

## 前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発

分担研究者 鈴木 周五 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 研究員

### 研究要旨

前立腺発がんリスク評価のための短・中期発がんモデル樹立を目的にラットを用いて検討した。我々は以前に、前立腺発がん物質である PhIP, DMAB を投与したラットにおいて、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 発現が有意に上昇することを見いだした。一昨年と昨年度に渡り、前立腺発がん物質あるいは前立腺以外に標的性を示す発がん物質をラットに投与し、前立腺および他の臓器における発がん性の臓器特異性について、それぞれの臓器における $\gamma$ -H2AX, HMGB2, Ki-67 標識率を検討し、HMGB2, Ki-67 については、発がん標的臓器において有意な上昇を認め、前立腺を含む臓器特異的な発がん指標となり得ることを示した。今年度は、初期だけでなく腫瘍形成後の発がん後期においても発現が存在するかを検討した結果、PhIP および DMAB により発生した腫瘍で、HMGB2, Ki-67 標識率が周囲正常上皮よりも有意に高いことを示した。また、ヒト前立腺癌においても、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2, Ki-67 標識率の有意な上昇を確認した。一方、毒性や発がん性評価において経口投与が一般的であり、動物モデル開発には経口投与での評価が重要となる。今回用いている前立腺発癌物質 DMAB および MNU は別経路で投与されており、経口投与にした場合にも、発がん性が検出可能であるかを検討した。結果、一部標識率の差があるものの、全体としては投与方法の差よりもそれぞれの化学物質に特異的な標識率を示し、被験物質が経口投与で行った場合でも問題ないことを示した。

### A. 研究目的

前立腺癌は世界的に男性癌の中で4番目に多い腫瘍で、日本でも2020年には肺癌について2番目の罹患率になると予測されており、増加率が一番高いがんである。前立腺がんの原因については未だ不明な点が多いが、食事要因がその発症に深く関与していることが示唆されている。前立腺がんの発症を予防するにはその発がん因子を同定して、それらの摂取を極力抑える事が重要であると考えられ、環境中の発がん因子を同定するための短・中期発がんモデルが必要である。

発がんモデルではがん、あるいは前がん病変を指標にする事が一般的であるが、ラットの前立腺がんモデルでは前がん病変を惹起するには30-40週、がんでは50-60週必要であり、多数の被検物質をスクリーニングするには効率的ではない。そこで、これらの病変を代替する分子・遺伝子群を抽出・同定し、これらを指標にした前立腺発がんモデルの樹立を試みた。

我々は一昨年度に、前立腺発がん物質である 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) および 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) で、発現上昇を認めた3つの遺伝子、リン酸化ヒストンH2AX ( $\gamma$ -H2AX)、High mobility group box 2 (HMGB2) および Ki-67 について、前立腺発がん物質に対する特異性を検討した

結果、HMGB2 および Ki-67 で比較的良好な結果が得られた。一方、 $\gamma$ -H2AX は標識率が0.02%と低いこともあり、解析範囲による値の変動が大きくなる恐れがあり、検出マーカーとして使用するには不適當である可能性が示唆された。

また、昨年度は上記の前立腺組織において発がん物質検出マーカーとして有益な遺伝子が他の臓器においても同様に用いることが可能であるかを、肝、腎および大腸組織において検討した結果、HMGB2 および Ki-67 標識率は肝、腎組織において比較的有益な結果を得た一方で、 $\gamma$ -H2AX 標識率は対照群で低いこともあり、有意な結果は少なかった。大腸組織においては、HMGB2 が対照群で標識率95%と高く使用困難で、Ki-67 および  $\gamma$ -H2AX いずれも他臓器に比べ良好な結果を得られなかった。

今年度は、これら3つの遺伝子発現について腫瘍性病変が形成された時期においても、上昇しているかをラット及びヒト前立腺腫瘍組織を用いて検討した。また、種々の化学物質の毒性変化を検討する場合、飲水、摂餌および胃内強制投与など、経口投与が主体であるが、DMAB や N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) については、それぞれ皮下や腹腔内投与による発がん試験が主体であり投与方法によっては、発がん性が確認出来ない可能性がある。そこで、等しい用量を別の経路で投与した際に、前立腺発癌に対する上記3つの遺伝

子の発現が同等であるかを検討した。

## B . 研究方法

6週齢 F344 雄ラットに、PhIP 100 mg/kg で週 2 回強制胃内投与を 10 週間行い、60 週齢で屠殺剖検した前立腺腹葉において認められた腫瘍病変、6 週齢 F344 雄ラットに、DMAB 50 mg/kg で皮下に 2 週間に 1 回を 20 週間行い、60 週齢で屠殺剖検した前立腺腹葉において認められた腫瘍病変およびヒト前立腺癌を含む前立腺組織について、免疫組織染色を行い、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

6 週齢 F344 雄ラットに、前立腺発がん物質である DMAB、MNU、前立腺以外の臓器に対する発がん物質として Dimethylnitrosamine (DMN)(標的臓器：肝、腎)、1,2-Dimethylhydrazine (DMH)(標的臓器：大腸)を単回投与した。投与経路は、それぞれ皮下投与(DMAB、DMH)もしくは腹腔内投与(MNU、DMN)とともに、すべての物質に対して胃内強制投与を用いた。投与 2 日後に前立腺、肝、腎、大腸を摘出し、ホルマリン固定および一部は凍結組織を採取した。免疫組織染色を行い、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、名古屋市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。また、ヒト前立腺組織については、名古屋市立大学大学院医学研究科「ヒト遺伝子解析研究倫理審査委員会」で承認された症例を用いて検討し、個人情報保護についても十分に配慮した。

## C . 研究結果

PhIP および DMAB 誘発の前立腺腫瘍性病変において、HMGB2 および Ki-67 標識率は周囲正常前立腺上皮に比べ、有意に上昇した。一方、 $\gamma$ -H2AX 標識率は染色性に問題があり、正常上皮及び腫瘍性病変において差が見られなかった。ヒト前立腺組織においては、正常前立腺上皮に比べ、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 標識率いずれも腺癌で有意な上昇を認めるとともに、組織形態の指標である Gleason grade の上昇に比例して、各標識率の有意な上昇を確認した。

投与経路の違いによる各標識率の違いを検討した結果、一部で異なる標識率が存在するものの、総じて DMAB および MNU 投与による有意な上昇を投与経路に関わらず、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 いずれにおいても認められた。ただし、今回の結果では、Ki-67 標識率が他の 2 つに比べ有意差が乏しい結果だった。一方で、前立腺に標的性のない発がん物質 DMN、DMH いずれも投与方法にかかわらず、

対照群とほぼ同様の標識率だった。

## E . 研究発表

### 1 . 論文発表

外国語論文

- 1) Sato, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Komiya, M., Long, N., Kato, H., Sagawa, H., Yamashita, Y., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. *J Toxicol Pathol*, 27: 43-49, 2014.
- 2) Nakasuka, K., Ito, S., Miyata, K., Inomata, M., Yoshida, T., Tamai, N., Suzuki, S., Murakami, Y., Sato, K., Suzuki, S., Eishi, Y., Morimoto, S.: A case of idiopathic giant cell myocarditis with a past history of sarcoidosis. *J Card Cases*, 9: 35-39, 2014.
- 3) Dodmane, PR., Arnold, LL., Muirhead, DE., Suzuki, S., Yokohira, M., Pennington, KL., Dave, BJ., Lu, X., Le, XC., Cohen, SM.: Characterization of intracellular inclusions in the urothelium of mice exposed to inorganic arsenic. *Toxicol Sci*, 137: 36-46, 2014.
- 4) Oomura, M., Sakakibara, N., Suzuki, S., Wakita, A., Mori, Y., Kamimoto, K.: Intravascular lymphomatosis mimicking primary central nervous system lymphoma: A case report and literature review. *Case Rep Neurol*, 6: 101-108, 2014.
- 5) Arnold, LL., Suzuki, S., Yokohira, M., Kakiuchi-Kiyota, S., Pennington, KL., Cohen SM.: Time course of urothelial changes in rats and mice orally administered arsenite. *Toxicol Pathol*, 42: 855-862, 2014.
- 6) Naiki, T., Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Kawai, N., Tozawa, K., Etani, T., Sato, S., Suzuki, S., Shirai, T., Kohri, K., Takahashi, S.: GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration resistant prostate cancer. *Carcinogenesis*, 35: 1962-1967, 2014.
- 7) Hachiya, K., Wakami, K., Tani, T., Yoshida, A., Suzuki, S., Suda, H., Ohte, N.: Double-valve replacement for mitral and aortic regurgitation in a patient with Libman-Sacks endocarditis. *Intern Med*, 53: 1769-1773, 2014.
- 8) Arima, H., Hirate, H., Sugiura, T., Suzuki, S., Takahashi, S., Sobue, K.: IV injection of polystyrene beads for mouse model of sepsis causes severe glomerular injury. *J Intensive*

Care, 2: 21, 2014.

- 9) Yamashita, Y., Nagasaka, T., Naiki-Ito, A., Sato, S., Suzuki, S., Toyokuni, S., Ito, M., Takahashi, S.: Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. Mod Pathol, 28: 111-117, 2015.
- 10) Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kuno, T., Punfa, W., Long, N., Kato, H., Inaguma, S., Komiya, M., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. J Toxicol Pathol, 28: 21-26, 2015.
- 11) 佐藤慎哉、鈴木周五、内木綾、白井智之、高橋智：前立腺癌に対する HDAC 阻害剤の予防および治療効果の検討。泌尿器外科，27 巻 8 号：1217-1219，2014。
- 12) 佐藤慎哉、内木綾、鈴木周五、高橋智：肝癌の危険因子と発癌機序。その他の化学物質発がん（アフラトキシン、ニトロソ化合物など）。日本臨床，73（増刊号 1）：142-146，2015。

## 2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月、広島。
- 2) 佐藤慎哉、鈴木周五、他、選択的 HDAC 阻害剤による前立腺癌増殖抑制効果の検討、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月、広島。
- 3) 鈴木周五、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月、横浜。
- 4) 鈴木周五、他、Pioglitazone によるラット前立腺発癌抑制効果、第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2014 年 1 月、東京。
- 5) Suzuki, S. et al., Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis、SOT Annual Meeting、2014 年 3 月、San Diego。

## F. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

### 1. 特許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし

