

201438077A

厚生労働科学研究委託費  
革新的がん医療実用化研究事業

化学物質誘発性胆管がんのリスク評価基盤：  
胆管がん発症機構の解明と関連バイオマーカーの探索

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 高田 龍平

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の革新的がん医療実用化研究事業による委託業務として、東京大学が実施した平成26年度「化学物質誘発性胆管がんのリスク評価基盤：胆管がん発症機構の解明と関連バイオマーカーの探索」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
化学物質誘発性胆管がんのリスク評価基盤： 胆管がん発症機構の解明と関連バイオマーカーの探索 -----	1
高田龍平	
(資料) 化学物質誘発性胆管がんのリスク評価基盤： 胆管がん発症機構の解明と関連バイオマーカーの探索	
II. 委託業務成果報告（実施項目）	
1 胆管がんリスク評価モデル構築	
高田龍平	
委託業務成果報告（総括）に一括して記載	
2 胆管がん発生機序の検討	
豊田優	
委託業務成果報告（総括）に一括して記載	
III. 学会等発表実績 -----	86
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	87

厚生労働科学研究委託費  
(革新的がん医療実用化研究事業)  
委託業務成果報告 (総括・業務項目)

研究課題：

化学物質誘発性胆管がんのリスク評価基盤：  
胆管がん発症機構の解明と関連バイオマーカーの探索  
(H26-革新的がん-一般-078)

研究代表者：

○高田 龍平 (東京大学 医学部附属病院 薬剤部 講師)

研究分担者：

○豊田 優 (東京大学 医学部附属病院 薬剤部 客員研究員/  
日本学術振興会特別研究員 S P D)

【研究要旨】

本研究は、工業用化学物質などの外的危険因子への曝露や胆汁成分の変動が胆管がん発症リスクに与える影響を評価し、関連する分子機構を同定することを通じ、胆管がんの発症・進展に関わる分子基盤を解明することを目的とした研究 (3年研究の1年目) である。他のがん種と比べ、胆管がんは難治性であり、早期発見も困難である。そのため、治療成績の向上と予後改善のために、胆管がんリスク因子や発症機構に関する情報集積が焦眉の急である。2012年、印刷事業所での有機溶剤曝露による職業性胆管がんの発生が報告され、国民の関心を広く集めた。我々は、肝臓で代謝されたハロゲン化炭化水素 (1,2-ジクロロプロパン) が胆管側膜輸送体を介した胆汁排泄を受け、胆管内に蓄積する結果、胆管がん発症に至るとの仮説の下、当該化学物質への大量曝露と胆管がん発症の因果関係・裏付けとなる分子機構の解明に取り組んできた。本研究では、遺伝子改変動物やヒト化肝臓マウスを用いた検討の結果、胆汁排泄される胆管がん発がん性候補物質 (グルタチオン抱合ジクロロプロパン) の体内動態規定因子として ABCC2 を見出し、バイオマーカー候補物質として当該物質曝露時に変動する血中成分を見出すことに成功した。また、本研究にて確立した各評価系は種々の工業用化学物質に応用可能である。本研究を通じ、新規胆管がん発症機構のみならず、胆管がんの早期診断に資する技術開発の発展が期待される。

## A. 研究目的

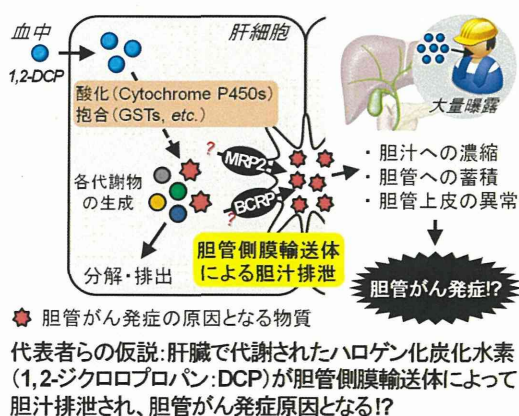
胆管がんは本邦で増加傾向にある難治性のがんであり、その治療成績の向上と予後改善のために、リスク因子や発症機構に関する情報集積が焦眉の急である。この点を鑑み、胆管がん発症に関わる新規分子機構の解明と関連バイオマーカーの発見が望まれている。また、職業がんの予防、労働衛生における発がん性物質の評価と適切な管理は、安全な労働環境整備の上で極めて重要であり、社会的関心の高い厚生労働行政課題の一つである。

2012年、ジクロロプロパンやジクロロメタンを主成分とする有機洗浄剤を大量に扱う印刷工場の従業員が、高頻度で胆管がんを発症していることが報告された（2012年9月21日 日本経済新聞など）。疫学的観点から、ハロゲン化炭化水素への曝露が胆管がん発症の原因であると強く疑われているが、裏付けとなる分子生物学的証拠は見出されていない。

そこで我々は、胆管がんの発症・進展に関わる分子基盤の解明ならびに化学物質誘発性胆管がんのリスク評

価基盤の構築を本研究の目的とし、1,2-ジクロロプロパンをモデル化合物とした詳細な検討を進めることにした。

我々は、「肝臓中にて生じたハロゲン化炭化水素由来代謝物が膜輸送体を介して胆汁中へ排出される結果、胆管内に蓄積し、発がん性を示す」という着想に基づき、ハロゲン化炭化水素による胆管がん発症リスクおよび分子機構を解明する研究に取り組んできた（H25年度 第3次対がん総合戦略研究事業：H25-3次がん-若手-012）。これまでに、ハロゲン化炭化水素のげっ歯類への継続投与が肝がんの発症を誘導することが報告されているが、胆管がん発症を説明するには至っていない。そのため、肝臓と胆管という異なる組織間の物質移動を考慮する必要があるという上述の着想（下図参照）に至った。



先行研究として、1,2-ジクロロプロパンを投与した実験動物の胆汁を用いた網羅的化合物分析ならびに非投与群を対照とするメタボローム差異解析を行った結果、胆汁排泄される発がん性候補物質としてグルタチオン抱合ジクロロプロパンを見出すことに成功した。そこで、本研究計画の初年度にあたる平成26年度においては、この成果をさらに発展させることを狙い、発がん機構に重要であると考えられる発がん性候補物質の体内動態規定因子の同定ならびにヒトへの外挿を目的とした検討を行うとともに、将来的なバイオマーカー候補物質の同定を目的とした評価系の構築と実験動物における血中変動成分の探索を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

1, 2-ジクロロプロパン (1, 2-Dichloropropane, D72182-25G) は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入したものを使用した。2-ブromo-1-クロロプロパン (2-Bromo-1-Chloropropane, 48713) 溶液 (20,000 µg/ml in methanol) は、SUPELCO Inc. (Bellefonte, PA, USA) から購入した。グルタチオン (還元型) は、ナカライテスク株式会社 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) から購入した。エルマン試薬 (Ellman's reagent) (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid), DTNB) およびオリーブ油は和光純薬工業株式会社 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) のものを使用した。Urethane は Sigma-Aldrich Co. から購入し、250 mg/ml となるように生理食塩水に溶解した。アセトニトリル、0.1%ギ酸含有アセトニトリル溶液 (Optima LC/MS グレード) ならびに 0.1%ギ酸水溶液 (Optima LC/MS グレード) はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan) から、

高速液体クロマトグラフィー用メタノールはナカライテスク社 (Nacalai Tesque, Inc.) から購入した。Adenosine Triphosphate (ATP), Adenosine Monophosphate (AMP), Creatine phosphate disodium salt tetrahydrate, Creatine phosphokinase type I from rabbit muscle は Sigma-Aldrich Co. のものを、Leukotriene C4-d5 は Cayman Chemical Co. (10006198, Ann Arbor, MI, USA) のものを用いた。Estradiol 17  $\beta$ -D-Glucuronide [Estradiol-6,7-3H(N)] ( $[^3\text{H}]\text{-E}_2\text{17}\beta\text{G}$ ) は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO) のものを使用した。ABCC2 発現細胞形質膜ベシクルならびにコントロール用膜ベシクルは GenoMembrane Co., Ltd. (Yokohama, Japan) から購入し、使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。

## 2. 動物

FVB/NJcl マウスは、日本クレア株式会社 (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) から購入した。ATP-binding cassette sub-family G member 2 (Abcg2) (別名 Breast cancer resistance protein; Bcrp) 遺

伝子欠損 (KO) マウス (2767 FVB.129P2-*Abcg2*<sup>tm1Ahs</sup> N7) は、Taconic Farms, Inc. (Hudson, USA) から購入後、自家繁殖したものを使用した。SD ラット (Slc:SD, 野生型) および対応する ATP-binding cassette sub-family C member 2 (Abcc2) (別名 multidrug resistance-associated protein 2; Mrp2) 機能欠損動物である EHBR (Eisai Hyperbilirubinemic Rat, EHBR/Eis) については、日本エスエルシー株式会社 (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) から購入したものを使用した。

本研究では、いずれも雄性、6-10 週齢の動物を用いた。飼育環境は、水道水 (東京都水) およびエサ (滅菌済み固形試料 FR-1、日本クレア社から購入) を自由に与え、室温  $25^\circ\text{C}$ 、日照サイクル 12 時間 (明期 8:00-20:00, 暗期 20:00-翌 8:00) とした。

また、マウス肝細胞が正常ヒト肝細胞に置き換えられた PXB マウス (cDNA-uPA<sup>wild+</sup>/SCID) については、株式会社フェニックスバイオ (PhoenixBio Co., Ltd., Hiroshima, Japan) にて作出されたもの (雄性、13-16 週齢) を使用した。

### 3. 1, 2-ジクロロプロパン投与動物 (FVB マウス, Abcg2 KO マウスおよび SD ラット, EHBR) からの試料回収

1, 2-ジクロロプロパンをオリーブ油に溶解し、投与試料溶液とした。所定の濃度に調製した投与試料溶液を、1, 2-ジクロロプロパン投与量が 0 もしくは 500 mg/kg B.W.となるように、100  $\mu$ L/20 g B.W.の条件で、ゾンデを用いた経口投与により実験動物に与えた。前投与として、1日1回の投与を3日間行い、4日目の投与から4時間後に胆汁を回収した。

胆汁採取に先立ち、ウレタン含有生理食塩水を腹腔内へ投与することで実験動物を麻酔下においた。開腹後すみやかに、胆嚢（マウスの場合のみ）ならびに腸管結合部位近辺の胆管を絹製縫合糸にて縛るとともに、ピンセットにて注意深く胆管を露出させた。次いで、露出させた胆管を解剖用ハサミを用いて小さく切開し、テフロンチューブ（Teflon-coated tube, UT-03 type, Unique medical Co., Ltd., Tokyo, Japan）（マウスの場合）もしくはポリエチレンチューブ（PE tubing（PE8040）, Natsume seisakusyo Co. Ltd., Tokyo,

Japan）（ラットの場合）を通じて、胆汁を回収した。胆汁回収後、麻酔下にある各実験動物より全採血を行い安楽死させた。採取した血液を BD Microtainer（Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA）に回収し、遠心（800 $\times$ g, 10分）上清を血清試料とした。また安楽死した実験動物より肝臓を摘出し、素早く凍結保存した。得られた血清および胆汁試料は-80 $^{\circ}$ Cにて、肝臓は液体窒素中にて、それぞれ使用するまで保存した。

### 4. 1, 2-ジクロロプロパン投与 PXB マウスからの試料回収

PXB マウスは株式会社フェニックスバイオにて作出され、群編成日の一般状態と体重から試験利用に問題ないと判断された動物のうち、以下の条件を満たすものを選別した。性別：雄、週齢：12-18 週齢（Day1 の実週齢：16 週齢）、体重：16 g 以上（Day-1 の実測値：20.7-21.6 g）、血中ヒトアルブミン濃度：7.0 mg/mL 以上（Day-7 の実測値：12.3-12.4 mg/mL）、肝細胞ドナー：BD195 (BD Bioscience, Woburn, MA, USA)。



オリーブ油に溶解した 1, 2-ジクロロプロパンを 500 mg/kg B.W.となるように、100  $\mu$ L/20 g B.W.の条件で、ゾンデを用いた経口投与により実験動物に与えた。前投与として、1日1回の投与を3日間行い、4日目の投与は胆嚢カニュレーション施術後に実施した。

投与後4日目の動物にケタミン・キシラジン（ケタミン：KETALAR50, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan; キシラジン：Celactal 2%, Bayer Yakuhin, Ltd., Osaka, Japan）麻酔を施したのち、胆嚢カニュレーションを施術した。プラスチックプレート上に動物を拘束し、動物が麻酔から覚醒したことを確認したのちに被験物質を投与し、胆汁の採取を開始した。採取条件は氷冷下、採取時間は被験物質投与後8時間毎（0-8, 8-16, 16-24）とした。なお、投与後およそ8および16時間に、37 $^{\circ}$ Cに加熱した補液〔生理食塩水：5%グルコース=1：1（v/v）〕を25  $\mu$ L/gの容量で皮下投与した。

胆汁回収後、動物にイソフルラン麻酔を施して開腹し、採血後、安楽死させた。血液試料は、遠心（1000 $\times$ g, 10

分）分離を行い、最大量の血漿を液体窒素中で凍結した。なお、PXB マウスから採取した血液のうち2  $\mu$ Lを血中ヒトアルブミン濃度測定に利用した。また安楽死した実験動物より肝臓を摘出し、素早く凍結保存した。得られた試料は-80 $^{\circ}$ Cにて、それぞれ使用するまで保存した。

## 5. 分析試料の準備

胆汁、血清試料については、4倍量（v/v）のメタノールを加え、十分に混合したのち、遠心分離（15,000 $\times$ g, 15分間, 4 $^{\circ}$ C）によって得られた上清を注意深く回収した。この除タンパク質処理済み試料を測定用試料とした。得られた試料はすみやかに、網羅的成分分析に用いた。

肝臓は20倍量（w/v）の超純水を加え、スタンド型ホモジナイザー（Pyscotron homogenizer, Microtec Co., Ltd., Chiba, Japan）を用いて十分に破碎した。遠心分離（3,000 $\times$ g, 5分間, 4 $^{\circ}$ C）によって得られた上清を回収し、4倍量（v/v）のメタノールを加え、十分に混合したのち、遠心分離（15,000

×g, 15 分間, 4℃) によって得られた上清を注意深く回収した。この除タンパク質処理済み試料を測定用試料とした。得られた試料はすみやかに、網羅的成分分析に用いた。

また、試料を濃縮する場合、遠心濃縮機 (High performance centrifugal concentrator, Sakuma, Tokyo, Japan) を用い、必要に応じた内部標準物質として Leukotriene C4-d5 を加えた除タンパク質処理済み試料を減圧乾固させた。乾固物を 80%メタノール水溶液に再溶解させ、測定試料とした。

## 5. LC-MS/MS 分析

各測定試料は、液体クロマトグラフィーを用いて分離後、質量分析計にて検出した。具体的には、DIONEX Ultimate 3000RS (Thermo Fisher Scientific K. K., Yokohama, Japan) と Thermo Synchronis AQ カラム (2.1×100 mm, 5 u) (Thermo Fisher Scientific K. K.) にて構成される液体クロマトグラフィーを用いて試料を分離後、ベンチトップ型 Orbitrap フーリエ変換質量分析計 Q exactive (Thermo Fisher

Scientific K. K.) を用いてフルスキャン検出ならびに MS/MS スペクトルの取得を行った。これらの詳細な分離条件ならびに検出条件を添付資料 **M-1** に示した。

## 6. メタボローム差異解析

1, 2-ジクロロプロパン投与群と非投与群とにおける胆汁構成成分の違いを見出すためのメタボローム差異解析は、差異解析ソフト SIEVE2.1 (Thermo Fisher Scientific K. K.) を用いて行った。

SIEVE2.1 は、ラベルフリーで差異・変動解析を行うためのソフトウェアであり、指定した全ての生データファイルを比較し、有意な差を自動で検出することを可能とする。本研究では、低分子用アルゴリズムを使用し、フルスキャンマススペクトルデータに対して、アライメントならびにピーク検出を自動で行った。詳細な解析条件を添付資料 **M-2** にまとめた。SIEVE2.1 による差異解析の結果、コントロール群に対し、サンプル群 (1, 2-ジクロロプロパン投与群) にて増加しており、

有意な差異があるピークを選別した。選別したピークについて、Qual Browser ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific K. K.) を用いて、取得されたフルスキャンデータより組成解析を、MS/MS データより構造解析を行った。

### 7. *in vitro* 反応によるグルタチオン抱合ジクロロプロパンの生成

100 mM リン酸カリウム緩衝溶液 (pH 6.5 もしくは 8.0) に、100 mM グルタチオン水溶液 (最終濃度 6 mM) と 1,2-ジクロロプロパンを加え、様々な条件で反応させた (結果の項を参照)。LC-MS/MS 分析により、グルタチオン抱合型ジクロロプロパンの生成を確認したのち、次の方法で脱塩と濃縮精製を行った。

まず、メタノールに続き、リン酸緩衝溶液を用いて Sep-Pak® Vac 35cc C18 Cartridges (Waters, Milford, MA, USA) を活性化した。40 µL/mL ジクロロプロパンおよび 6 mM グルタチオンを含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液を 60°C にて 30 時間反応させた反応混液を準備し、上述のカラムに加え

た。吸引マニホールド (Waters Vacuum manifold, Waters) にて吸引しながら、フロースルー画分を回収後、MilliQ 5 mL にて 10 回溶出した。このうち目的成分を多く含むことを確認した溶出画分を減圧濃縮した。乾固物を超純水にて再溶解することで、濃縮液を得た。

### 8. グルタチオン濃度測定

エルマン試薬 (DTNB) を 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5 に溶解し、終濃度 0.5 mM の反応溶液を調製した。測定用 96 穴プレート (MICROPLATE 96 WELL, PS, F-BOTTOM, CRYSTAAL-CLEAR, Greiner Bio-One, Tokyo, Japan) の各ウェルに超純水で適宜希釈した測定用試料を 10 µL、反応溶液を 150 µL 加え、よく混合した。得られた反応混液を、室温で 10 分間反応させた後に、プレートリーダー (Varioskan flash, Thermo Fisher Scientific K. K.) を用いて 412 nm の吸光度を測定した。濃度既知のグルタチオン水溶液を標準試料として使用し (添付資料 M-3)、測定試料中のグルタチオン濃度を定量した。

## 9. 細胞膜小胞輸送実験

[<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub>17βG (終濃度 100 μM) を含む反応液 (10 mM Tris, 250 mM Sucrose, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP or AMP, 100 mM Creatine phosphate disodium salt tetrahydrate, 100 mg/mL Creatine phosphokinase type I from rabbit muscle : すべて終濃度) を 16 μL 調製し、湯浴にて 37°C に加温した。次いで、4 μL の細胞形質膜ベシクル (20 μg のタンパク質量に相当) を素早く混合し、37°C にて 10 分間、反応させた。その後、氷冷した反応停止液 (250 mM sucrose, 0.1 M NaCl, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) を 980 μL 加え、反応を停止させた。このうち 900 μL を MF-メンブレンフィルター (セルロース混合エステル) (0.45-μm HAWP filter, Millipore Co., Billerica, MA, USA) に通すことで、細胞形質膜ベシクルならびにそこに含まれる放射性同位体標識基質をフィルター上に単離した。さらに、5 mL の氷冷した反応停止液で 2 回洗浄したのち、メンブレンフィルターを回収した。フィルターを 4.0 mL の液体シンチレーションカクテル (PerkinElmer Japan, Yokohama, Japan)

中に加え、完全に溶解したのち、可溶化液中に含まれる放射活性を液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer) を用いて測定した。

各種グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物を対象としたベシクル輸送実験については、30 μL の被験物質濃縮液ならびに 175 μg の細胞形質膜ベシクルを含有する 250 μL の反応混液を調製し、37°C にて 10 分間反応させた。反応停止後、デュラポアメンブレンフィルター (0.45-μm HVLP Durapore hydrophilic PVDF membrane filters, Millipore) に通し、5 mL の氷冷した反応停止液で 2 回洗浄したのち、メンブレンフィルターを回収した。内部標準物質として Leukotriene C<sub>4</sub>-d<sub>5</sub> (添付資料 M-4) を含むメタノール 2.0 mL を加え、ツインミキサーを用いて良く混和した。抽出成分を濃縮するために、メンブレンを取り除いた残液を減圧乾固処理し、乾固物を 80%メタノール水溶液に再溶解させ、測定試料とした。なお、結果の解析に際し、細胞形質膜ベシクルを含まない反応混液を用いて得られた測定値をバックグラウンドとして扱った。

## 10. 統計学的処理

本研究における統計学的解析は Statcel3 ソフトウェア (The Publisher OMS Ltd., Saitama, Japan) を用いて行った。分散の均一性は、Bartlett's test により判定した。独立二群間のパラメトリック検定には Student's t-test を、ノンパラメトリック検定には Mann-Whitney U test を用いた。パラメトリック多重比較検定には、Tukey-Kramer test もしくは Williams' test を、ノンパラメトリック多重比較検定には Shirley-Williams' multiple comparison test を用いた。有意水準は 5% および 1% とし、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

### (倫理面への配慮)

本研究におけるすべての動物実験は東京大学大学院医学系研究科・医学部に設置されている動物実験委員会もしくは株式会社フェニックスバイオ実験動物倫理委員会の承認を得た上で、東京大学大学院医学系研究科・医学部動物実験指針あるいは研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守して実施された。

## C. 研究結果

### 1. 1,2-ジクロロプロパンはグルタチオン抱合を受け胆汁排泄される

我々は、「肝臓中にて生じたハロゲン化炭化水素由来代謝物が膜輸送体を介して胆汁中へ排出される結果、胆管内に蓄積し、発がん性を示す」という仮説の検証を目的として、1,2-ジクロロプロパンならびにその代謝物が胆汁排泄されるかどうかをメタボローム差異解析により検討してきた (厚生労働科学研究費補助金 第3次対がん総合戦略研究事業『有機溶剤含有物質が胆管がん発症をもたらす分子機構の解明』(H25-3 次がん-若手-012)

(研究代表者：高田龍平) 総括研究報告書参照；以下、H25-3 次がん-若手-012 研究報告書とする)。1,2-ジクロロプロパン投与動物群 (C57BL6/J マウスならびに Wistar ラット) の胆汁成分 (サンプル群) を非投与動物群の胆汁成分 (コントロール群) と比較した結果、サンプル群において有意な増加が認められた代謝物として、添付資料 1-1 および 1-2 に示した 13 化合物を見出しており (H25-3 次がん-若手-012 研究報告書参照)、今回新たに添付資

料 1-3 に示した代謝経路を推定した (考察の項参照)。本研究では、1, 2-ジクロロプロパン由来と考えられる塩素原子を構造中に含み、エプスルホニウムイオン型となることで発がん性への寄与が高いと推定される化合物 No.12 ならびに添付資料 1-3 に示した各種グルタチオン抱合型代謝物に着目した解析を進めた。なお、本研究で行われている一連の構造解析はあくまで推定であり、必ずしも正しいとは限らない。また、特に断りがない場合、以下の結果は、移動相 B に 0.1% ギ酸アセトニトリルを用いた ESI-Positive モードによる LC-MS/MS 測定により取得されたものである。

まず、上述した先行研究の結果が異なる系統種でも再現されることを確認するために、FVB/NJcl マウスおよび SD ラットに 1, 2-ジクロロプロパンを投与し、胆汁を回収後、非投与群を陰性対象とする代謝物解析を行った。その結果、各動物種においても同様の代謝物が胆汁排泄されていることを確認することに成功した。一方、1, 2-ジクロロプロパン自体は検出されなかった。1, 2-ジクロロプロパンは脂溶性

が高い物質であり ( $\log P = 1.98$ )、胆汁中に直接排泄されるとは考えにくいことから妥当な結果である。

## 2. グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物の胆汁排泄は胆管側膜輸送体 ABCC2 に依存する

各種 1, 2-ジクロロプロパン由来代謝物の胆汁排泄に関わる胆管側膜輸送体を見出すために、Abcg2/Bcrp KO マウスならびに EHBR (Abcc2/Mrp2 機能欠損ラット) を用いた検討を行った。ABCG2 および ABCC2 は、肝実質細胞の胆管側膜に局在する排出型膜輸送体であり、有機アニオン化合物を輸送することが知られた生理的にも重要な膜輸送体である。1, 2-ジクロロプロパンを用いた検討を行ったところ、Abcg2 KO マウスと野生型マウス (FVB マウス) との間には、各種代謝物の胆汁排泄量に関する有意な違いが見出されなかった (添付資料 2-1~8)。一方、EHBR においては、野生型ラットと比較して No.10 以外のすべての代謝物の胆汁排泄量が有意に低下していた (添付資料 3-1~8)。特にグルタチ

オン骨格を有すると推定された化合物 No.12, No.8, No.7, No.9, No.2 については、顕著な低下が認められた。

さらに詳細な検討を行うために、1, 2-ジクロロプロパン投与 EHBR ならびに野生型ラット (SD ラット) の肝臓中代謝物レベルを比較した。その結果、化合物 No.12, No.8, No.9, No.2 について、EHBR の肝臓における有意な蓄積が認められた (添付資料 4-1~8)。なお、化合物 No.7, No.1, No.10 については有意な違いは見出されず、No.4 については今回の分析条件では検出限界以下であった。

以上の結果は、化合物 No.12, No.8, No.7, No.9, No.2 に関して、EHBR における肝臓中代謝物レベルが野生型ラットと同等もしくはそれ以上であるにも関わらず、EHBR における胆汁排泄量が有意に低下していたことを示している。ABCC2 がグルタチオン抱合体を輸送基質とすることと合わせて考えると、各代謝物が ABCC2 依存的に胆汁排泄されていたことを強く示す結果である。

### 3. ヒト化肝臓 PXB マウスにおいてもグルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物が胆汁排泄される

我々の一連の研究によって見出された 1, 2-ジクロロプロパン代謝物がヒトにおいても胆汁排泄されうることを検証するために、PXB マウスを用いた試験を行った。PXB マウスは、その肝細胞がヒト正常肝細胞に置き換わったマウスであり、肝臓がヒトに近い代謝を示すことから、薬物動態研究においてヒト *in vivo* 予測モデルとして利用されている動物である。本研究で使用した PXB マウスにおける血中ヒトアルブミン濃度は  $11.9 \pm 0.8$  mg/mL であり、肝細胞の置換率は  $84.0 \pm 2.0\%$  と予測された。

1, 2-ジクロロプロパン投与 PXB マウスの胆汁を分析した結果、各グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物が検出された (添付資料 5-1~8)。このことは、これまでの動物実験にて見出された現象がヒトの肝臓でも起きうることを強く示している。なお、1, 2-ジクロロプロパン自体は検出されなかった。このことはこれまでの結果とも一致していた。

各代謝物の胆汁排泄量の経時的変化に着目すると、化合物 No.12, No.8, No.7, No.1, No.9, No.2 については胆汁排泄量の減少が、化合物 No.4 については胆汁排泄量の増加が認められた。MS/MS 情報から推定された構造式に基づくと、化合物 No.12, No.8, No.7, No.9, No.2 はグルタチオン骨格を有する一方で、化合物 No.4 はその代謝物（分解物）であると想定される。そのため、上述した変動傾向は肝臓もしくは胆汁中における代謝・分解の亢進に対応した結果であると考えられた。主要な最終代謝物の1つであると考えられる No.10 については、8-16 時間にて増加後、16-24 時間にて減少する傾向が認められた。前者は代謝の進行、後者は親化合物の減少に対応していると考えられる。

#### 4. 1,2-ジクロロプロパンのグルタチオン抱合は非酵素的に進行する

興味深いことに、我々は1,2-ジクロロプロパンのグルタチオン抱合が非酵素的に進行することを見出した。6 mM グルタチオンを含む緩衝溶液中に

1,2-ジクロロプロパンを加え、エルマン法を用いて反応後の混液中に含まれるグルタチオンを定量した。その結果、1,2-ジクロロプロパンの投与量依存的にグルタチオン濃度が低下することが見出された（添付資料 6A）。次いで、LC-MS/MS 分析により、各グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物レベルを検証したところ、化合物 No.12, No.7, No.9, No.2 が検出された（添付資料 6B-E）。また、化合物 No.12, No.7, No.9, No.2 の生成量は1,2-ジクロロプロパンの投与量依存的に増加していた。一方、この条件では化合物 No.8, No.1, No.10, No.4 は検出されなかった。なお、推定構造式に基づくと、No.1, No.10, No.4 はグルタチオン骨格の代謝・分解が進むことで生じる化合物であると考えられる。今回の *in vitro* 反応では各段階に必要な酵素が存在しなかったため、これらの化合物が生成しなかったと考えられる。以上の結果は、グルタチオン転移酵素（GST）の非存在下においても、1,2-ジクロロプロパンへのグルタチオン抱合が起きることを示す新たな知見である。



## 5. グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物の大量合成ならびにカラム濃縮

標品が販売されていない各グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物を大量に取得し、種々の実験に用いるために、我々は各化合物の大量合成とカラム濃縮を試みた。まず、添付資料 6 にて得られた結果に基づき、反応条件をさらに検討した。反応後のグルタチオン量を比較したところ、pH 6.5 および pH 8.0 においても反応温度が上昇するにつれ、未反応状態のグルタチオンレベルの低下が認められた (添付資料 7)。さらに、反応温度 60℃ の条件では、pH 8.0 の方が pH 6.5 と比較して、より反応効率が良いことが認められた。このことと対応するように、代謝物を対象とする分析の結果、化合物 No.12 ならびに No.8 の顕著な増加が認められた (添付資料 8-1)。ただし、化合物 No.1, No.10, No.4 は得られなかった (添付資料 8-2)。以降、発がん性に寄与する可能性が高いと考えられる化合物 No.12 に焦点を当て、更なる検討を行った。

*in vitro* 反応によって生成した各代

謝物を濃縮するために、固相抽出用ミニカラム (Sep-Pac C18) を用いた検討を行った。研究方法の項に記した方法にしたがって反応混液をカラムに充填した後、MilliQ により合計 10 回溶出した。得られた各画分中におけるジクロロプロパン代謝物レベルを LC-MS/MS 分析によって定量し、カラムに加えた総量に対する相対値として評価した (添付資料 9)。その結果、化合物 No.12 を多く含む画分 (E7-10) を同定することができた。これら E7-10 画分を濃縮乾固し、再溶解することで少なくとも化合物 No.12 が濃縮された代謝物溶液を得た。

## 6. グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物は ABCC2 によって ATP 依存的に輸送される

EHBR を用いた検討により、胆汁排泄が ABCC2 に強く依存することが示唆されたグルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物に着目し、それらが ABCC2 によって輸送されるかどうかを検証した。この目的を達成するために、本研究では ABC 輸送体の機能評

価方法として広く知られているベシクル輸送実験を用いた。この手法は、目的とする ABC 輸送体を発現する細胞から調製した反転膜ベシクルを用いて、その内部への基質取り込みを測定することで輸送活性を評価する方法である。

まず、ABCC2 発現形質膜ベシクルの機能を確認するために、ABCC2 の基質であることが知られている Estradiol 17  $\beta$ -D-Glucuronide の放射標識体を用いた検討を行った。その結果、ABCC2 を発現していないコントロール膜ベシクルと比較して、ABCC2 発現膜ベシクルにおける基質取り込み量が増加していた。この輸送は ATP 依存的であり、ABCC2 膜ベシクルの機能を確認することに成功した（添付資料 10）。

次いで、先述の方法で得られた代謝物濃縮液を用いて同様の輸送実験を行った。その結果、少なくとも化合物 No.12 および No.7 が ABCC2 によって輸送されることが見出された（添付資料 11）。なお本研究では、各代謝物の標準物質を入手することが困難であったため、ピーク強度から物質量を求

めることが不可能であった。そのため、別途求めた反応混液中の各代謝物レベルを参照し、取り込みクリアランスを算出することで輸送活性を評価した。化合物 No.12 および No.7 が ABCC2 によって輸送されたことは、両物質がグルタチオン骨格を有するとの構造予測を強く裏付ける結果でもある。なお、その他の代謝物に関する輸送については、平成 27 年度以降の研究において、検討する予定である。

## 7. グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物は血中においても増加する

1,2-ジクロロプロパンの投与に伴って変動する血中成分が見出された場合、将来的な血中バイオマーカー候補となる可能性がある。そこで、このような物質を見出すことを目的として、ジクロロプロパン投与群ならびに非投与群の血中成分分析・差異解析を行った。

まず、各ジクロロプロパン代謝物の血中レベルに着目し、各ジクロロプロパン代謝物が血中にて検出できるレベルで存在するかどうかも含めて検

証した。そのために本研究では、1,2-ジクロロプロパン投与/非投与 SD ラット（野生型ラット）ならびに EHBR の血中成分を分析した。EHBR では、各代謝物の胆汁排泄量が低下し、肝臓中レベルが増加しているため、野生型ラットと比較して血中への移行が大きいと予想された。実際、EHBR では、ABCC2 の生理的基質であり胆汁排泄を主要な排泄経路とする抱合型ビリルビンの血中濃度が高いことが知られている。

4 倍量のメタノールを用いて血清試料の除タンパク質処理を行い、15,000 ×g, 15 分間、4℃の遠心分離を行った。次に、この遠心上清を回収し、減圧濃縮により乾固した。使用した血清と同等量の 80%メタノール水溶液で乾固物を再溶解することで分析試料を得た。各代謝物レベルは LC-MS/MS を用いて半定量的に分析し、1,2-ジクロロプロパン投与 EHBR 群の平均血中レベルに対する相対値としてまとめた（添付資料 12-1~2）。

解析の結果、化合物 No.8, No.10, No.1 はすべての 1,2-ジクロロプロパン投与群において検出され、特に No.8

については野生型群と比較して、EHBR 群における血中レベルの有意な増加が認められた（添付資料 12-1B）。これらの物質は、1,2-ジクロロプロパンに対する曝露に応じて増加する血中成分であり、曝露の指標として有用であると考えられる。また、化合物 No.12, No.7, No.9, No.4 も 1,2-ジクロロプロパン投与群において検出された。ただし、必ずしも全ての個体において検出されたわけではなく、血中バイオマーカー候補物質としての有用性は、先述の物質と比較した場合、相対的に低いと考えられる。なお、今回の分析条件では、1,2-ジクロロプロパン投与ラットの血中成分として化合物 No.2 は検出されなかった。

さらに、血液ならびに胆汁由来試料を対象とした LC-MS/MS 分析によって得られたシグナル強度に基づき、1,2-ジクロロプロパン投与 SD ラットにおける各代謝物の血中/胆汁中濃度比を概算した。その結果、グルタチオン骨格を有すると推定された各代謝物（化合物 No.12, No.8, No.7, No.9, No.2）は、少なく見積もっても、血中の数百倍～数千倍高い濃度で胆汁中

に存在することが示唆された。このことは、他の組織と比較して極めて高い濃度で、胆管上皮細胞がジクロロプロパン代謝物に曝露されることを示している。この結果は、我々が研究対象とする有機溶剤への大量曝露に起因する胆管がん発症機構において、代謝物の胆汁排泄が重要であることを支持する知見であると考えられる。

最後に、上述した各代謝物以外の血中変動成分を探索するために、SD ラットの 1, 2-ジクロロプロパン投与群および非投与群の血清成分を対象とするメタボローム差異解析を行った。なお、検出感度を高めるため、除タンパク質処理のみを行った試料を分析対象とした。まず、LC-MS/MS 分析によって取得した各試料 (n=6) のフルスキャンデータを差異解析ソフト SIEVE2.1 にて解析した。平均シグナル強度に 2 倍以上の変動があり、平均シグナル強度が大きい分析群側の変動係数 (標準偏差/算術平均) が 50 以下であることなどを条件に絞り込みを行った。その結果、添付資料 13 に示した 8 つ (投与群で増加したもの : 7、減少したもの : 1) の物質を新た

に見出すことに成功した。現在、その構造や生理活性等に関する解析を進めており、血中バイオマーカー候補物質としての可能性を検討中である。