

臓の GST-P 陽性肝細胞および陽性細胞巣を解析した実験において、それらの増加に関連して酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine や脂質過酸化の増加が確認されている (Wang et al., 2009 ; Kumamoto et al., 2013)。本研究では、GST-P 陽性細胞巣の増加に伴い NOX 関連分子である p22phox (NOX1、2、4 の調整サブユニット) 陽性細胞および *Poldip2* (NOX4 の調整サブユニット) の遺伝子発現が増加し、さらに酸化ストレス指標となる *Gpx1* (酸化型グルタチオンを産生する抗酸化酵素) の遺伝子の発現増加もみられたことから、NOX 関連分子に起因する酸化ストレスが高脂肪飼料給餌による肝プロモーション作用に関与している可能性が推察された。

《DSS 誘発性大腸炎の肝臓への影響》

脂肪性肝疾患は、単純性脂肪肝と異なり、脂肪性肝炎に進展し、肝傷害を誘発すると考えられている。実験2において、DSS を試験中に5日間飲水投与し、一過性に軽度の大腸炎を誘発したところ、実験1と比較して肝類洞内の好中球数には明らかな差は認められなかったが (実験1の CTL 群 1.3 ± 0.6 個/視野 ; 実験2の CTL 群 1.8 ± 0.5 個/視野)、p67phox 陽性細胞数は明らかに増加していた (実験1の CTL 群 3.5 ± 1.4 個/視野 ; 実験2の CTL 群 15.4 ± 3.0 個/視野)。さらに、肝傷害マーカーである AST および ALT については、実験1において CTL 群に比較し HFD 群で有意な減少ないし減少傾向を示したのに対し、実験2ではいずれの項目も有意な増加を示した。また、CTL 群に対する HFD 群の T.BIL の増加も実験1に比べ実験2で顕著になった (実験1では CTL 群に対し 183% の増加 ; 実験2では CTL 群に比べ 237% の増加)。従って、HFD 群における DSS 誘発性腸炎の炎症波及効果によって、肝臓に肝傷害が誘発された可能性が示唆された。

GST-P 陽性細胞巣の解析において、実験1と2の CTL 群を比較した場合、大型 (直径 0.2 mm 以上) の陽性細胞巣は減少傾向にあったが (CTL 群 : 実験1の陽性細胞巣 10.6 ± 3.4 個/cm² ; 実験2の陽性細胞

巣 4.4 ± 1.6 個/cm²)、中型の陽性細胞巣は増加傾向を示した (CTL 群 : 実験1の陽性細胞巣 8.2 ± 3.7 個/cm² ; 実験2の陽性細胞巣 14.7 ± 4.9 個/cm²)。大型の陽性細胞巣の面積には、数への影響ほどでないものの、減少傾向が認められた (CTL 群 : 実験1の陽性細胞巣 0.55 ± 0.37 mm²/cm² ; 実験2の陽性細胞巣 0.39 ± 0.18 mm²/cm²)。これらの結果から、試験期間中の一過性の大腸炎は GST-P 陽性細胞巣の増加、特に数の増加を抑制し、大型の陽性細胞巣よりも中型の陽性細胞巣を増加させたことが明らかとなった。この中型の陽性細胞巣の毒性学的意義は不明であるが、大腸炎による生体へのストレス、肝臓への炎症波及による前がん病変抑制シグナルの亢進などが要因となり、大型の陽性巣まで拡大できないものが多数観察されたと考えられた。ヒトでは脂肪性肝疾患から発生する肝発がんは 75 歳以上で増加するとされ、その発生には長期間に及ぶ aging が関与するため (Sheedfar et al., 2013)、本モデルにおいても肝細胞の脂肪化や類洞内の炎症細胞の増加が関与する、緩やかな肝発がん過程を誘発した可能性が考えられた。一方、大型 GST-P 陽性細胞巣においても HFD 群で p22phox・Ki-67 陽性細胞の増加がみられることから、数の減少はあるものの観察されている大型の陽性細胞巣には NOX の関与する増殖活性が亢進していることは明らかであった。

《DRZ の肝臓への影響》

DRZ は、*in vitro* の遺伝毒性試験で陽性を示すが、小核試験や不定期 DNA 合成試験を含め *in vivo* の試験は全て陰性であり、生体に対して明らかな遺伝毒性を示さないと考えられている。また、げっ歯類を用いた毒性試験において肝細胞の変性は認められるものの薬物代謝酵素誘導を示唆する肝細胞肥大も観察されていない (ikenbosyu/pcldouyaku_dimetridazole270225.pdf)。*in vivo* コメントアッセイにおいて酸化ストレスの関与する DNA 損傷を示すことから (Re et al., 2009)、本事業の目的に則して非マイクロソーム ROS 産生源である NOX に着目して肝前がん病変に与える影響について検討を

行った。

高脂肪飼料給餌による脂肪肝のスコアの増加が HFD 群に比較し DRZ 投与により減少し、この変化は血漿 TG の減少を伴っていた。肝毒性マーカー (ALT、AST) は DRZ により軽減しているものの、TG の減少は肝細胞におけるリポ蛋白等の合成抑制の影響が示唆される。有意な変化ではないもの最終体重が HFD 群に比較しやや低値であり、飲水量の低下もみられた。このため、基礎代謝の低下による影響とも推察された。一方、血漿 T.CHOL は HFD 群に比較し DRZ 投与により増加した。実験 1 および 2 ともに CTL 群と HFD 群間の T.CHOL の変動は軽度に留まり、DRZ によって特異的に T.CHOL が増加したと考えられた。DRZ のコレステロール代謝への影響についての研究報告はないが、肝毒性に関連した肝細胞への取込・排泄の異常に加え、後述するように DRZ は卵巣・精巣毒性を示すため、ステロイド合成の異常に関連してコレステロール代謝に影響を及ぼしている可能性も推察された。

GST-P 陽性細胞巢の解析では、様々な大きさの陽性細胞巢に変動がみられたため、サイズ別に定量解析を行った。その結果、DRZ 投与により大型の陽性細胞巢の面積の有意な減少がみられ、この変化は陽性巢内の Ki-67 および p22phox 陽性細胞の減少も伴っていた。中型以下の陽性巢の増加を考慮すると、不完全な肝発がん促進作用のため、高脂肪飼料給餌による肝発がん促進作用を遅延させ、今回の試験期間では大型のサイズまで陽性細胞巢を拡大させなかった可能性がある。実際、DMR には肝毒性はあるものの、発がん性試験では肝発がん性は認められていない(ikenbosyu/pc1douyaku_dimetridazole270225.pdf)。他の機序として、本剤の有する卵巣および精巣毒性との関連を考慮する必要がある。エストロゲンおよびその誘導体は DEN 処置ラットの肝前がん病変を抑制するが、それには TGF- β の誘導に関連した細胞増殖の抑制の関与が示唆されている (Moser et al., 1996; Kang et al., 2011)。また、ラットの 2 段階発がんモデルにおいて、去勢とアンドロゲン投与を組み合わせた実験において、去勢により GGTP 陽性肝細胞

が減少し、その場合、数よりも面積の減少が顕著であり、アンドロゲン投与によりその抑制が軽減されることが報告されている (Lindhe et al., 1990)。一方、アンドロゲン受容体の競合的拮抗剤であっても、肝臓に薬物代謝酵素(Cyp1A1)を誘導する場合は、アンドロゲンの変動に関わらず GST-P 陽性肝細胞巢を増加することも報告されている (Tawfeeq et al., 2012)。DRZ 投与では、少なくとも 3 種の薬物代謝酵素 (Cyp1a2, Cyp2e1, Cyp4a1) の誘導は確認されていない。従って、DRZ 投与では直接的な肝臓への作用以外にも卵巣あるいは精巣毒性の要因となる性ホルモン様の作用あるいはその受容体への影響により、大型の GST-P 陽性細胞巢の減少が生じた可能性が考えられた。

