に 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋を行った。

病理組織学的検査および免疫組織化学染色に対する解析

組織学的検索は薄切後にヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。さらに、ラット肝増殖性病変に陽性を示す glutathione-S-transferase placental form (GST-P) 並びに細胞増殖活性マーカーである Ki-67、アポトーシスマーカーである active caspase-3、cytochrome b-245 light chain (p22phox)、p47phox 並びに NOX4 の免疫組織化学染色による観察を実施した。免疫組織学的染色については、次の手順で行った。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、Ki-67 および p22phox については、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、active caspase-3 については、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に浸漬し、オートクレーブ 121°C で 10 分間に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 (50 倍希釈; Dako, Denmark)、ウサギ抗 cytochrome b-245 light chain 抗体 (200 倍; Bioss Inc., Woburn, MA, USA)、ウサギ抗 cleaved caspase-3 (300 希釈; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) 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。残りの NOX 複合体関連分子として抗 p47phox 抗体 (1000 倍; Bioworld Technology, MN, USA) および抗 NOX4 抗体 (1000 倍; Bioworld Technology, MN, USA)、前がん病変指標としてウサギ抗 GST-P 抗体 (1,000 倍希釈; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Japan) を用いた。p47phox、NOX4 および GST-P の染色手順は上記に準じたが、抗原賦活処置は行わなかった。GST-P 陽性前がん病変は以前の報告と同様に (Hara et al., 2014)、直径 0.2 mm 以上の病変数と面積、そして肝臓の総面積を計測し、単位面積当たりの数および面積を算出した。Ki-67、active caspase-3、p22phox、p47phox および NOX4 陽性肝細胞は GST-P 陽性巣の内部、Ki-67 および active caspase-3 陽性肝細胞はランダムに選んだ GST-P 陽性巣以外の領域の 1000 個以上の肝細胞当たりの百分率を求めた。

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。すべてのデータについて多群間比較を用い、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。有意差が認められた場合は Tukey's multiple comparison test を行った。Bartlett 検定で等

分散でなかった場合、Steel-Dwass multiple comparison test 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

試験期間中、肝部分切除に起因して対照群の2匹、MG+APO 併用投与群で1匹が死亡した。MG+APO 併用群の動物の死亡はMGあるいはAPO 処置による影響ではなかった。MG 単独および併用群において、対照群と比較して、試験期間中および剖検時に体重に有意な変化は認められなかった (Table 1)。絶対及び相対肝重量は対照群と比較して、MG 単独および併用群において増加傾向を示し、相対重量は EMIQ 併用群において有意に増加した。

血液生化学検査では対照群に比べ、MG 単独群において ALP および T.CHOL が有意に減少した。EMIQ 併用群では、MG 単独群と比較しても両項目が有意に減少した。EMIQ 併用群では、MG 単独群と比較して TG の低下傾向がみられた (Table 2)。正常値と比較すると (Kojima et al., 2009)、本試験の対照群の TG および T.CHOL はそれぞれ 7.5 倍および 2 倍の高値を示していた (TG の正常値 42 ± 8 mg/dL に対し本試験の対照群 316 ± 128 mg/dL ; T.CHOL の正常値 44 ± 2 mg/dL に対し本試験の対照群 90 ± 10 mg/dL)。

病理組織学的解析では、各群において変異肝細胞巣 (明細胞性、空胞性、好酸性及び好塩基性) が認められた。肝細胞脂肪化が種々の程度 (軽度から中等度) に発生したが、明らかな群間の差はなかった。免疫組織化学的解析では、対照群に比