一方、中間型および小型の GST-P 陽性細胞巢並びに単一 GST-P 陽性肝細胞の数が DRZ 投与により HFD 群に比較し有意に増加した。上記のように大型の GST-P 陽性細胞巢の減少に対比して、本剤の特有の肝発がん促進作用と考えられる。これらの陽性細胞巢および細胞数は APO 投与により有意な減少ないし減少傾向を示していることから、中型以下の大きさの病変の発生には NOX の関与が示唆される。中型の GST-P 陽性細胞巢における p22phox 陽性細胞数の解析結果において、群間に有意な変動が観察されなかったため、関連する NOX 関連分子の変動を捉えることができなかった。これまでの研究において、免疫染色では p22phox および NOX4 が肝細胞において明瞭に染めださせるが、NOX4 は大型の GST-P 陽性に比較的発現しやすく、今回の検討には適さない可能性が高い。今後、さらに NOX 関連分子と前がん病変の関連性について検討を加え、中型以下の前がん病変の形成機序を明らかにする必要がある。一方、HFD 給餌下の DRZ 投与により増加した Ki-67 および γ -H2A.X 陽性細胞が HFD+DRZ 群に比較し、APO との併用により減少傾向を示したことから、細胞増殖や DNA 損傷の軽減が中型以下の陽性巢の減数に関与していることが示唆された。特に、DRZ による DNA 損傷においては、ヒトリンパ球を用いた comet assay において、SOD やカタラーゼを含

む数種の抗酸化剤投与により DRZ の DNA 損傷が抑制されたとの報告があることから、その DNA 損傷には酸化ストレスが関与することが示唆されている (Re et al., 1997)。NOX によって産生されるスーパーオキシドは、SOD やカタラーゼによって還元されることも勘案すると、中型以下の病変の発生には NOX の関与が強く影響を与えている可能性がある。

E. 結論

肝発がん促進過程における NOX の関与について検討するため、基礎飼料と高脂肪飼料の給餌ラットを用いて肝二段階発がんモデルを実施したところ、高脂肪飼料給餌ラットでは高脂血症、脂肪肝および肝脂質代謝酵素の遺伝子変動とともに NOX 関連分子 p22phox の発現を伴う前がん病変の増加がみられ、NOX の関与が示唆される肝発がん促進作用が検出できた。このモデルに肝臓への炎症の波及効果を目的として大腸炎モデルを適用した結果、本モデルでは肝傷害を伴う肝発がん促進作用を検出することができた。その際、様々な大きさの前がん病変を標的としてサイズ依存性の反応があるかどうかを検出する必要性があり、通常よりもサイズの小さな前がん病変に着目することが重要であった。抗真菌剤・肝毒性物質である DMR を被験物質として用い、大型、中型、小型の前がん病変に分けて評価した結果、中型以下の前がん病変を増加させる特徴的な肝発がん促進作用を検出できた。この結果は、本剤が弱い肝発がん促進作用を有することを示唆し、発がん性試験においても明瞭な肝発がん性を示さないことと一致した。中型以下の前がん病変の増加には細胞増殖と DNA 損傷指標の発現が関与しており、それらが NOX 阻害剤により抑制されたことから、DRZ の前がん病変形成過程には NOX の関与する酸化ストレスに依存した細胞増殖機構が関与することが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

吉田敏則、村山宗理、河嶋将司、木村真之、水上さやか、寒川祐美、林 新茂、渋谷 淳：高脂肪飼料給餌ラットを用いた二段階肝発がんモデルにおける血中脂質および肝 p22phox 発現の解析、第 32 回日本毒性病理学会学術集会（香川、2016 年 1 月）

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

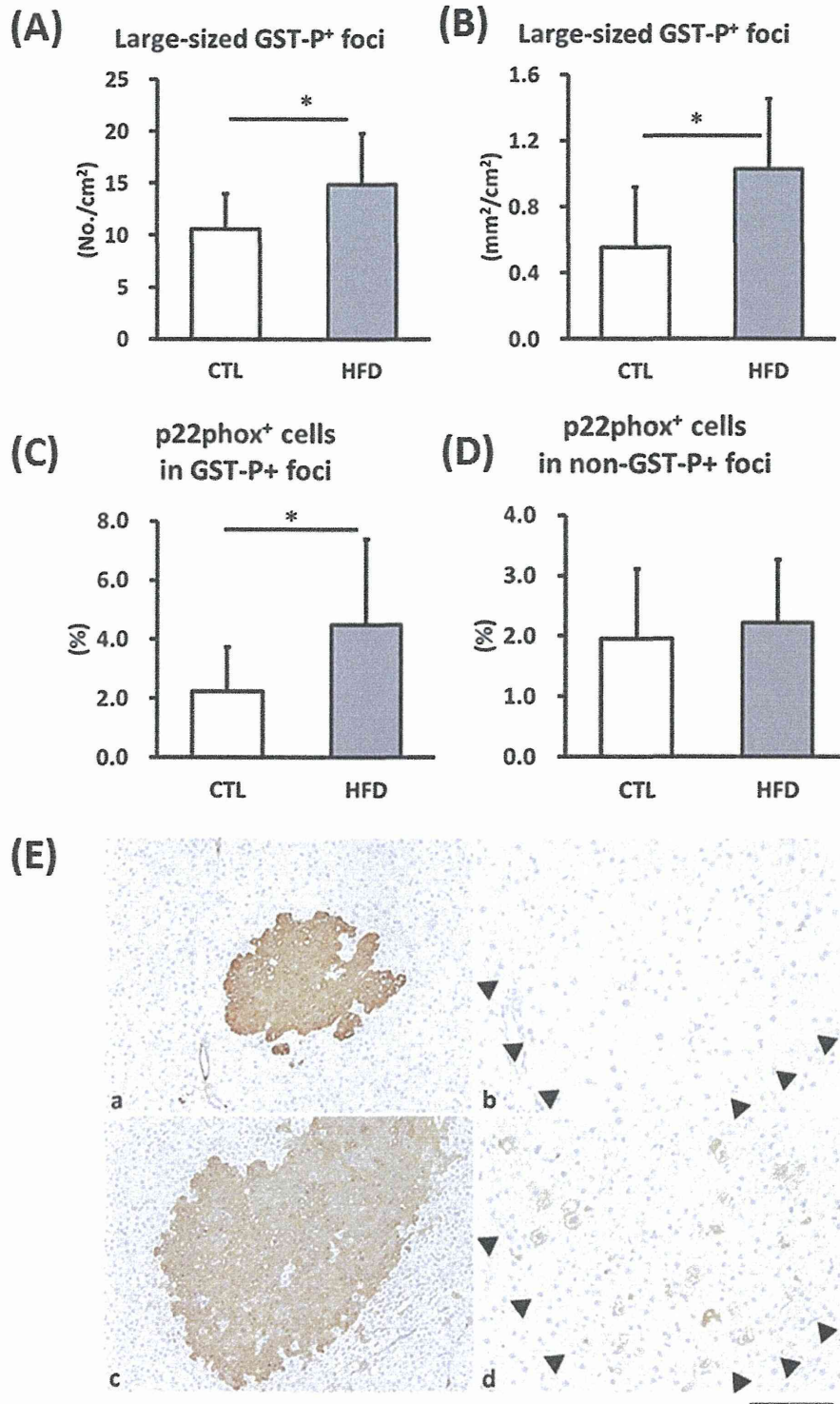


Fig 1. Quantitative analysis of large-sized GST-P⁺ foci and expression of p22phox⁺ cells in the GST-P⁺ foci and non-GST-P⁺ foci in the liver of rats fed with basal diet and high fat diet after DEN initiation. (A, B) The number (A) and area (B) of large-sized GST-P⁺ foci in each group. (C, D) Quantitative data (%) of p22phox⁺ cells in large-sized GST-P⁺ foci (C) and non-GST-P⁺ foci (D). (E) Representative images of large-sized GST-P⁺ foci (a,c) and p22phox⁺ cells (b,d) in CTL (a,b) and HFD (c,d) groups. Bar=200 μm (a, b), 100 μm (b, d). Columns represent mean and standard deviation. CTL, control group; HFD, high fat diet group. *: p<0.05 (Student's t test or Aspin-Welch test).

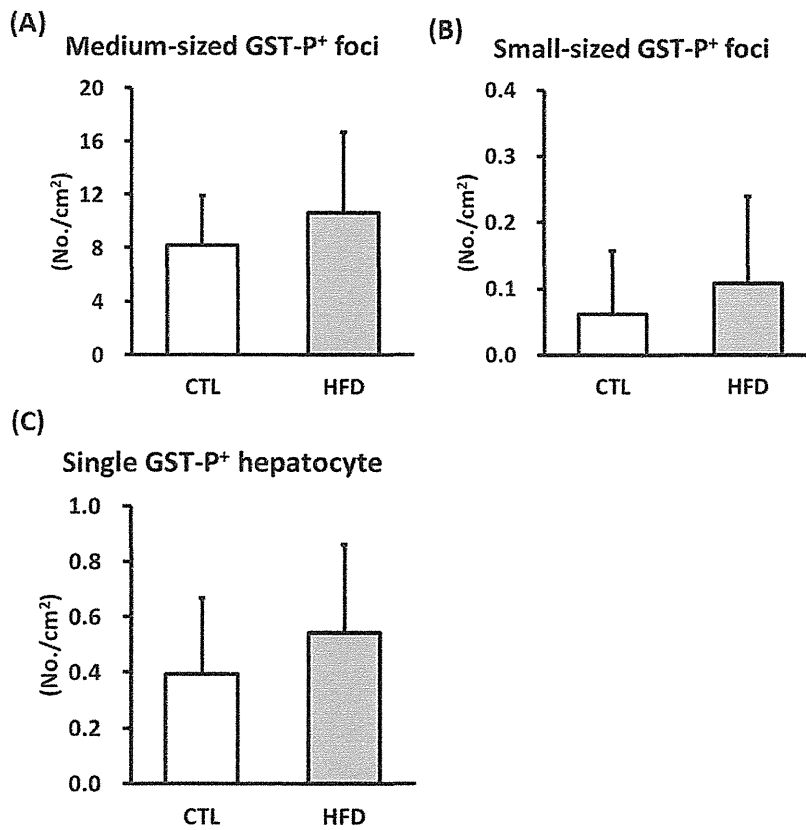


Fig 2. Quantitative analysis of variable-sized GST-P⁺ foci and single GST-P⁺ hepatocyte in the liver of rats fed with basal diet and high fat diet after DEN initiation. The number of medium- (A) or small-sized GST-P⁺ foci (B) and single GST-P⁺ hepatocyte (C) in each group are shown. Columns represent mean and standard deviation. CTL, control group; HFD, high fat diet group. *: $p < 0.05$ (Student's t test or Aspin-Welch test).

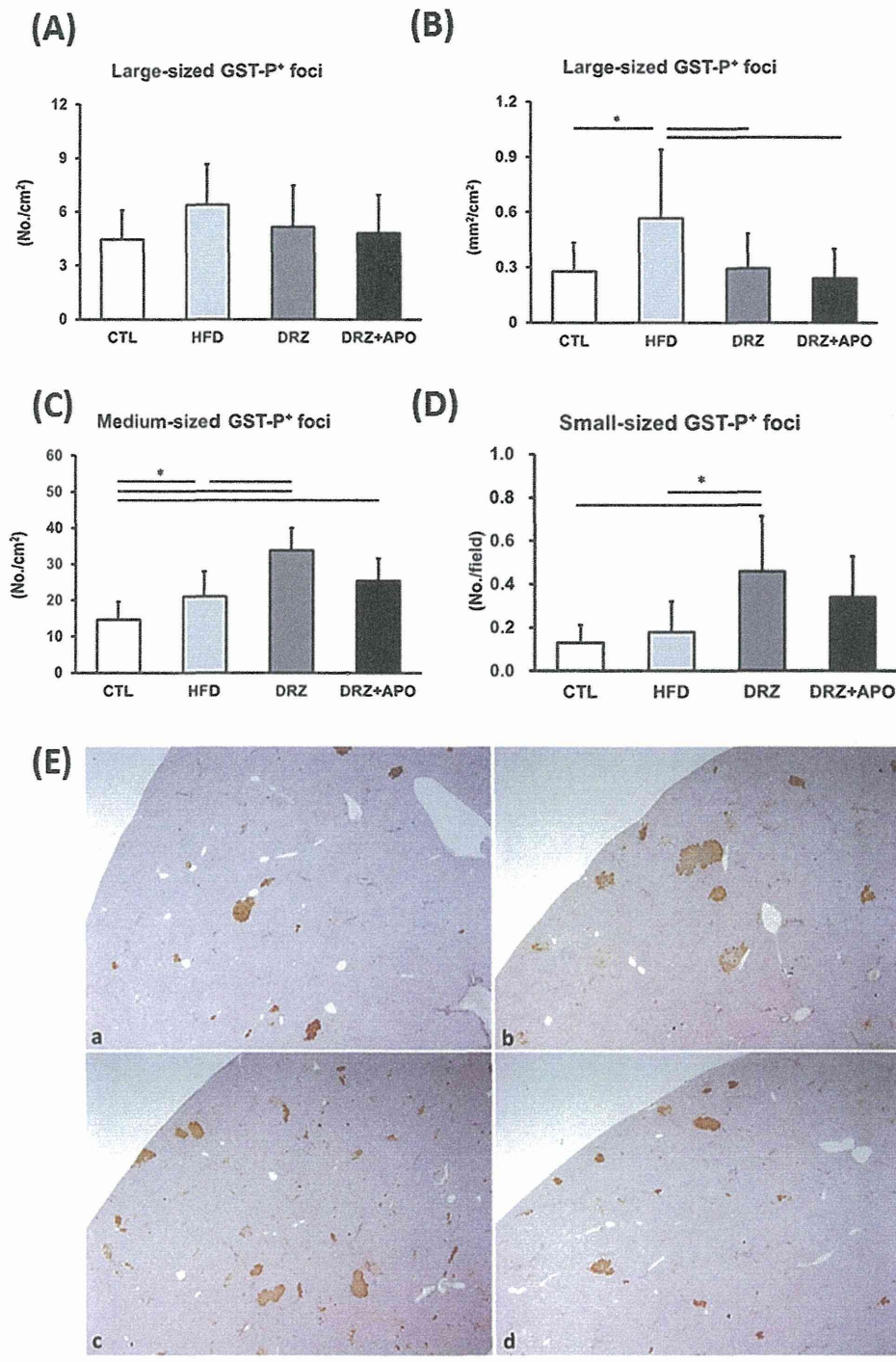


Fig 3. Quantitative analysis of variable-sized GST-P⁺ foci in the liver of rats fed basal diet after DEN initiation or fed high fat diet after DEN initiation followed by DRZ treatment with or without co-treatment with APO. (A-D) The number (A) and area (B) of large-sized GST-P⁺ foci, more than 200 μ m in diameter, number of medium-sized GST-P⁺ foci, 50 to 200 μ m in diameter (C), and small-sized GST-P⁺ foci, less than 50 μ m in diameter (D). (E) Representative images of GST-P⁺ foci in CTL (a) and HFD (b), HFD+DRZ (c), and HFD+DRZ+APO (d) groups. Bar=200 μ m. Columns represent mean and standard deviation. Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin. *, $p < 0.05$ (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

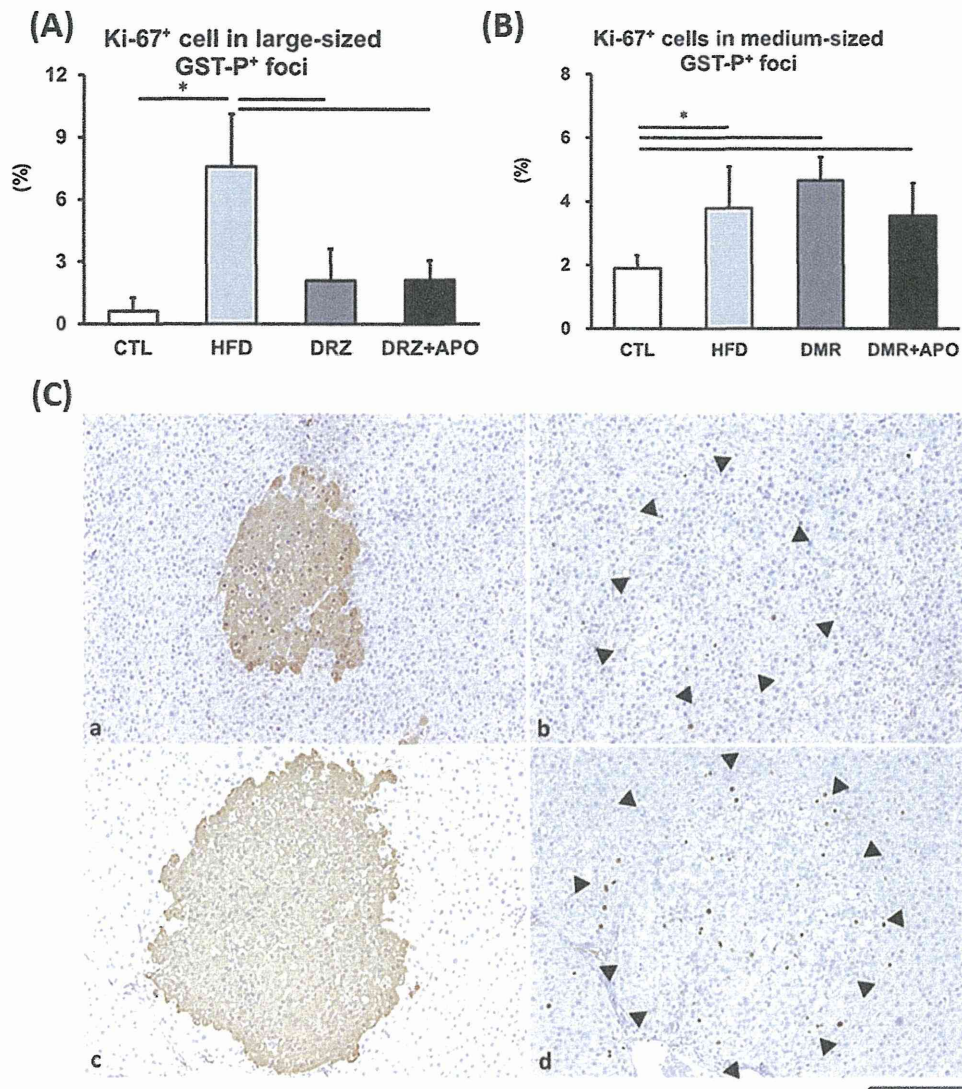


Fig 4. Quantitative analysis of Ki-67⁺ cells in GST-P⁺ foci in the liver of rats after DEN initiation or DEN initiation followed by DMR treatment with or without co-treatment with APO. (A, B) Quantitative data (%) of Ki-67⁺ cells in large-sized (A) or medium-sized (B) GST-P⁺ foci. (C) Representative images of large-sized GST-P⁺ foci (a, c) and Ki-67⁺ cells (b, d) in CTL (a, b) and HFD (b, d) groups. Bar=200 um. Columns represent mean and standard deviation. Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin. *, $p < 0.05$ (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

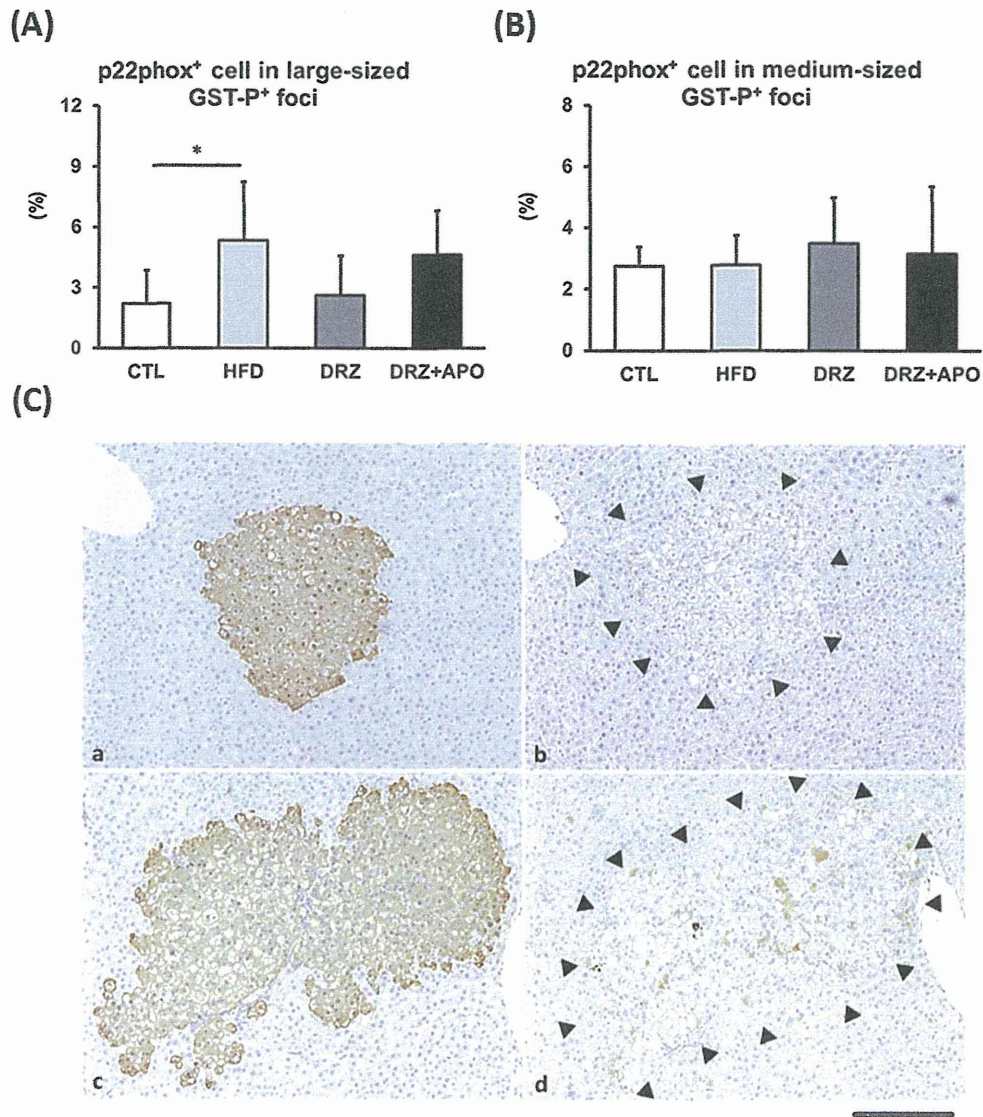


Fig 5. Quantitative analysis of p22phox⁺ cells in GST-P⁺ foci in the liver of rats after DEN initiation or DEN initiation followed by DMR treatment with or without co-treatment with APO. (A, B) Quantitative data (%) of p22phox⁺ cells in large-sized (A) or medium-sized (B) GST-P⁺ foci. (C) Representative images of large-sized GST-P⁺ foci (a, c) and p22phox⁺ cells (b, d) in CTL (a, b) and HFD (b, d) groups. Bar=200 um. Columns represent mean and standard deviation. Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin. *, p<0.05 (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

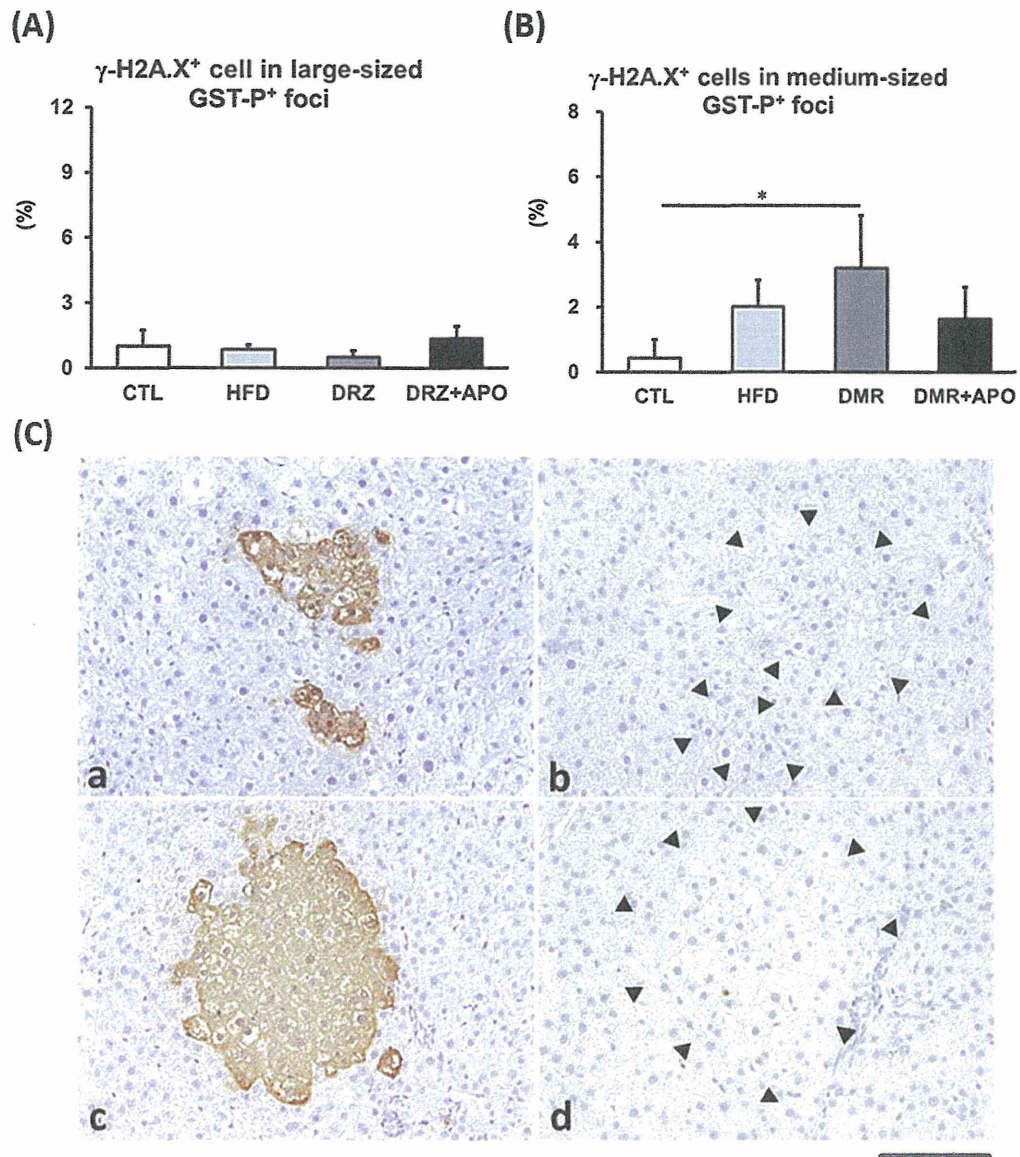


Fig 6. Quantitative analysis of γ -H2A.X⁺ cells in GST-P⁺ foci in the liver of rats after DEN initiation or DEN initiation followed by DMR treatment with or without co-treatment with APO. (A, B) Quantitative data (%) of p22phox⁺ cells in large-sized (A) or medium-sized (B) GST-P⁺ foci. (C) Representative images of medium-sized GST-P⁺ foci (a, c) and γ -H2A.X⁺ cells (b, d) in CTL (a, b) and HFD (c, d) groups. A small-sized focus is also observed (a, b). Bar=100 μ m. Columns represent mean and standard deviation. Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin. *, $p < 0.05$ (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

Table 1. Antibodies for immunohistochemistry

Antigen	Host species	Clonality		Antigen retrieval	Manufacture
		(Clone)	Dilution		
GST-P	Rabbit	Polyclonal	1:1000	none	Medical & Biological Laboratories (Nagoya, Japan)
Ki-67	Mouse	Monoclonal (MIB-5)	1:50	Autoclaving at 121°C for 10 min in citrate buffer, pH6.0	Dako (Glostrup, Denmark)
p22phox	Rabbit	Polyclonal	1:200	Autoclaving at 121°C for 10 min in antigen retrieval solution (Dako), pH9.0	Bioss Inc. (Woburn, MA, USA)
p67phox	Rabbit	Polyclonal	1:200	Autoclaving at 121°C for 10 min in antigen retrieval solution (Dako), pH9.0	Merck KGaA.(darmstadt, Germany)
Histone H2A.X (phospho S139)	Rabbit	Monoclonal (EP854(2)Y)	1:3000	Autoclaving at 121°C for 10 min in citrate buffer, pH6.0	Abcam (Cambridge, UK)

Table 2. Sequence of primers used for real-time RT-PCR

Accession no.	Gene	Forward primer (5' →3')	Reverse primer (5' →3')
NM 001100984	<i>P67phox</i>	GAAAGCATGAAGGATGCCTGG	ATAGCACCAAGATCACATCTCC
NM 024160	<i>P22phox</i>	TGTTGCAGGAGTGCTCATCTGTCT	AGGACAGCCCGGACGTAGTAATTT
NM 001105816	<i>Poldip2</i>	GCTGCTGGCTCTGCTAAGGT	AACTACTGCCCCAGGAGATG
NM 013196	<i>Ppara</i>	CCCCACTTGAAGCAGATGACC	CCCTAAGTACTGGTAGTCCGC
NM 001145366	<i>Pparg</i>	GACCACTCCCATTCCTTTGA	CATTGGGTCAGCTTGTGA
NM 017340	<i>Aox1</i>	GCGCAAGGAGCGGGCCTCC	CTCGACGGCGCCGGGTATTC
NM 001007144	<i>Plin2</i>	CCGAGCGTGGTGACGAGGG	GAGGTCACGGTCCTCACTCCC
NM 012589	<i>Il10</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC
NM 001108509	<i>Pnpla2</i>	CGGTGGATGAAGGAGCAGACA	TGGCACAGACGGCAGAGACT
NM 001183664	<i>Dgal</i>	CACGAATCATTGAGCGTCTCTTA	GCCAATAGAAGAAGATGAGCCATATC
NM 175837	<i>Cyp4a1</i>	CGGGCGATCAGATCCAAA	GAGCAAACCATATCCGATCCA
NM 017332	<i>Fasn</i>	GCGGGCGTGGTAATGCT	CTGTTCGCAAATACGCTCCAT
NM 139192	<i>Scd1</i>	CACACGCCGACCCTCACAAC	TCCGCCCTTCTCTTTGACAGCC
NM 001134637	<i>Plin5</i>	GGATGTCCGGTGATCAGAC	GTGCACGTGGCCCTGACCAG
NM 012520	<i>Catalase</i>	ATTGCCGTCCGATTCTCC	CCAGTTACCATCTTCAGTGTAG
NM 017051	<i>Mn-SOD</i>	GACCTGCCTTACGACTATG	TACTTCTCCTCGGTGACG
NM 030826	<i>Gpx1</i>	GCTGCTCATTGAGAATGTCG	GAATCTCTTCATTCTTGCCATT
NM 012675	<i>Tnf-alpha</i>	ATACACTGGCCCGAGGCAAC	CCACATCTCGGATCATGCTTTC
NM 012541	<i>Cyp1a2</i>	AAGCGCCGGTTGCATTG	TGCAGGAGGATGGCTAAGAAG
NM 031543	<i>Cyp2e1</i>	TGACTTTGGCCGACCTGTTC	TGAGGATCAGGAGCCCATATCT
NM_012583	<i>Hprt</i>	GTCAAGCAGTACAGCCCCAAA	CAAACTTCGAGAGGTCCTTTTC

Abbreviations: Poldip2, Polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2; Ppara, Peroxisome proliferator activated receptor alpha; Pparg, peroxisome proliferator activated receptor alpha; Aox1, Alternative oxidase1; Plin2, Perilipin2; Il10, Interleukin-10; Pnpla2, Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 2; Dgal, diacylglycerol O-acyltransferase; Cyp4a1, Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 1; Fasn, Fatty acid synthase; Scd1, Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1; Plin5, Perilipin 5; Mn-SOD, Manganese superoxide dismutase; Gpx1, Glutathione peroxidase 1; Tnf-alpha, tumor necrosis factor alpha; Cyp1a2, Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2; Cyp2e1, Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1; Hprt, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase.

Table 3. Final body weight, organ weight, food intake, water intake, and histopathological findings in rats fed with basal diet and high fat diet after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD
No. of animals	14	13
Final body weight (g)	282.0±13.9	300.3±8.1 ^a
Absolute intraabdominal adipose tissue weight (g)	1.96±0.21	2.91±0.23 ^a
Relative intraabdominal adipose tissue weight (%BW)	0.70±0.06	0.97±0.07 ^a
Absolute liver weight (g)	8.29±0.50	8.44±0.37
Relative liver weight (%BW)	2.95±0.09	2.83±0.08 ^a
Food intake (g/rat/day)	13.7±2.3	11.4±0.7
Water intake (g/rat/day)	20.3±2.8	16.5±1.5
Steatosis, hepatocellular (Score)	1.3±0.5	2.2±0.7 ^a
Neutrophil, sinusoidal, liver (No./field)	1.3±0.6	0.7±0.2
p67phox ⁺ cell, sinusoidal, liver (No./field)	3.5±1.4	3.4±1.8

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; BW, body weight; DEN, N-diethylnitrosamine.

§: All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 3 after DEN initiation.

Data are shown as the mean ± standard deviation.

^a: p<0.05 vs CTL (Student's t test or Aspin-Welch test).

Table 4. Blood biochemistry in rats fed with control basal diet and high fat diet after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD
No. of animals	14	13
AST (U/L)	90 ± 12	78 ± 4 ^a
ALT (U/L)	55 ± 12	50 ± 5
ALP (U/L)	1305 ± 187	1461 ± 103 ^a
GGTP (U/L)	0.89 ± 0.28	0.77 ± 0.21
GLU (mg/dL)	127 ± 17	135 ± 7
TP (g/dL)	7.4 ± 0.3	7.2 ± 0.2
ALUB (g/dL)	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1
GLOB (g/dL)	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.1
A/G (ratio)	2.4 ± 0.3	2.5 ± 0.2
T.CHOL (mg/dL)	75 ± 6	80 ± 8
TG (mg/dL)	116 ± 26	226 ± 61 ^a
T.BIL (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02 ^a

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DEN, N-diethylnitrosamine; AST, aspartate aminotransaminase; ALT, alanine aminotransaminase; ALP, alkaline phosphatase; GGTP, γ -glutamyl transpeptidase; GLU, glucose; TP, total protein; ALUB, albumin; GLOB, globulin; A/G, albumin/globulin; T.CHOL, total cholesterol; TG, triglyceride; T.BIL, total bilirubin.

§: All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 3 after DEN initiation.

Data are shown as the mean ± standard deviation.

a: $p < 0.05$ versus CTL (Student's t test or Aspin-Welch test).

Table 5. Final body weight, liver weight, food intake, and water intake in rats treated with or without DRZ or APO after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD	HFD+DRZ	HFD+DRZ+APO
No. of animals	11	13	12	12
Final body weight (g)	278.0±7.3	285.7±24.3	267.4±14.7	259.6±17.2 ^b
Absolute adipose tissue weight (g)	2.25±0.39	2.82±0.47 ^a	2.44±0.49	2.44±0.50
Relative adipose tissue weight (%BW)	0.81±0.14	0.99±0.14 ^a	0.91±0.16	0.93±0.16
Absolute liver weight (g)	9.48±0.64	9.00±0.63	8.59±0.62 ^a	8.74±0.79
Relative liver weight (%BW)	3.41±0.20	3.16±0.15 ^a	3.21±0.13	3.37±0.27 ^b
Absolute testis weight (g)	2.99±0.11	3.00±0.28	1.33±0.13 ^{a,b}	1.29±0.17 ^{a,b}
Relative testis weight (%BW)	1.08±0.03	1.05±0.04	0.50±0.04 ^{a,b}	0.50±0.07 ^{a,b}
Absolute epididymis weight (g)	0.81±0.07	0.80±0.08	0.45±0.05 ^{a,b}	0.46±0.03 ^{a,b}
Relative epididymis weight (%BW)	0.29±0.03	0.28±0.02	0.17±0.01 ^{a,b}	0.18±0.01 ^{a,b}
Colon length (cm)	18.1±1.7	16.4±1.2 ^a	16.3±1.1 ^a	15.7±2.0 ^a
Food intake (g/rat/day)	12.9±0.5	10.5±0.4 ^a	10.4±0.5 ^a	10.7±1.3 ^a
Water intake (g/rat/day)	23.2±2.6	20.5±1.2	17.8±1.3 ^a	17.1±1.6 ^a
Steatosis, hepatocellular (Score)	1.3±0.5	2.8±0.7 ^a	1.9±0.9 ^b	2.1±0.8 ^b
Neutrophil, sinusoidal, liver (No./field)	1.8±0.5	1.6±0.4	1.8±0.7	1.9±0.6
p67phox+ cell, sinusoidal, liver (No./field)	15.4±3.0	17.5±4.2	16.9±3.3	17.8±5.3
Colitis, large intestine (Score)	2.6±0.9	2.4±0.6	2.3±0.3	2.7±0.8
Degeneration/atrophy, tubular, testis (Score)	0.0±0.0	0.0±0.0	2.5±0.7 ^{a,b}	2.6±0.5 ^{a,b}
Reduced sperm, luminal, epididymis (Score)	0.0±0.0	0.0±0.0	2.0±0.0 ^{a,b}	2.0±0.0 ^{a,b}

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin; BW, body weight; DEN, N-diethylnitrosamine.

§ : All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 1 after starting DRZ promotion.

Data are shown as the mean ± standard deviation.

a: p<0.05 vs CTL (Tukey's or the Steel-Dwass test).

b: p<0.05 vs HFD (Tukey's or the Steel-Dwass test).

Table 6. Blood biochemistry in rats treated with or without DRZ or APO after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD	HFD+DRZ	HFD+DRZ+APO
No. of animals	10	13	12	11
AST (U/L)	84±5	92±9 ^a	71±4 ^{ab}	72±5 ^{ab}
ALT (U/L)	48±6	57±9 ^a	48±4 ^b	49±5 ^b
ALP (U/L)	1230±151	1379±428	1213±136	1232±116
GGTP (U/L)	1.3±0.2	1.2±0.8	1.2±0.3	1.2±0.4
GLU (mg/dL)	139±20	142±29	146±22	174±34 ^{ab}
TP (g/dL)	7.24±0.20	7.28±0.28 ^a	7.24±0.27 ^b	7.14±0.32 ^b
ALUB (g/dL)	5.01±0.08	5.04±0.25	5.08±0.17	4.98±0.25
GLOB (g/dL)	2.24±0.14	2.24±0.19	2.16±0.14	2.16±0.18
A/G (ratio)	2.25±0.12	2.26±0.24	2.36±0.14	2.31±0.22
T.CHOL (mg/dL)	70.6±4	78.4±10	84.3±9 ^a	83.1±12
TG (mg/dL)	154±30	261±56 ^a	218±72	299±92 ^a
T.BIL (mg/dL)	0.043±0.01	0.102±0.03 ^a	0.058±0.02 ^b	0.068±0.01 ^a

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DEN, N-diethylnitrosamine; AST, aspartate aminotransaminase; ALT, alanine aminotransaminase; ALP, alkaline phosphatase; GGTP, γ -glutamyl transpeptidase; GLU, glucose; TP, total protein; ALUB, albumin; GLOB, globulin; A/G, albumin/globulin; T.CHOL, total cholesterol; TG, triglyceride; T.BIL, total bilirubin.

§ : All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 1 after starting DRZ promotion.

Data are shown as the mean \pm standard deviation.

a: $p < 0.05$ vs CTL (Tukey's or the Steel-Dwass test).

b: $p < 0.05$ vs HFD (Tukey's or the Steel-Dwass test).

c: $p < 0.05$ vs HFD+DRZ (Tukey's or the Steel-Dwass test).

Table 7. Hepatic gene expression in rats treated with or without DRZ or APO after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD	HFD+DRZ	HFD+DRZ+APO
No. of animals	6	6	6	6
<i>P67phox</i>	1.04±0.30	1.34±0.15	0.91±0.29	1.28±0.44
<i>P22phox</i>	1.04±0.33	1.17±0.24	0.72±0.27	1.13±0.32
<i>Poldip2</i>	1.06±0.45	1.61±0.23 ^a	1.04±0.13 ^b	1.06±0.19 ^b
<i>Ppara</i>	1.02±0.21	1.16±0.25	1.25±0.30	1.32±0.33
<i>Pparg</i>	1.05±0.35	2.04±0.25 ^a	2.15±0.52 ^a	2.15±0.52 ^a
<i>Aox</i>	1.01±0.17	1.39±0.21 ^a	1.16±0.26	1.40±0.21 ^a
<i>Plin2</i>	1.01±0.12	2.11±0.38 ^a	1.41±0.40 ^b	2.57±0.47 ^{ac}
<i>Il10</i>	1.32±1.23	1.26±0.95	0.80±0.61	0.65±0.22
<i>Pnpla2</i>	1.02±0.21	1.03±0.21	0.97±0.16	0.96±0.11
<i>Dgal</i>	1.04±0.32	1.24±0.19	1.03±0.08	1.15±0.12
<i>Cyp4a1</i>	1.01±0.15	1.20±0.32	0.92±0.24	1.32±0.32
<i>Fasn</i>	1.03±0.29	0.32±0.19 ^a	0.17±0.12 ^a	0.35±0.12 ^a
<i>Scd1</i>	1.05±0.34	0.28±0.18 ^a	0.22±0.13 ^a	0.45±0.40 ^a
<i>Plin5</i>	1.01±0.17	2.05±0.17 ^a	1.37±0.38 ^b	1.70±0.29 ^a
<i>Catalase</i>	1.01±0.15	1.14±0.28	1.10±0.29	1.21±0.22
<i>Mn-SOD</i>	1.01±0.12	1.15±0.23	0.95±0.16	1.03±0.19
<i>Gpx1</i>	1.01±0.14	1.52±0.34 ^a	1.32±0.33	1.32±0.15 [*]
<i>Tnf-alpha</i>	1.04±0.33	1.20±0.49	0.94±0.41	1.30±0.31 [*]
<i>Cyp1a2</i>	1.04±0.33	1.17±0.31	1.23±0.28	1.26±0.45
<i>Cyp2e1</i>	1.02±0.23	1.49±0.30	1.29±0.28	1.35±0.40

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin; BW, body weight; DEN, N-diethylnitrosamine.

§: All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 1 after starting DRZ promotion.

Data are shown as the mean ± standard deviation.

^a: p<0.05 vs CTL (Tukey's or the Steel-Dwass test).

^b: p<0.05 vs HFD (Tukey's or the Steel-Dwass test).

^c: p<0.05 vs HFD+DRZ (Tukey's or the Steel-Dwass test).

*: The number of samples is 5

別添 5

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
該当なし。							

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
Kimura, M., Mizukami, S., Watanabe, Y., Hasegawa-Baba, Y., Onda, N., Yoshida, T., <u>Shibutani, M.</u>	Disruption of spindle checkpoint function ahead of facilitation of cell proliferation by repeated administration of hepatocarcinogens in rats.	J. Toxicol. Sci.	40(6)	855-871	2015
Kimura, M., Mizukami, S., Watanabe, Y., Hasegawa-Baba, Y., Onda, N., Yoshida, T., <u>Shibutani, M.</u>	Disruption of spindle checkpoint function in rats following 28 days of repeated administration of renal carcinogens.	J. Toxicol. Sci.	41(1)	91-104	2016

研究成果の刊行物・別刷

Original Article

Disruption of spindle checkpoint function ahead of facilitation of cell proliferation by repeated administration of hepatocarcinogens in rats

Masayuki Kimura^{1,2}, Sayaka Mizukami^{1,2}, Yousuke Watanabe^{1,2}, Yasuko Hasegawa-Baba¹,
Nobuhiko Onda¹, Toshinori Yoshida¹ and Makoto Shibutani¹

¹Laboratory of Veterinary Pathology, Tokyo University of Agriculture and Technology,
3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183-8509, Japan

²Pathogenetic Veterinary Science, United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University,
1-1 Yanagido, Gifu-shi, Gifu 501-1193, Japan

(Received August 4, 2015; Accepted September 14, 2015)

ABSTRACT — We aimed to clarify the hepatocarcinogen-specific disruption of cell cycle checkpoint functions and its time course after repeated administration of hepatocarcinogens. Thus, rats were repeatedly administered with hepatocarcinogens (methapyrilene, carbadox and thioacetamide), a marginal hepatocarcinogen (leucomalachite green), hepatocarcinogenic promoters (oxfendazole and β -naphthoflavone) or non-carcinogenic hepatotoxicants (promethazine and acetaminophen) for 7, 28 or 90 days, and the temporal changes in cell proliferation, expression of G₁/S and spindle checkpoint-related molecules, and apoptosis were examined using immunohistochemistry and/or real-time RT-PCR analysis. Hepatocarcinogens facilitating cell proliferation at day 28 of administration also facilitated cell proliferation and apoptosis at day 90. Hepatocarcinogen- or hepatocarcinogenic promoter-specific cellular responses were not detected by immunohistochemical single molecule analysis even after 90 days. Expression of *Cdkn1a*, *Mad211*, *Chek1* and *Rbl2* mRNA also lacked specificity to hepatocarcinogens or hepatocarcinogenic promoters. In contrast, all hepatocarcinogens and the marginally hepatocarcinogenic leucomalachite green induced *Mdm2* upregulation or increase in the number of phosphorylated MDM2⁺ cells from day 28, irrespective of the lack of cell proliferation facilitation by some compounds. However, different *Tp53* expression levels suggest different mechanisms of induction or activation of MDM2 among hepatocarcinogens. On the other hand, hepatocarcinogenic methapyrilene and carbadox downregulated the number of both ubiquitin D⁺ cells and proliferating cells remaining in M phase at day 28 and/or day 90, irrespective of the lack of cell proliferation facilitation in the latter. These results suggest that hepatocarcinogens disrupt spindle checkpoint function after 28 or 90 days of administration, which may be induced ahead of cell proliferation facilitation.

Key words: Cell proliferation, Hepatocarcinogen, Hepatocarcinogenic promoter, Spindle checkpoint, Ubiquitin D, Apoptosis

INTRODUCTION

Carcinogenicity assays using rodents are one of the most important endpoints for evaluating the carcinogenic potential of chemicals. However, regular carcinogenicity bioassays, in which rodents are exposed to chemicals for 1.5-2 years, are typically time-consuming and expensive, involving the use of many animals. Although the two-stage carcinogenesis models (Tamano, 2010)

and genetically modified animals produced by transgenic or gene-targeting technologies (Eastin, 1998) are used as alternative methods for carcinogenicity tests, they are also costly and time-consuming, and have limited target organs. Toxicogenomic approaches for prediction of the carcinogenic potential in each target organ may be promising; however, they are also expensive and require integrative methodologies between different laboratories sharing expression databases (Jonker *et al.*, 2009; Uehara

Correspondence: Makoto Shibutani (E-mail: mshibuta@cc.tuat.ac.jp)

et al., 2011). Therefore, development of rapid and inexpensive assays for evaluating or predicting the carcinogenic potential of chemicals is needed for efficient detection of carcinogens.

We have recently found that carcinogens facilitating cell proliferation in carcinogenic target cells in a 28-day toxicity study in rats could also induce aberrant expression of cell cycle-related molecules reflecting activation of G₁/S and G₂/M checkpoint functions, causing cell cycle arrest and apoptosis in many target organs (Taniai *et al.*, 2012a, 2012b; Yafune *et al.*, 2013a, 2013b). Additionally, we found that such carcinogens typically induce aberrant expression of ubiquitin D (UBD) at G₂ and M phases in carcinogenic target cells by double immunohistochemical analysis, indicating disruption of spindle checkpoint at M phase (Taniai *et al.*, 2012b). These results suggest that carcinogens facilitating target cell proliferation induce aberrant cell cycle control including dysfunction of M phase players, indicating the early cellular events responsible for the carcinogenesis. Furthermore, we have also recently found that such hepatocarcinogens specifically downregulated *Rbl2*, upregulated *Mdm2* and increased the number of phosphorylated-MDM2 (p-MDM2)⁺ cells, reflecting disruption of G₁/S checkpoint function, as well as aberrant UBD expression at G₂ phase, after 28 days in a time-course study of 3, 7 and 28 days of administration (Kimura *et al.*, 2015). These results suggest that it may take 28 days to direct liver cells to hepatocarcinogen-specific disruption of cell cycle regulation. However, some hepatocarcinogens that do not induce cell proliferation, such as piperonyl butoxide, do not show disruption of cell cycle regulation (Taniai *et al.*, 2012b). It is of interest to investigate the time course of cell cycle regulation after a longer duration of repeated administration of such carcinogens. Moreover, whether carcinogenic promoters induce disruption of cell cycle regulation after repeated administration has not been addressed.

The present study was aimed to clarify the involvement of these cell cycle-related proteins after 90 days of repeated administration of hepatocarcinogens or hepatocarcinogenic promoters that do or do not facilitate cell proliferation after 28 days of administration. For this purpose, rats were repeatedly administered with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic promoters or non-carcinogenic hepatotoxicants for up to 90 days, followed by examination by immunohistochemistry and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of the temporal changes in expression of G₁/S, G₂/M and spindle checkpoint-related molecules, as well as cell proliferation activity and apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Oxfendazole (OX; CAS No. 53716-50-0, purity > 98.0%) was purchased from Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Acetaminophen (APAP; CAS No. 103-90-2, purity ≥ 98.0%) and methapyrilene (MP; CAS No. 135-23-9) were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). β-Naphthoflavone (BNF; CAS No. 6051-87-2, purity ≥ 98%), carbadox (CRB; CAS No. 6804-07-5, purity ≥ 99%), leucomalachite green (LMG; CAS No. 129-73-7, purity ≥ 98%), thioacetamide (TAA; CAS No. 62-55-5, purity > 98%), promethazine (PMZ; CAS No. 58-33-3, purity > 98%) and methyl cellulose 400 were purchased from Wako Pure Chemicals Industries (Osaka, Japan).

Animal experiments

Five-week-old male F344/NSlc rats were purchased from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan), and acclimatized to a powdered basal diet (CRF-1; Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) and tap water *ad libitum* for one week. Rats were housed in plastic cages in a barrier animal room under standard conditions (room temperature, 23 ± 3°C; relative humidity, 50 ± 20%; 12-hr light/dark cycle).

Animals were administered with hepatocarcinogens (MP, TAA, CRB or LMG), hepatocarcinogenic promoters (BNF or OX) or non-carcinogenic hepatotoxicants (APAP or PMZ). Animals were repeatedly administered with test chemicals for 7 days and 28 days (MP, CRB, LMG, BNF, OX and PMZ), and for 90 days (MP, TAA, CRB, LMG, BNF, OX, APAP and PMZ). After cessation of repeated administration, cell proliferation activity, expression of cell cycle-related molecules and apoptosis were examined in the liver using immunohistochemistry and/or real-time RT-PCR.

MP, TAA and CRB were selected as hepatocarcinogens (Becker, 1983; King, 1976; NTP, 2000). LMG was selected as a hepatocarcinogen that is known to exert marginal hepatocarcinogenicity after a two-year feed study (NTP, 2005). BNF and OX were selected as hepatocarcinogenic promoters (Mitsumori *et al.*, 1997; Shoda *et al.*, 2000), and APAP and PMZ were selected as non-carcinogenic hepatotoxicants (NTP, 1993a, 1993b). OX did not induce hepatic tumors in a long-term administration study using rats or mice (WHO, 1991), and BNF is regarded as non-carcinogenic, because it was not mutagenic and did not have tumor initiation activity in rat liver (Hayashi *et al.*, 2012; McKillop and Case, 1991).

In the administration experiment for 7 or 28 days, animals were divided into seven groups based on the ini-