べ、GST-P 陽性肝細胞巣の数が MG 単独群、APO 併用群および EMIQ 併用群では有意に増加したが、APO 併用群においては MG 単独群と比較し、有意に減少した (Fig. 1)。GST-P 陽性巣の面積に有意な変化はなかったが、MG 単独群では対照群に比べ増加傾向を示し、APO 併用群については対照群と同程度に留まった。EMIQ 併用群は MG 単独群と同程度であった。GST-P 陽性巣内の肝細胞の Ki-67 陽性細胞率は、有意な変動はなかったものの、MG 単独群では対照群に比べ、増加傾向を示した (Fig. 2)。APO 併用群については対照群と同程度に留まった。GST-P 陽性巣以外の肝細胞の Ki-67 陽性細胞率には各処置の影響はみられなかった。GST-P 陽性巣内の肝細胞の active caspase-3 陽性細胞率も対照群と比較し MG 単独群で増加傾向を示し、APO 併用群において増加抑制が見られた (Fig. 3)。EMIQ 併用群では、対照群および APO 併用群に比べ、有意に増加した。GST-P 陽性巣以外の肝細胞の active caspase-3 陽性細胞率にも同様の影響が見られた。NOX 複合体の構成成分である p22phox、p47phox 及び NOX4 の発現を検討したところ、GST-P 陽性巣内の p22phox 及び p47phox 陽性細胞率に MG 投与の明らかな影響はなかったが、APO 投与によりそれらは有意な抑制ないし抑制傾向が認められた (Table 3, 4)。NOX4 の発現に明らかな投与の影響はなかった。

D. 考察

脂肪肝モデルを肝二段階発がんモデルに適用したところ、ラットは明らかな高脂血症を示し、肝臓には軽度から中等度の脂肪化が観察された。これにより脂肪肝モデルが成立していることが確認された。肝二段階発がんモデルにおいて高脂肪飼料を適用した研究はこれまで報告がないが、高脂肪飼料を無処置ラットに与えて継続的に観察した研究では、肝臓の脂肪化は摂取開始 2 週後に正常の 2 倍程度に増加し、その後、6 週ごろまでにいったん減少し、17 週までにわずかに増加することが報告されている (Gauthier et al., 2006)。また、肝

臓の脂肪化についてラットの個体差も同時に観察されている。従って、今回観察された脂肪化の程度は摂取期間（8週間）を反映したものであり、軽度から中等度の脂肪化のばらつきはおそらく脂肪代謝の差に起因した個体差を反映したものと考えられる。また、肝臓における明らかな炎症性変化は認められないことから非アルコール性脂肪肝炎の前段階である非アルコール性脂肪性肝疾患の病態を再現していると判断される。

今回、被験物質として用いた MG は緑色の合成色素で、工業的に繊維等の染色に使用され、また、抗菌活性を示すことから、水産業において水カビ病の治療薬等として広く使用されていた (Srivastava et al., 2004)。しかし、発がん性が懸念されているため、欧州等の諸外国において養殖水産動物への使用は禁止されている。米国 National Toxicology Program (NTP) で実施された MG に対するラットの 2 年間発がん性試験では、雌において肝細胞腺腫及び甲状腺濾胞細胞腺腫・腺癌、乳腺腺癌の発生頻度に軽度の増加がみられている (Culp, 2004)。遺伝毒性については、一部の in vitro 試験で陽性の結果が得られているが (Fessard et al., 1999)、in vivo 試験では陰性であるため (Mittelstaedt et al., 2004) MG が遺伝毒性を有する可能性は否定できないものの、明らかな DNA 損傷を誘発する遺伝毒性物質との結論は得られていない。また、MG は肝細胞の空胞化を増加させるが、肝細胞の肥大が認められないことから (Cul et al., 1999)、薬物代謝酵素誘導との関連性を示さない発がん性機序を示す化合物と位置づけられる。そこで、本事業の目的に則して非ミクロソーム ROS 産生源である NOX に着目して肝前がん病変の検討を行った。

その結果、GST-P 陽性巢の数と面積、Ki-67 陽性細胞率、active-caspase 3 陽性細胞率はいずれも MG により増加あるいは増加傾向を示した。NOX を介した薬物代謝非依存的な ROS 産生と全般的な ROS 産生の影響を確認する目的で、APO や EMIQ の併用効果を検討した。前がん病変、細胞増殖お

よびアポトーシスに対する APO による増加抑制が見られ、MG による肝発がん促進機序には NOX の関与を示唆する結果が得られた。これに関連して、NOX 複合体の構成成分である p22phox、p47phox 及び NOX4 の発現を免疫組織化学的に検討したところ、GST-P 陽性巢内の p22phox 及び p47phox 陽性細胞率が APO 投与により抑制ないし抑制傾向を示した。p22phox は NOX1、2 および 4 の構成分子であり、p47phox は NOX1 および 2 の構成分子であるが (Block and Gorin, 2012) 比較的明瞭な結果は p22phox の免疫染色反応から得られた。以上より、NOX 分子、特に p22phox が MG による肝前がん病変の形成に関与している可能性が考えられた。

APO (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) は *Apocynum cannabinum* や *Picrorhiza kurrora* などの植物の茎から分離、抽出された免疫調整物質であり、貪食細胞や非貪食細胞の NOX 活性を抑制することが報告されている (Stefanska and Pawliczak, 2008)。その抑制機序は完全には解明されていないが、p47phox の細胞膜への移行阻害と考えられており、 H_2O_2 や MPO の作用により形成された APO ラジカル (APO の 2 量体を含む) が p47phox の thiol 基を酸化することによると考えられている。今回、APO による MG の肝発がん抑制効果に関連して、有意差は認められないものの、p47phox の発現変動が捉えられた。さらに、今回の研究では、APO による p22phox の発現抑制も明瞭に検出できたことから、p22phox の発現にも APO が関与していることも示唆された。

EMIQ は抗酸化作用を持つケルセチンの配当体であり、ケルセチンに比較して水への溶解性が高く、体内への吸収性が大幅に改善されていることからその用途が広がっている (Valentova et al., 2014)。これまでの我々の研究グループでは、EMIQ は薬物酵素誘導剤である oxfendazole (Nishimura et al., 2010)、piperonyl butoxide (Hara et al., 2014) および phenobarbital (Morita et al., 2011) (いずれも CYP1A/2B 誘導剤) β -naphthoflavone (CYP1A 誘

導剤) (Shimada et al., 2010; Kuwata et al., 2011)に加え、非酵素誘導剤である thioacetamide (Fuji et al., 2013)の肝発がんプロモーション作用を抑制することを報告している。抑制機構として GST-P 陽性巢内におけるアポトーシスの誘導 (Fuji et al., 2013)や細胞増殖活性の抑制 (Hara et al., 2014)、さらに、炎症反応に関連した酸化ストレスの抑制 (Shimada et al., 2010; Kuwata et al., 2011)が示唆されている。本研究において、EMIQ は GST-P 陽性巢内での p22phox の発現を抑制することが新たに明らかになった。ケルセチンの酸化ストレスに対する抑制機構として、ミトコンドリアの ROS 産生や xantine oxidase の抑制が知られているが、ケルセチンに糖付加された代謝物では NOX の抑制効果も指摘されている (Jones et al., 2012)。従って、この代謝物に類似すると考えられる EMIQ についても NOX 抑制剤として機能を有することが示唆される。しかしながら、今回の研究では、MG の肝発がん促進過程に対しては EMIQ は抑制効果を示さず、NOX 発現と GST-P 陽性巢の増加を繋ぐ機序が必ずしも明確でないことも示していた。EMIQ は本実験において高脂血症を抑制していることから、脂肪化と NOX の関連性を示す新たな知見として注目された。

本モデルを遂行するにあたり、幾つかの問題点も浮き彫りになった。高脂肪飼料は通常の粉末飼料と比較し (Hara et al., 2014)、ラットの摂餌量が低下した (通常飼料 12.2 ± 0.3 g/rat/day に対し、高脂肪飼料 9.5 ± 3.4 g/rat/day)。これは、げっ歯類の嗜好性に加え、高カロリー食を摂取するため、通常よりも低い摂餌でカロリーの摂取が充足されたことが原因と考えられた。そのため、混餌投与した MG の検体摂取量が想定よりも低くなり、肝発がんプロモーション作用が軽度に留まったと考えられた。NOX 関連分子の免疫染色では GST-P 陽性巢内の免疫反応陽性像は比較的明瞭に捉えられたが、GST-P 陽性以外の肝細胞においては染色性の

ばらつきがあり解析が困難であった。また、p48phox および NOX4 では細胞質のみならず、核においても陽性反応がみられたが、その発現分布と GST-P 陽性巢との関連性は見いだせなかった。少なくとも NOX4 は核膜において発現し、NOX4 誘導 ROS 産生が DNA 傷害に関与することが示唆されていることから (Block and Gorin, 2012)、核における NOX 発現の発がんに対する意義が今後の検討課題と考えられた。

E. 結論

肝発がん促進過程における NOX の関与について高脂肪食を適用したラット肝二段階発がんモデルを用いて検討した結果、MG の発がん促進作用は NOX 阻害剤により抑制され、前がん病変形成過程における NOX 関連分子 p22phox の関与が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし