

201524016A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための
短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究

(研究課題番号 H26-化学-指定-001)

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉見 直己

平成28(2016)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発 吉見 直己	1-8
II. 分担研究報告	
1. 大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発 吉見 直己	9-10
2. 胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発 塚本 徹哉	11-13
3. 遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発 魏 民	15-17
4. 肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発 横平 政直	19-25
5. 前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発 鈴木 周五	27-28
6. 膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発 小川 久美子	29-31
7. 網羅的なDNA付加体解析法を用いた化学物質のDNA損傷性評価 戸塚 ゆ加里	33-35
8. ヒストン修飾を指標としたin vitro発がんリスク評価系の開発 伊吹 裕子	37-39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41-44
IV. 研究班名簿	45

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究

総括研究者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

化学物質は毎年新規に開発され、その一部は Ames 試験等の変異原試験陽性が含まれ、ヒトに対する発がんへの安全性の確認が必要であるものの、最近では動物愛護の観点で、動物における発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難であるため、本研究では発がん性を検証するために病理組織診断法を利用した短・中期のバイオアッセイ系の開発を目的とした。臓器により、免疫組織化学法を含む病理組織学的に、微小の腫瘍性病変を特定できる解析法の検討を始めた(大腸・肺臓・肝臓)。他の臓器でも in vitro 系との組み合わせによる DNA 損傷依存的ヒストン修飾酵素である γ H2AX を予測マーカーとした早期病巣の特定とその特徴解析を検討した。加えて、分担者間での多施設での動物臓器供与のシステムの構築に関して検討するために、一部搬送して専門家領域での検討を行った。今後作成したマニュアルの修正と検証していく予定である。

研究分担者	所属機関	職名
吉見 直己	琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座	教授
塚本 徹哉	藤田保健衛生大学・病理学	准教授
魏 民	大阪市立大学大学院医学研究科・分子病理学	准教授
横平 政直	香川大学医学部・病理学	准教授
小川 久美子	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター 病理部・実験病理学	部長
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
戸塚 ゆ加里	国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野	ユニット長
伊吹 裕子	静岡県立大学・食品栄養科学部・環境生命科学科	教授

慮すべきものである。このため、腫瘍形成を正確に判定し得る病理組織学的な評価を基とした各臓器別の発がん試験として短・中期でのバイオアッセイ系の開発はその一つの解決策と考えている。実際、ヒトの場合においても各臓器のがんの早期発見がその治療と予後に重要な関与があることは周知の事実である。実際、ヒトのがんの診断に病理組織診断が利用されるようになった。150年ほどの間に、生検標本での病理診断技術の発達は、内視鏡的にも病変を認めない場合でも、ランダム生検により、病理組織学的に異型細胞の存在は重要な診断価値があり、その後の精査の対象となっている。しかるに、未知物質の発がん性試験には長期動物実験による肉眼的な腫瘍形成を指標としており、その観察される腫瘍の病理組織学的な検索はあくまでも腫瘍組織を確定するためのものであった。しかし、動物実験においても従前より前がん病変として種々の早期に発現する病巣の研究がなされてきた。その多くの研究は腫瘍発生機序の視点でのものであり、微小な病理組織での判定はなされていなかった。このため、本研究では、前がん病変とされてきたものうち、その肉眼的な腫瘍形成に拘わらず、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものを指標とする試験法の開発を目指すことにした。

加えて、動物使用数を減少させるため、臓器専門性を有する多施設間での動物の共有システムの検討を目的とした。

B. 研究方法

- 1) 多施設共同システム構築

A. 研究目的

本研究では、短・中期発がん予測バイオアッセイ系の開発と検証が目的である。結果としてガイドライン提唱を目指している。既にヨーロッパ・ユーロ圏の諸国での研究施設では、特に化粧品関連物質に関しては、法的に動物実験系ができなくなるため、代替実験法が開発が急がれ、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞での方法論は、生体での変化を確認することは困難である。そのため、動物モデルでの評価法はいまだに必要不可欠と考えられるが、国際的に動物試験に対する 3R（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）の原則は、動物系実験を肯定的に考える我々研究者も当然考

昨年度(26年度)、多施設共同評価のために作成した動物処理マニュアルを用いて、多施設間で臓器を担当施設に搬送し、その分野での病理組織学的変化を呈する病変を検討した。実際の方法は、以下の各臓器の項に記載した。

2) 中・短期バイオアッセイ系

① 胃

4種類の発がん物質を強制胃内投与して、胃粘膜上皮細胞のDNA障害性を γ H2AXの発現を指標に検討した。胃粘膜を採取後、ホルマリン固定しパラフィン切片を作製した。 γ H2AX免疫染色を施行した。胃底腺、幽門腺領域に関して、腺管あたりの γ H2AX陽性細胞数をカウントした。

② 大腸

1. 多施設共同システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

香川大、名市大、国立衛研からの検体に関しては検討した。

香川大では肺臓モデルに使用されるN,N-bis(2-hydroxypropyl)nitrous amine (DHPN)を飲料水として、またUrethane, N-Nitrosodimethylamine (DMN), Benzopyrene(BP)はi.p.処理され、16週ないし32週後の雄F344ラット大腸粘膜を観察した。名市大は3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB), N-Nitroso-N-methylurea (MNU), N-Nitrosodimethylamine (DMN), 1,2-dimethylhydrazine (DMH)を4週間i.g.投与されたF344ラット大腸粘膜、国立衛研からは2-Acetamidofluorene (2-AAF), p-Cresidine, dimethylarsenic acid (DMA), Glycidol, N-Nitrosodiethylamine (DEN), acrylamideをそれぞれ種々の投与方法で処理された雄F344ラットないし雄B6C3F1マウス大腸粘膜を観察した。

2. マウス二段階大腸発がんモデルでの aberrant crypt foci (ACF) と mucin-depleted foci (MDF) の確認

5週齢の雄性ICRマウス21匹にAOM(10 mg/kg BW)を1回腹腔内投与し、その1週間後から1.5% dextran sulfate sodiumを7日間飲水投与した。実験開始から12週目に大腸を摘出し、メチレンブルー染色によるACFとアルシアンブルー染色によるMDFの測定及び3 mm以上の隆起性病変について病理組織学的解析を行った。

③ 肝臓

1. 非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の解明

6週齢の雌雄F344ラットを2群に分け、それぞれにダンマル樹脂を0、2% (肝発がん用量)の濃度で混餌投与を4週間行った。剖検時は吸入麻酔による安楽死後、肝臓を採取し、 -80°C に

て冷凍保存した。肝臓よりTrizol (invitrogen)にてmRNAを抽出し、RT-for-PCR Kit (clontech)にて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。得られたcDNAをqPCR法にて細胞増殖因子(PCNA, cyclin D1)、アポトーシス関連遺伝子(BAX, PUMA, Bcl-2, BCL2L1, MCL1, Survivin)、P450関連遺伝子(CYP1A1, 1B1, 2A1, 2A1, 2B1, 2B2, 2C6, 2C11, 2E1, 3A1, 3A2, 4A1, 4A2)の発現変動について検討した。

2. 多施設共同システムでの肝臓における γ H2AXの検討

各施設で実施した4週間試験で得られた肝臓標本について免疫組織染色を行い、 γ H2AXの標識率を検討した。試験プロトコールは以下の通りである。国立衛研・小川により実施された試験では、6週齢の雄F344ラットに250 ppm 2-acetamidofluorene (2-AAF)、10000 ppm p-cresidine、200 ppm dimethylarsenic acid (DMA)、400 ppm glycidol、10 ppm N-nitrosodiethylamine (DEN)、または5 ppm acrylamide (AA)を4週間投与した(2-AAF, p-cresidineのみ混餌、他は飲水投与)。名市大・鈴木により実施された試験では、6週齢F344雄ラットに、2 mg/kg dimethylnitrosamine (DMN)、5 mg/kg 7,12-dimethyl benz [a] anthracene (DMBA)、5 mg/kg methylnitrosourea (MNU)、5 mg/kg 1,2-dimethylhydrazine (DMH)で週5回強制胃内投与を4週間行った。大阪市大・魏により実施した試験では、6週齢F344雄ラットに、2%ダンマル樹脂を4週間混餌投与した。

④ 肺臓

実験1

8週齢のF344ラット46匹を4群に分け、それぞれ1群:12匹、2群:13匹、3群:12匹、4群:13匹とした。実験開始の0週目から発がん物質を投与した。1群には水道水を溶媒とした0.1%DHPNをラットの自由に2週間飲水投与し、2群にはurethaneを1g/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に1g urethaneの濃度で溶解)で1週間おきに合計10回腹腔内投与した。3群では、実験開始時に30mg/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に30mg DMNの濃度で溶解)で単回の腹腔内投与を行った。3群では、実験開始時に30mg/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に30mg DMNの濃度で溶解)で単回の腹腔内投与を行った。4群には実験開始時にbenzo[a]pyreneを20mg/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に1g benzo[a]pyreneの濃度で溶解)で単回の気管内投与を行った。実験開始16週目と32週目で各群約半数ずつ解剖を行い、解剖時には肺、肝、腎、膀胱、前立腺、胃、大腸を摘出した。肺

では、肺内へのホルマリン注入固定と肺重量測定のため、以下の操作を行った。

(a) 摘出直後の心臓、胸腺、肺が一塊となった状態で重量を測定する。

(b) 肺に固定液を気管より注入する。肺に固定液を注入しない状態では肺泡が収縮した状態であり、病変（特に過形成）の診断が困難になる。ピンセットで気管切断口をつまんで閉じたまま、気管切断部よりやや尾側の気管本幹に注射針（25G針）を刺入する。全ての肺葉が膨らむまで固定液を注入する。注入しすぎると肺胞壁が破壊されるため、適切な圧での注入が要求される。

(c) 注入後、それぞれの肺葉を全て気管より切離し、6葉すべてを固定液中に浸漬する。気管、心臓、胸腺が残る。

(d) 残った心臓、胸腺、気管の重量を測定し、(a)から差し引くと正確な肺の実重量が算出される。

肝、膀胱、前立腺、胃、大腸については、本研究班の臓器取り扱いマニュアルに従って処理を行い、それぞれを分担研究者に送付した（Napsin A 以外の検討のため）。

実験 2

7週齢のA/Jマウスに1群:urethane 5.0mg/head、2群:NNK 2.0mg/head、3群:benzo[a]pyrene 1.0mg/headをそれぞれ腹腔内投与し、26週後に実験終了した。以上は日本たばこ産業株式会社で行われ、各群5匹ずつの肺のパラフィンブロックを借用し検討を行った（無償貸与）。

免疫組織学的検討

Napsin Aの染色に関しては、実験1のラット肺については、NCL-L-Napsin A (Liquid concentrated monoclonal antibody) (Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK)を1:100の希釈倍率(15分)で染色した。実験2のマウス肺では、rabbit anti-napsin A polyclonal antibody(bs-4753R, Bioss antibodies, MA, USA)を1:50の希釈倍率(1時間)で染色した。

⑤ 膀胱

6週齢の雄B6C3F1マウスに、0.025% 2-acetamidofluorene (2-AAF)、1% p-cresidine、0.01% dimethylarsenic acid (DMA)、0.04% glycidol、0.001% N-nitrosodiethylamine (DEN)、または0.005% acrylamide (AA)を4週間(2-AAF, p-cresidineのみ混餌、他は飲水)投与した。各群10匹を用い、投与終了時に5匹、2週間の休薬後に5匹を解剖した。膀胱を採材し、尿路上皮における γ H2AXおよびKi67の発現を免疫組織化学的に解析した。膀胱を採材し、尿路上皮における γ H2AXおよびKi67の発現を免疫組織化学的に解析した。また、0.05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)、0.6% 2-nitroanisole (2-NA)、0.125% 2,2-bis (bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、0.45% melamine、または3% uracilの混餌投与実験(BBNのみ飲水)を同様に実施した。

⑥ 前立腺

6週齢F344雄ラットに、DMAB、MNU、1,2-Dimethylhydrazine (DMH)を5mg/kg、Dimethylnitrosamine (DMN)を2mg/kgで週に5回強制胃内投与し、4週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。肝臓、大腸、膀胱および血液を各分担研究者に要望された状態(凍結およびホルマリン固定)で送付した。

前立腺組織については免疫組織染色を行い、 γ H2AX、HMGB2およびKi67の標識率を検討した。

分担研究者より頂いた前立腺組織を標本作製し、免疫組織染色を行い、 γ H2AX、HMGB2およびKi67の標識率を検討した。今回解析した前立腺組織は、6週齢F344雄ラットに、対照群および、2-acetylaminofluorene (2-AAF) 0.025%、p-cresidine 1%、dimethylarsinic acid (DMA)、0.2-0.1%、glycidol 0.04%、diethylnitrosamine 0.001%、acrylamide 0.005%を4週間投与した実験から得られたものである。

3) 新規 in vitro 発がん性予測試験

① 網羅的なDNA付加体解析法

肝臓組織は多施設共同システムで採取された大阪市大より供給され、雄性F344ラット(各群それぞれ5匹)に2-AAFを0.02%の濃度で4週間混餌を行った。また、DENは0.001%の濃度で4週間飲水投与を行った。2週間の休薬の後、肝臓を摘出した。DNAを抽出後、各種ヌクレアーゼによりDNAをモノヌクレオシドに分解し、DNA付加体を質量分析機器を用いて解析した。

得られたデータを主成分(PCA)解析により解析し、それぞれの化学物質投与に相関する付加体の抽出を実施した。今年度はまず、AAF及びDENに由来する既知付加体の生成について検討を行った。

② ヒストン修飾を指標とした解析法

In vivo 中・短期バイオアッセイ系実験で採取した肝臓からヒストンを抽出し、各種ヒストンの化学修飾をウエスタンブロット法で検出した。

倫理面への配慮

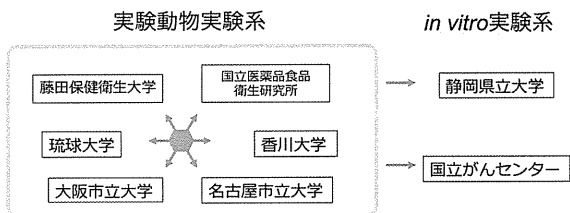
全ての分担者の動物施設におけるの規程に基づいて、実験計画の許可とともに、遺伝子を利用する場合はそれぞれの施設での組み換えDNA実験委員会の許可を得、厳正に動物愛護と倫理面を配慮した実験を施行した。特に動物試験における3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則を遵守した。

C. 研究結果

1) 多施設共同システム構築

下図のように、各施設でのマニュアルに沿う形で摘出された臓器を一部施設間ないし一方向で搬送した。

実際の結果は、以下の各臓器の項に記載した。



2) 中・短期バイオアッセイ系

① 胃

1. 既知の胃発がん物質 MNU により胃腺管増殖帯で γ H2AX 陽性細胞の増加が見られた(胃底腺、幽門腺とも)。
2. 胃発がん性の報告されていない DMN、DMH では γ H2AX 陽性細胞の増加なし。予想通りの結果であった。
3. 胃発がん性の報告されていない DMAB で γ H2AX 陽性細胞数増加を認め、胃発がん性の検討を要した。

② 大腸

1. 多施設共同システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

名市大、国立衛研からの大腸粘膜では、ACF は観察されなかった。

香川大の検体のうち、0.1%DHPN2 週間飲水投与大腸粘膜に、ACF を 25.7 ± 9.2 (16 週), 29.0 ± 9.7 (32 週) を観察した。4 個以上の腺管を有するものも観察され、一部その組織像も確認したが、明らかな異型腺管増生を認め、微小腺腫と考えられ、対象物質の主なる標的臓器ではないために、顕在化しないまでも、物質の発がん性の可能性を示唆された。また、BP においても、32 週で 1.75 ± 0.96 と少数ながら観察された。

2. マウス二段階大腸発がんモデルでの ACF と MDF の確認

今回の 12 週時でのマウスの系ではラットにおける MDF は確認できず、ACF のみ確認できた。ACF は 23.8 ± 14.3 で、ラットに比べて比較的発生数は少なかった。3mm 以上の隆起性病変のうち、9 個に異型腺管増生を認め、うち 8 個は高異型腺腫ないし高分化型管状腺癌を認めた。

③ 肝臓

1. 非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の解明

細胞増殖能の指標である PCNA 及び cyclin D1 の発現量が無処置群と比較してダンマル樹脂投与群の雌雄のいずれにおいても有意な増加は認められなかった。一方、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現量が無処置群と比較して、ダンマル樹脂投与群の雌ラットで有意な変化はみとめられなかったが、雄ラットでは有意な増加が認められた。P450 遺伝子の発現量解析の結果、無処置群と比較してダンマル樹脂投与群の雌雄ともに CYP1A1、CYP2B1、CYP2B2 及び CYP3A1 の発現量が有意に増加した。一方、CYP2C6、CYP2E1 及び CYP3A2

の発現量がダンマル樹脂投与群の雄ラットのみで有意に増加した。

2. 多施設共同システムでの肝臓における γ H2AX の検討

肝臓における γ H2AX の標識率を検討した結果、遺伝毒性肝発がん物質投与群において、対照群と比較して 2-AAF 群で有意に増加したが、DEN 群と DMN 群では有意な増加は認められなかった。遺伝毒性非肝発がん物質投与群において、p-cresidine 群、glycidol 群、AA 群、DMBA 群及び MNU 群で γ -H2AX の標識率の有意な増加は認められなかったが、DMH 群では有意に増加した。非遺伝毒性肝発がん物質であるダンマル樹脂及び非遺伝毒性非肝発がん物質である DMA を投与した肝臓では γ H2AX の標識率は対照群と有意な差はなかった。

④ 肺臓

実験 1

過去の文献に基づき、実験開始時、4 群の benzo[a]pyrene について、70% ethanol を溶媒として使用する計画であった (20mg/kg body weight の用量、10ml 70% ethanol に 1g benzo[a]pyrene の濃度で溶解)。しかし、投与直後に死亡例が続出したため、急遽、溶媒を生理的食塩水に変更し同様の濃度、用量で投与を行った。この時、3 匹が死亡し、4 群について 16 週 : 5 匹、32 週 : 5 匹 (合計 10 匹) の計画に変更した。実験開始日に 4 群で 3 匹死亡例が発生したが、それ以外に死亡例はない。16 週目では最終的に、1 群 : 6 匹、2 群 : 6 匹、3 群 6 匹、4 群 : 5 匹を解剖した。体重では、3 群 (DMN) および 4 群 (Benzo[a]pyrene) と比べ 2 群 (urethane) では有意な減少を認めた。相対肺重量は、4 群と比べ 1 群では有意な上昇が見られた。その他の項目に群間で有意な差は認められなかった。16 週目における摘出肺の肉眼所見は、3 群 (DMN) を除くすべての群で、肺表面が粗造な印象であった。また、1 群 (DHPN)、2 群 (urethane)、3 群 (DMN) のいずれも、肺表面に小結節が認められた。組織学的には 1 群では hyperplasia、adenoma、lymphocyte infiltration が、2 群では hyperplasia lymphocyte infiltration が、3 群と 4 群では hyperplasia が見られた。Hyperplasia は形態的に炎症性と推測されるのを区別して評価した。

32 週目では最終的に、1 群 : 5 匹、2 群 : 6 匹、3 群 6 匹、4 群 : 5 匹を解剖した。32 週解剖時の体重および臓器重量を表 1 に示した。体重では、各群間に有意差は認められなかった。絶対及び相対肺重量は、2 群および 4 群と比べて 1 群では有意な上昇が見られた。その他の項目に有意な群間差は認められなかった。32 週目における摘出肺の肉眼所見は、すべての群で、肺表面が粗造な印象であった。組織学的には 1 群および 3 群では hyperplasia、adenoma、lymphocyte infiltration

が、2群および4群では hyperplasia、lymphocyte infiltration が見られた。Hyperplasia は形態的に炎症性と推測されるのを区別して評価した。

Napsin A の発現について、DHPN、MNU、Urethane 誘発の hyperplasia には Napsin A の壁内高発現が認められた。正常上皮の発現と比較して発現が上昇していた。炎症性と思われる hyperplasia (Urethane、Benzo[a]pyrene 誘発) にも Napsin A の壁内発現が見られたが、正常上皮の発現と比べてコントラストは乏しい印象であった。

実験 2

Urethane、NNK、B[a]P に誘発された Hyperplasia および adenoma において、Napsin A の肺胞壁内における高発現が確認された。この高発現は、正常肺胞壁と比較し、顕著に認められた。以上の所見はラットの肺過形成における Napsin A の陽性所見とほぼ同様の印象であった。

⑤ 膀胱

遺伝毒性膀胱発がん物質である 2-AAF および p-cresidine を 4 週間投与したマウス膀胱上皮には、ラットと同様に γ H2AX の発現が高頻度に認められた一方、対照群にはほとんど観察されなかった。細胞 1000 個あたりの γ H2AX 陽性細胞数 (±SD) は、2-AAF 群 34 ± 28 および p-cresidine 群 34 ± 14 で、対照群 1.1 ± 0.7 と比較して有意に高かった。膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質 (glycidol, DEN, AA) 投与群では、 γ H2AX 陽性細胞数はそれぞれ 0.3 ± 0.3 、 0.3 ± 0.3 ならびに 1.0 ± 0.9 と、対照群と同じレベルであった。2 週間の休薬後、すべての群で γ H2AX 発現は減少したものの、2-AAF および p-cresidine 群では比較的多くの残存が認められた。Ki67 発現は、p-cresidine 群で 4 週時に有意な上昇がみられたが、休薬後にはすべての群が対照群と同じレベルにまで低下した。現在、BBN など残る 6 物質についても同様の解析を進めており、マウスを用いた遺伝毒性膀胱発がん物質早期検出指標としての γ H2AX の有用性を検討する予定である。

⑥ 前立腺

4 週間の経口投与実験においても、 γ -H2AX、HMGB2 および Ki67 いずれにおいても 2 日間投与実験と同様の結果が得られた。これは、28 日間反復経口投与毒性試験で得られた前立腺組織において、上記 3 遺伝子の免疫組織化学染色における核陽性率が、発がん予測法として使用できる可能性を示した。

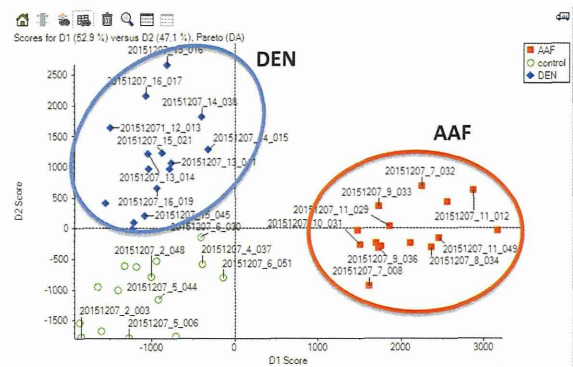
また、分担研究者より頂いた前立腺に標的性がないと言われている種々の発がん物質を投与された前立腺組織における検討の結果、体重の高度減少を認めた 2-AAF において、 γ H2AX の有意な上昇、Ki67 の有意な低下が存在した。一方、DMA において、HMGB2 および Ki67 の有意な上昇が存在した。IARC monographs によると、疫学調査において飲水内砒素レベルと前立腺癌死亡率に有意な

相関があるという報告があり、今回の結果は、砒素が前立腺発がん物質である可能性を示す結果となった。一方で、動物実験において、砒素の前立腺発がんを疑う情報は今現在のところ認められず、今回のデータは最初の報告となる。

3) 新規 in vitro 発がん性予測試験

① 網羅的な DNA 付加体解析法

2-AAF を投与したマウス肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なった結果を下図に示す。主成分 (PCA) 解析を行なったところ、各投与群毎のクラスターに分類されることがわかった。2-AAF は代謝活性化の後にデオキシグアノシンの C8 位または N2 位と結合し、DNA 付加体を生成することから、まずはこれら付加体の m/z 値を指標に AAF-dG 付加体の生成について調べてみた。その結果、AAF-dG に相当する m/z 値 [M+H: 489.2] を示すシグナルが、AAF 投与群に多く検出された。一方、DEN についても同様にアダクトーム解析を行った。DEN はデオキシグアノシンの O6 位へのメチル化 (O6-MedG) がその主要な付加体であることから、O6-MedG に相当する m/z 値 [M+H: 298.1] を示すシグナルを探索したところ、該当するシグナルは DEN 投与群に多く検出された。現在、これら投与化学物質に由来する付加体以外の付加体の生成に関して、アダクトーム法を用いて検索している。



② ヒストン修飾を指標とした解析法

In vivo 中・短期バイオアッセイ系実験で採取した肝臓からのヒストンの化学修飾を解析した結果、例えば DEN を投与したラットにおいて、強いヒストンのアセチル化 (Total, K9, K14) が検出された。ヒストン H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) と同時に別のヒストン修飾変化を検出することにより、 γ -H2AX を予測マーカーとして使用することの有意性を高められる可能性がある。

D. 考察

前年度までに、懸案であった多施設間共有システム構築のための臓器摘出マニュアルを作成したが、その実際の運用に関して、今年度は具体的に可能性を検討した。大腸に関しては、既に発がん性の可能性を示唆する早期病変の ACF を、肺に関しては Napsin A の免疫

組織化学による同定を、標的臓器が異なる発がん物質の実験系で得られた臓器を使用し、検索された。また、その他の臓器に関しては、in vitro 系での研究成果であるバイオマーカー γ H2AX の発現を同様に、本来、標的臓器が異なる発がん物質の実験系で得られた臓器での発現を検討した。結果として、全体的には標的臓器でない臓器では、多くは早期病変 ACF や NapsinA の発現は認めず、また、バイオマーカー γ H2AX の各臓器における早期発現性に関して、標的臓器以外の臓器では必ずしも、発現しなかった。ネガティブ結果ではあるもの、結果自体は多施設共同システムの有用性を否定するものではないと考えられ、逆に、試験物質を検討する上では、臓器別のエキスパート診断により精度を高く維持しながら、相対的に動物数の軽減につながると考えられる。実際、肺癌モデルで利用される N,N-bis(2-hydroxypropyl) nitrous amine (DHPN) において、従来、大腸は標的臓器としての文献的な報告はみられないものの、今回、大腸粘膜で ACF および微小腺腫と考えられる小巣が多数に認められた。従来の発がん試験では、顕在化した腫瘍性病変のみでの検索であったことを考えると、臓器特異的な専門家による病理組織学的検索の重要性を示唆するものであり、本研究班での目的でもある病理組織学的な早期病変の同定の意義を示唆するものと考えられる。多施設共同による体制づくりが将来的に必要なと思われる。また、同時に、こうした動物を含む病理組織診断ができる臓器別専門家の育成も、極めの細かな検査体制を実施するためにも、必須である。

また、目的である病変の検出に関しては、大腸・肺臓・肝臓以外において、in vitro 系から提案された γ H2AX が膀胱において、その可能性を示唆され、本研究班での他臓器においても、早期病変での変化として考えられる可能性を有した。上述の多施設共同システムにおいても、標的臓器以外には発現していないようであり、来年度は拡げて検索したいと考えている。

E. 結論

動物を供する発がん試験における代替法の確立は、化学物質のヒトへの安全性に対して重要である。しかし、動物実験に対する 3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則は決して動物を使用しないということではないため、今回の研究目標はその精神に基づいて動物での発がん、すなわち、従来からの顕在化による腫瘍形成を、早期での病変の病理組織学的な検索で予測することを目指しており、その方法の中で、多施設共同システムの構築による専門家集団での効果を模索できることが示唆され、加えて、新たなバイオマーカー γ H2AX 発現の有用の可能性をみた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 著書発表

- 1) 塚本徹哉、基礎から学ぶ胃癌の病理：胃粘膜の正常構造・分化に基づいた胃生検診断 (Group

分類) へのアプローチ、日本メディカルセンター、東京、2015

- 2) Tsukamoto T., et al. Chapter 22 Helicobacter. Liu, D, Laboratory Models for Foodborne Infections, Taylor and Francis, CRC Press, London, UK, in press.

2. 論文発表

- 1) Morioka T, Yoshimi N et al. Ionizing radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in Mh1-deficient mice. *Cancer Sci*, 106: 217-226, 2015.
- 2) Cao D, Tsukamoto T et al. Canolol Inhibits Gastric Tumors Initiation and Progression through COX-2/PGE2 Pathway in K19-C2mE Transgenic Mice. *PLoS One*. 10: e0120938, 2015.
- 3) Tsukamoto H, Tsukamoto T et al. Preventive effect of rebamipide on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 67: 271-277, 2015.
- 4) Cao D, Tsukamoto T et al. The Protective Effects of 18beta-Glycyrrhetic Acid on Helicobacter pylori-Infected Gastric Mucosa in Mongolian Gerbils. *Biomed Res Int*. 2016: 4943793, 2016.
- 5) Jiang J, Tsukamoto T et al. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate effectively inhibits Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate effectively inhibits Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Clin Exp Med*. 9: 2479-2485, 2016.
- 6) Kiriya Y, Tsukamoto T et al. Gastric-and-Intestinal Mixed Intestinal Metaplasia is Irreversible Point with Eradication of Helicobacter Pylori. *Open J Pathol*. 6: 93-104, 2016.
- 7) Toyoda T, Ogawa K, Tsukamoto T et al. Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter*. 21: 131-142, 2016.
- 8) Shimoda M, Tsukamoto T et al. Epithelial cell-derived a disintegrin and metalloproteinase-17 confers resistance to colonic inflammation through EGFR activation. *EBioMedicine*. in press.
- 9) 塚本徹哉 他. 10. 胃癌と萎縮性胃炎, 腸上皮化生. I. 胃癌診療に必要な基礎知識. 特集:胃癌の診療. *臨牀消化器内科*. 30: 787-93, 2015.

- 10) Gi M et al. Modifying effects of 1,2-dichloropropane on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced cholangiocarcinogenesis in male Syrian hamsters. *J Toxicol Sci.* 40: 647-656, 2015.
- 11) Xie XL, Gi M et al. Ethanol-extracted propolis enhances BBN-initiated urinary bladder carcinogenesis via non-mutagenic mechanisms in rats. *Food Chem Toxicol.* 83: 193-200, 2015.
- 12) Gi M et al. Determination of hepatotoxicity and its Underlying metabolic basis of 1,2-dichloropropane in male syrian hamsters and B6C3F1 mice. *Toxicol Sci.* 145: 196-208, 2015.
- 13) Hayashi N, Suzuki S et al. A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages. *Mol Cancer Ther.* 14: 452-460, 2015.
- 14) Sagawa H, Suzuki S et al. Connexin 32 and luteolin play protective roles in nonalcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* 36: 1539-1549, 2015.
- 15) Kato, A, Susuki, S et al. Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3 β and ERK1/2. *Oncotarget.* in press.
- 16) Kato, H, Suzuki, S et al. Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget.* in press.
- 17) 佐藤慎哉、鈴木周五 他 肝癌の危険因子と発がん機序。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.
- 18) Toyoda T, Ogawa K et al. Early detection of genotoxic urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for γ -H2AX. *Toxicol Sci.* 148: 400-408, 2015.
- 19) Onami S, Ogawa K et al. Orally administered glycidol and its fatty acid esters as well as 3-MCPD fatty acid esters are metabolized to 3-MCPD in the F344 rat. *Regul Toxicol Pharmacol.* 73: 726-731, 2015.
- 20) Goto K, Ogawa K. Lanthanum deposition is frequently observed in the gastric mucosa of dialysis patients with lanthanum carbonate therapy: a clinicopathologic study of 13 cases, including 1 case of lanthanum granuloma in the colon and 2 nongranulomatous gastric cases. *Int J Surg Pathol.* 24: 89-92, 2016.
- 21) Ishino K, Totsuka Y et al. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 16: 3474-3492, 2015.
- 22) Komiya M, Totsuka Y et al. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* 106: 1499-1505, 2015.
- 23) Zhao X, Ibuki Y et al. γ -H2AX induced by linear alkylbenzene sulfonates is due to deoxyribonuclease-1 translocation to the nucleus via actin disruption. *Mutat Res.* 777: 33-42, 2015.
- 24) Ibuki Y. et al. γ -H2AX is a sensitive marker of DNA damage induced by metabolically activated 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Toxicol. in vitro.* 29: 1831-1838, 2015.
- 25) Zhao X, Ibuki Y et al. New mechanism of γ -H2AX generation: Surfactant-induced actin disruption causes deoxyribonuclease I translocation to the nucleus and forms DNA double-strand breaks. *Mutat Res.* 794: 1-7, 2015.

3. 学会発表

- 1) 渡慶次愛、吉見直己 他 沖縄産天然物質 A のマウス大腸発がんモデルにおける抑制効果。第 32 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2016 年 1 月、高松
- 2) 塚本徹哉 他 ヒト胃発がん過程における形質変化と DNA 損傷マーカーの発現。第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月、名古屋
- 3) Kiriyaama, Y, Tsukamoto, T. Histological irreversible point with eradication of *H. pylori*: Comparison of gastric and intestinal-metaplastic glands. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2015 年 10 月、名古屋
- 4) Kiriyaama Y, Tsukamoto T. Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia as an irreversible point with eradication of *Helicobacter pylori* in the human stomach, AACR-JCA 10th Joint Conference, 2016, Lahaina, Hawaii, USA
- 5) 魏 民 他 ダンマル樹脂の F344 ラットを用いたがん原性試験：ダンマル樹脂はラット肝発がん物質である。第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋
- 6) 豊田武士、小川久美子 他 DNA 二重鎖切断マーカー (γ H2AX) を指標とした遺伝毒性膀胱発がん

- ん物質の早期検出. 第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月、金沢
- 7) 豊田武士、小川久美子 他 γ H2AX 免疫染色による遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋
 - 8) Toyoda T, Ogawa K et al. Expression of γ H2AX as a biomarker of genotoxic carcinogen in the urinary bladder of rats. American Association for Cancer Research Annual Meeting. April, 2015, Philadelphia
 - 9) 曾根瑞季、小川久美子 他 γ H2AX を用いた遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出系構築- マウスでの検討. 第 32 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2016 年 1 月、高松
 - 10) 鈴木周五 他 Pioglitazone によるラット前立腺発がん抑制効果. 第 104 回日本病理学会総会、2015 年 5 月、名古屋
 - 11) 鈴木周五 他 Pioglitazone によるラット前立腺発がん抑制効果. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋
 - 12) 内木綾、鈴木周五 他 ラット前立腺癌に対するルテオリンの化学予防・治療効果. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋
 - 13) 鈴木周五 他 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝発がん抑制効果. 第 32 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2016 年 1 月、高松
 - 14) 戸塚ゆ加里 他 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明. 第 42 回日本毒性学会学術大会、2015 年 6 月、金沢
 - 15) Totsuka Y et al. Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋
 - 16) 戸塚ゆ加里 ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索. 第 44 回日本環境変異原学会、2015 年 12 月、福岡
 - 17) 秋場 望、戸塚ゆ加里 他 職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響. 第 44 回日本環境変異原学会、2015 年 12 月、福岡
 - 18) Ibuki Y Histone modifications induced by chemicals and change of sensitivity to UV. 15th International Conference of Radiation Research (Kyoto), May 2015, Kyoto
 - 19) 豊岡達士、伊吹裕子 他 リン酸化ヒストン H2AX を指標とした化学物質遺伝毒性試験法構築に向けた基礎的検討. 第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2015 年 10 月、南知多
 - 20) 楊光、伊吹裕子 タバコ副流煙暴露による紫外線 DNA 損傷修復の遅延とアルデヒド類の関連性. 第 44 回日本環境変異原学会、2015 年 11 月、福岡
 - 21) 荻野真宏、伊吹裕子 他 熱ストレスによるヒストン H2AX のリン酸化とその機構. 第 44 回日本環境変異原学会、2015 年 11 月、福岡
 - 22) 豊岡達士、伊吹裕子 他 リン酸化ヒストン H2AX を指標とした化学物質遺伝毒性評価手法構築に関する基礎的検討. 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 11 月、福岡
 - 23) 楊光、伊吹裕子 タバコ副流煙はヒト皮膚細胞の紫外線感受性を亢進させる. 富士山麓アカデミック&サイエンスフェア、2015 年 12 月、富士
 - 24) 荻野真宏、伊吹裕子 他 DNA 損傷能を有さない熱ストレスがなぜ γ -H2AX を誘導するか?. 富士山麓アカデミック&サイエンスフェア、2015 年 12 月、富士

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Ⅱ. 分担研究報告書

大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発に関する研究

研究分担者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

本研究の目的の一つは、多施設で実施される動物実験の共有化であり、専門にしていな施設での臓器特有病変の検索のためのマニュアルを昨年度に作成した。そのマニュアルを用いて、他施設で得られた大腸粘膜の検討を実施し、従来、大腸発がんの報告がなされていない化学物質の一部に、当施設で提唱するラット大腸前がん病変を少数確認した。また、マウス二段階大腸発がんモデルでの大腸前がん病変に関して検討したところ、ラット大腸発がんモデルのような粘液枯渇病巣(mucin-depleted foci ; MDF)の特定が困難であったが、隆起性変化を呈する大腸変異巣(aberrant crypt foci ; ACF)は特定できた。

A. 研究目的

ヒト大腸発がん過程において、腺腫・癌連鎖仮説で説明がつかない平坦型大腸癌が最近注目されている。動物モデルでみられる mucin-depleted foci (MDF)は平坦型の前がん病変の可能性がある。そのため、従前から動物モデルでの前がん病変として認識され、発がん予測バイオマーカーとして利用されている aberrant crypt foci (ACF)との病理組織学的な経時的な変化に関して検討し、本研究目的である中・短期での発がん試験への利用の可能性を検討した。

加えて、多施設での専門領域別エキスパート診断による発がん性予測検索法の開発の可能性の検証を、昨年度に作成した臓器摘出マニュアルを用いて、多施設での動物実験から得られる大腸粘膜で検討した。

B. 研究方法

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

香川大, 名市大, 国立衛研からの検体に関して検討した。香川大では肺臓モデルに使用される N,N-bis(2-hydroxypropyl)nitrous amine (DHPN)を飲料水として、また Urethane, N-Nitrosodimethylamine (DMN), Benzopyrene (BP)は i. p. 処理され、16 週ないし 32 週後の雄 F344 ラット大腸粘膜を観察した。名市大は 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB), N-Nitroso-N-methylurea (MNU), N-Nitrosodimethylamine (DMN), 1,2-dimethylhydrazine (DMH)を 4 週間 i. g. 投与された雄 F344 ラット大腸粘膜、国立衛研からは 2-Acetamidofluorene (2-AAF), p-Cresidine, dimethylarsenic acid (DMA), Glycidol, N-Nitrosodiethylamine (DEN), acrylamide をそれぞれ種々の投与方法で処理された雄 F344 ラットないし雄 B6C3F1 マウス大腸粘膜を観察した。

2. マウス二段階大腸発がんモデルでの ACF と MDF の確認

5 週齢の雄性 ICR マウス 21 匹に azoxymethane (10 mg/kg BW)を 1 回腹腔内投与し、その 1 週間後から 1.5% dextran sulfate sodium を 7 日間飲水投与した。実験開始から 12 週目に大腸を摘出し、ACF および MDF の測定および 3 mm 以上の隆起性病変について病理組織学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、琉球大学動物実験施設の実験動物委員会から動物実験の許可を得て、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。

C. 研究結果

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

名市大, 国立衛研からの大腸粘膜では、ACF は観察されなかった。

香川大の検体のうち、0.1%DHPN2 週間飲水投与大腸粘膜に、ACF を 25.7 ± 9.2 (16 週), 29.0 ± 9.7 (32 週)を観察した。4 個以上の腺管を有するものも観察され、一部その組織像も確認したが、明らかな異型腺管増生を認め、微少腺腫と考えられ、対象物質の主なる標的臓器ではないために、顕在化しないまでも、物質の発がん性を有する可能性が示唆された。また、BP においても、32 週で 1.75 ± 0.96 と少数ながら観察された。尚、検討された他物質では ACF および MDF の検出はなかった。

2. マウス二段階大腸発がんモデルでの ACF と MDF の確認

今回の 12 週時でのマウスの系ではラットにおける MDF は確認できず、ACF のみ確認できた。ACF は 23.8 ± 14.3 で、ラットに比べて比較的発生数は少なかった。3mm 以上の隆起性病変のうち、9 個に異型腺管増生を認め、うち 8 個は高異型腺腫

ないし高分化型管状腺癌を認めた。

D. 考察

昨年度までに、懸案であった多施設間共有システム構築のための共有臓器摘出マニュアルを作成したが、実際に、多施設における動物実験で得られた大腸粘膜での検討において、肺がんモデルで利用される DHPN や BP において、従来、大腸は標的臓器としての文献的な報告はみられないものの、今回、大腸粘膜で ACF および微小腺腫と考えられる小巣が多数認められた。従来の発がん試験では、顕在化した腫瘍性病変のみでの検索であったことを考えると、臓器特異的な専門家による病理組織学的検索の重要性を示唆したものと思われる。本研究班での目的でもある病理組織学的な早期病変の同定の重要性が示されるとともに、発がん性未知の化学物質を検討する上で、こうした多施設での共同試験システムにより、精度を高く維持しながら、相対的に動物数の軽減につながられると考えられた。

尚、マウス二段階大腸発がんモデルでは期待していた MDF の発現は特定できず、ACF での予測にのみが可能と思われ、動物種の違いを改めて確認した。

E. 結論

マウスモデルでの大腸に関する発がん性予測は ACF により可能と考えられた。また、新規化学物質リスク予測に、多施設共同システムの構築とそのエキスパートによる病理組織診断により、発がん予測を模索できると思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morioka T, Yoshimi N et al. Ionizing radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in Mhl1-deficient mice. Cancer Sci, 106: 217-226, 2015.

2. 学会発表

- 1) 渡慶次愛、高松玲佳、新垣和也、仲地里織、吉見直己： 沖縄産天然物質 A のマウス大腸発癌モデルにおける抑制効果。第 32 回日本毒性病理学会総会及び学術総会, 2016 年 1 月、高松

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発

研究分担者 塚本徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染による慢性炎症は、様々な遺伝子異常や発現異常を誘発し、胃発がんに至る。本研究では、【実験1】ラットに種々の発がん物質を暴露し、胃粘膜の γ -H2AXの応答を定期的に検討した。その結果、幽門腺、胃底腺とも、Control群に対して、既知の胃発がん物質であるN-methyl-N-nitrosourea (MNU)投与群で有意に γ -H2AX発現細胞の増加があったが、間接発がん物質であり胃発がん性の報告がない3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)においても胃底腺領域で γ -H2AX発現細胞数の上昇が見られ、DMABの胃発がん性の検討が必要と考えられた。【実験2】ヒト胃癌における γ -H2AX発現の検討では、p53が正常(low)のものでは γ -H2AX low (反応性低下)が多く、p53が異常のものでは γ -H2AX high (反応性良好)が多く(P<0.001, Fisher's exact test)、 γ -H2AXとp53の異常は比較的独立的に発生していると考えられた。さらに、両者に変異や発現異常が生じると単独の異常よりも予後が悪化するというデータが得られた。以上のことから、(1) γ -H2AXのDNA損傷刺激に対する短期の応答は臓器特異的な発がん性のスクリーニングに有用である可能性があること、(2) γ -H2AXにはp53と同様ながん抑制遺伝子としての役割があり、その両者の異常によって発がんに促進的に働くことが示唆された。

A. 研究目的

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は胃発がんの重要なリスクファクターであり、慢性炎症に伴う活性酸素によるDNA損傷、遺伝子のメチル化等による発現異常等が重要な要因と考えられている。DNA損傷によって、Ser139がリン酸化されたヒストンH2AX (γ -H2AX)がフォーカスを形成するが、発がん初期応答から発がんに至る過程における γ -H2AXの役割は十分解明されていない。本研究では種々の発がん物質を暴露したラット胃粘膜上皮での γ -H2AXの発現を検討した。また、ヒト胃癌を用いて γ -H2AXとがん抑制遺伝子p53の発現と予後を検討した。

B. 研究方法

【実験1：ラット】

平成27年度吉見班多施設共同研究において名古屋市立大学・鈴木周五博士がラットで行った実験の胃組織を用いて胃発がん性の検討を行った。すなわち、6週齢オスF344ラットに、5 mg/kg体重N-methyl-N-nitrosourea (MNU)、5 mg/kg体重3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)、2 mg/kg体重dimethylnitrosamine (DMN)、5 mg/kg体重1,2-dimethylhydrazine (DMH)を週5回x4週間強制胃内投与した。MNUは直接発がん物質であり、DMAB、DMN、DMHは間接発がん物質である。また、対照群には水を投与した。実験第28日に屠殺し、胃組織を採取し、胃体部前庭部境界部の一部よ

りtotal RNAを抽出し、残りをホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。Hematoxylin eosin (HE)染色および γ -H2AX (抗rabbit polyclonal抗体、Cell Signaling Technology)免疫染色を施行し、胃底腺、幽門腺領域に関して、腺管あたりの γ -H2AX陽性細胞数をカウントした。また、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)を内部標準にヒストンH2AX (h2afx)、p53に応答する分子としてp21waf1、幽門腺領域のpepsinogenとしてpepsinogen c (pgc)、胃底腺領域のpepsinogenとしてpepsinogen a5 (pga5)の遺伝子発現の変化をSYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kits, QIAGEN)を用いて定量的RT-PCR法により検討した。PCR primerの配列は以下の通りである。gapdh (forward: CTAAGTGGGCGTCTTCACCACCAT; reverse: TTGTCATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT)、h2afx (forward: GGGCCTAGCTATCCCTCTCCCT; reverse: CTGCAAAAGTTCAGTTCAGAAGCCAGA)、p21waf1 (forward: CACACAGGAGCAAAGTATGCCGTCGTC; reverse: TGGCGAAGTCAAAGTTCACCGTT)、pgc (forward: GTGCCACCACCGCCTTGCCAG; reverse: TGCCCACCGTTAGACCCCTG)、pga5 (forward: ACCTACCCAGTGCCAGCCAGT; reverse: ATCAAACACGGTGAAGTACAGCCTCAGGA)。数

値は Kruskal-Wallis test および Dunn's multiple comparisons test により統計学的に解析した。P<0.05 を有意と判断した。

【実験 2：ヒト胃がん】

ヒト胃がん 160 例について、胃がんブロックより直径 8mm のパンチ生検用器具を用いがん部分を採取し、合計 18 個の 5x2 組織アレイを作製した。臨床病理学的因子、術前化学療法 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) の有無、胃型・腸型形質発現、 γ -H2AX、p53、Ki-67 の免疫組織学的発現との関係を検討した。 γ -H2AX は、腫瘍の 10%以上が陽性的の場合：high (正常)、10%未満の場合：low (異常：反応性低下) と判定した。p53 は、正常組織と同様程度で増殖細胞で弱陽性的のもの (腫瘍の 5%未満) を score 0、腫瘍の 33%以下で陽性的のものを score 1、34-66%を score 2、67%以上を score 3A とした。Ki-67 値が高く強い増殖性を示すが p53 染色性の見られないものは nonsense mutation や homozygous deletion を考え score 3N とした。Score 0, 1 を p53low (正常)、score 2, 3A, 3N を p53high (異常：蓄積あるいは欠失) とした。Ki-67 は、腫瘍の 50%以上が陽性的の場合：high、50%未満の場合：low と判定した。胃型腸型マーカーとして、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、CDX2 の発現を検討した。MUC5AC あるいは MUC6 陽性的の腫瘍を胃型、MUC2 あるいは CD10 陽性的のものを腸型、胃型(G) および腸型(I)マーカーのいずれもが陽性的のものを胃腸混合型(GI)、いずれのマーカーも陰性的のものをヌル型(N)と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、藤田保健衛生大学医学部倫理審査委員会の承認を得、インフォームド・コンセントの得られた検体を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

動物実験は、動物の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議、2006 年) 及び藤田保健衛生大学動物実験取扱規定を遵守し、同大学動物実験委員会の承認のもとに遂行した。

C. 研究結果

【実験 1：ラット】

ラット胃底腺、幽門腺の増殖帯における 1 腺管あたりの γ -H2AX 陽性細胞数を計測した。Control 群、DMAB 群、MNU 群、DMN 群、DMH 群それぞれで、幽門腺領域では、 1.10 ± 0.52 、 1.66 ± 0.53 、 2.54 ± 0.33 、 1.42 ± 0.34 、 1.26 ± 0.35 個/腺管 (AVE \pm SD) と MNU 群 (P<0.01) で γ -H2AX 陽性細胞数の有意な上昇があった。胃底腺領域では、 1.37 ± 0.55 、 2.98 ± 0.94 、 3.26 ± 1.05 、 2.02 ± 0.50 、 2.06 ± 0.69 個/腺管 (AVE \pm SD) と、MNU 群 (P<0.01) のみならず DMAB 群 (P<0.01) でも γ -H2AX 陽性細胞数の有意な上昇が見られた。

各種遺伝子発現の検討では、各群間で有意な差は得られなかった。

【実験 2：ヒト胃がん】

症例の年齢は 31 から 86 才 (中央値 67 才)。男女比 111:49 例。早期がん 23 例、進行がん 137 例。組織像は、分化型 89 例、未分化型 71 例。胃・腸型形質は、胃型 31 例、腸型 47 例、胃腸混合型 59 例、ヌル型 23 例。術前化学療法施行例 56 例、未施行例 104 例であった。

ヒト胃がんにおける γ -H2AX と他の因子の発現の比較の検討では、 γ -H2AX の発現と p53 の染色性を比較すると、p53 が正常 (low) のものでは γ -H2AX low (反応性低下) が多く、p53 が異常のものでは γ -H2AX high が比較的多かった (P<0.001, Fisher's exact test)。 γ -H2AX と p53 の異常は比較的独立的に発生していると考えられた。

術前化学療法 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) の有無と γ -H2AX 発現を比較した結果では有意な変化は確認できなかった。

細胞増殖との関係では、Ki-67 陽性所見と γ -H2AX の発現傾向は、Ki-67 高値の症例で γ -H2AX high である傾向が見られた。

予後の検討では、 γ -H2AX low (反応性低下) と p53 high (異常：蓄積あるいは欠失) の組み合わせが最も予後が悪かった (Log rank test, P<0.05)。

D. 考察

【実験 1：ラット】

既知の胃発がん物質 MNU (直接発がん物質) により幽門腺、胃底腺領域とも、胃腺管増殖帯で γ -H2AX 陽性細胞の増加が見られ、胃発がん性の報告されていない DMN、DMH では γ -H2AX 陽性細胞の有意な増加はなく予想通りの結果であった。一方、胃発がん性の報告されていない DMAB で γ -H2AX 陽性細胞数増加が確認されたことから、DMAB の胃発がん性の検討を要すると考えられた。

以上の如く、組織学的に γ -H2AX 陽性細胞数を定量的に解析することで、化学物質の発がん性、DNA 損傷性を推測することが可能であった。また、短期アッセイおよび γ -H2AX 陽性細胞数の定量的解析によって、未知の胃発がん性物質のスクリーニングが可能となることが示唆された。

【実験 2：ヒト胃がん】

腫瘍における γ -H2AX 発現の報告では、肝前がん病変からがんに進展するに従って、その発現が増加するとの報告がある一方で、白血病や頭頸部扁平上皮がん H2AX 遺伝子 (*H2AFX*) の存在する染色体 11q23 領域の変異や欠失が起こるとの報告もある。また、*H2afx*(^{-/-})マウスでは、DNA 二重鎖切断の修復に障害が発生するとの報告もあり、がん抑制遺伝子としての側面を持つと考えられている。

本研究において解析を行った胃がんでは、

γ -H2AX と p53 の異常は比較的独立的に発生しており、両者に変異や発現異常が生じると単独の異常よりも予後が悪化するというデータが得られたことから、初期の DNA 損傷について、 γ -H2AX と p53 経路の両者を検討することが重要であると考えられた。

E. 結論

以上の結果より、(1) γ -H2AX の DNA 損傷刺激に対する短期の応答は臓器特異的な発がん性のスクリーニングに有用である可能性があること。(2) γ -H2AX には p53 と同様ながん抑制遺伝子としての役割があり、それらの異常によって発がんに促進的に働くことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cao D, Jiang J, Tsukamoto T, Liu R, Ma L, Jia Z, Kong F, Oshima M, Cao X. Canolol Inhibits Gastric Tumors Initiation and Progression through COX-2/PGE2 Pathway in K19-C2mE Transgenic Mice. *PLoS One* 2015; **10**: e0120938.
- 2) Tsukamoto H, Mizoshita T, Katano T, Hayashi N, Ozeki K, Ebi M, Shimura T, Mori Y, Tanida S, Kataoka H, Tsukamoto T, Tatematsu M, Joh T. Preventive effect of rebamipide on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2015; **67**: 271-7.
- 3) Cao D, Jiang J, You L, Jia Z, Tsukamoto T, Cai H, Wang S, Hou Z, Suo YE, Cao X. The Protective Effects of 18beta-Glycyrrhetic Acid on Helicobacter pylori-Infected Gastric Mucosa in Mongolian Gerbils. *Biomed Res Int* 2016; **2016**: 4943793.
- 4) Jiang J, Cao D, Jia Z, You L, Tsukamoto T, Hou Z, Suo Y, Wang S, Cao X. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate effectively inhibits Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Clin Exp Med* 2016; **9**: 2479-85.
- 5) Kiriya Y, Tahara T, Shibata T, Okubo M, Nakagawa M, Okabe A, Ohmiya N, Kuroda M, Sugioka A, Ichinose M, Tatematsu M, Tsukamoto T. Gastric-and-Intestinal Mixed Intestinal Metaplasia is Irreversible Point with Eradication of Helicobacter Pylori. *Open J Pathol* 2016; **6**, 93-104.
- 6) Toyoda T, Shi L, Takasu S, Cho YM, Kiriya Y, Nishikawa A, Ogawa K, Tatematsu M, Tsukamoto T.

Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 2016; **21**: 131-42.

- 7) Shimoda M, Horiuchi K, Sasaki A, Tsukamoto T, Okabayashi K, Hasegawa H, Kitagawa Y, Okada Y. Epithelial cell-derived a disintegrin and metalloproteinase-17 confers resistance to colonic inflammation through EGFR activation. *EBioMedicine* 2016; in press.
- 8) Tsukamoto T, Kiriya Y, Tatematsu M. Chapter 22 Helicobacter, Laboratory Models for Foodborne Infections, Ed. Liu D, Taylor and Francis, CRC Press, London, UK, 2016, in press.
- 9) 塚本徹哉, 基礎から学ぶ胃がんの病理: 胃粘膜の正常構造・分化に基づいた胃生検診断 (Group分類) へのアプローチ, 日本メディカルセンター, 東京, 2015
- 10) 塚本徹哉, 桐山諭和, 立松正衛, 10. 胃がんと萎縮性胃炎, 腸上皮化生. I. 胃がん診療に必要な基礎知識. 特集: 胃がんの診療. 臨牀消化器内科 30, 787-93, 2015

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) 塚本徹哉, 桐山諭和, ヒト胃発がん過程における形質変化と DNA 損傷マーカーの発現. 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年, 名古屋
- 2) Kiriya Y and Tsukamoto T, Histological irreversible point with eradication of *H. pylori*: Comparison of gastric and intestinal-metaplastic glands. 第 74 回日本癌学会総会, 2015 年, 名古屋
- 3) Kiriya Y and Tsukamoto T, Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia as an irreversible point with eradication of *Helicobacter pylori* in the human stomach, AACR-JCA 10th Joint Conference, 2016, Lahaina, Hawaii, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系を開発することを目的とする。実験1で、非遺伝毒性肝発がん物質であるダンマル樹脂の発がんメカニズムを明らかにすることと、非遺伝毒性肝発がん物質を検出できるモデルの開発に寄与する基礎データを提供することを目的とした。ダンマル樹脂を投与したラット肝組織を用いて解析した結果から、ダンマル樹脂の肝発がんメカニズムにアポトーシスの抑制が関与する可能性が考えられた。また、ダンマル樹脂が核内受容体 AhR、CAR および PXR の活性化を惹起する可能性が示唆された。これからの結果は、非遺伝毒性肝発がん物質の検索モデル開発に一助になるものと期待される。実験2では、本研究班で同定したラット遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出マーカーである γ -H2AX について、各班員から提供された肝臓組織を用いて、その遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マーカーとしての有用性を検討した。その結果、3種の遺伝毒性肝発がん物質のうち、2種では γ -H2AX 標識率の増加は認められなかった。その原因として、4週間の短期試験に用いられる用量に比して遺伝毒性肝発がん物質の投与量が低い可能性が考えられた。なお、遺伝毒性肝発がん物質以外の物質において7種のうち6種で γ -H2AX 標識率の増加は認められなかった。今後、 γ -H2AX の遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マーカーとしての有用性について、さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

これまでの研究成果により、変異原性を有する遺伝毒性肝発がん物質の検索において、*gpt delta* F344 ラットを用いた中期肝発がん性試験法を用いることで短期間に変異原性と肝発がん性を包括的に評価可能であると考えられる。一方、非遺伝毒性肝発がん物質を短期に検索できるモデルやバイオマーカーは未だ確立されていない。今回は、非遺伝毒性肝発がん物質を検出できる予測モデルの開発を試みた。予測モデル開発にあたって、ダンマル樹脂を被験物質として用いた。これまでに我々が行ったラットを用いた2年間発がん性試験および *in vivo* 変異原性試験で、ダンマル樹脂が変異原性を示さないこと、および雄ラットに対して肝発がん性を有することが明らかになったが、ダンマル樹脂の肝発がんメカニズムについては未だ検討されていない。そこで実験1で、ダンマル樹脂の肝発がんメカニズムを明らかにするとともに、非遺伝毒性肝発がん物質を検索できるモデルの開発に寄与する基礎データを提供することを目的とした。

γ -H2AX は、リン酸化されたヒストン H2AX である。DNA 二本鎖切断 (DSB) が生じた場合の細胞応答の一つで、 γ -H2AX が DSB の Hallmark であるとされている。また、DNA 損傷修復経路の活性化に γ -H2AX が関連することが報告されている。本研究班で、国立衛研・小川により γ -H2AX はラット遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出マーカーとして有用性であることが明らかとなった (Toyoda T et al ToxSci., 2015)。そこで実験2では、各班員から提供された肝臓組織を用いて、 γ -H2AX のラット遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マ

ーカーとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

実験1：非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の解明

6週齢の雌雄 F344 ラットを2群に分け、それぞれにダンマル樹脂を0、2% (肝発がん用量) の濃度で混餌投与を4週間行った。剖検時は吸入麻酔による安楽死後、肝臓を採取し、 -80°C にて凍結保存した。肝臓より Trizol (invitrogen)にて mRNA を抽出し、RT-for-PCR Kit (clontech)にて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を qPCR 法にて細胞増殖因子 (PCNA, cyclin D1)、アポトーシス関連遺伝子 (BAX, PUMA, Bcl-2, BCL2L1, MCL1, Survivin)、P450 関連遺伝子 (CYP1A1, 1B1, 2A1, 2A1, 2B1, 2B2, 2C6, 2C11, 2E1, 3A1, 3A2, 4A1, 4A2) の発現変動について検討した。

実験2： γ -H2AX のラットにおける遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マーカーとしての有用性の検討

各施設で実施した4週間試験で得られた肝臓標本について免疫組織染色を行い、 γ -H2AX の標識率を検討した。試験プロトコールは以下の通りである。国立衛研・小川により実施された試験では、6週齢の雄 F344 ラットに 250 ppm 2-acetamidofluorene (2-AAF)、10000 ppm *p*-cresidine、200 ppm dimethylarsenic acid (DMA)、400 ppm glycidol、10 ppm N-nitrosodiethylamine (DEN)、または 5 ppm acrylamide (AA) を4週間投与した (2-AAF、*p*-cresidine のみ混餌、他は飲水投与)。名市大・鈴木により実施された試験では、6週齢 F344 雄ラットに、2 mg/kg dimethylnitrosamine (DMN)、5 mg/kg

7,12-dimethyl benz [a] anthracene (DMBA)、5 mg/kg methylnitrosourea (MNU)、5 mg/kg 1,2-dimethylhydrazine (DMH) で週 5 回強制胃内投与を 4 週間行った。大阪市大・魏により実施した試験では、6 週齢 F344 雄ラットに、2%ダンマル樹脂を 4 週間混餌投与した。

(倫理面への配慮)

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないために麻酔下にて実施した。

C. 研究結果

実験 1：非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の解明

細胞増殖能の指標である PCNA 及び cyclin D1 の発現量が無処置群と比較してダンマル樹脂投与群の雌雄のいずれにおいても有意な増加は認められなかった。一方、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現量が無処置群と比較して、ダンマル樹脂投与群の雌ラットで有意な変化はみとめられなかったが、雄ラットでは有意な増加が認められた (図 1)。P450 遺伝子の発現量解析の結果、無処置群と比較してダンマル樹脂投与群の雌雄ともに CYP1A1、CYP2B1、CYP2B2 及び CYP3A1 の発現量が有意に増加した。一方、CYP2C6、CYP2E1 及び CYP3A2 の発現量がダンマル樹脂投与群の雄ラットのみで有意に増加した。

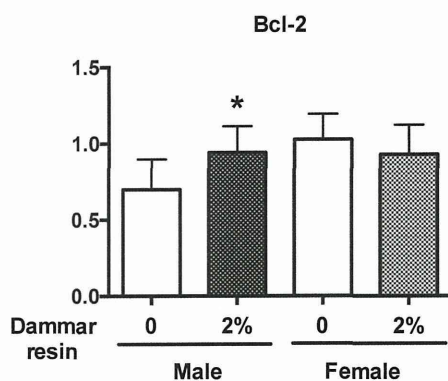


図 1 肝臓における Bcl-2 mRNA の発現

実験 2： γ -H2AX のラットにおける遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マーカーとしての有用性の検討

肝臓における γ -H2AX の標識率を検討した結果、遺伝毒性肝発がん物質投与群において、対照群と比較して

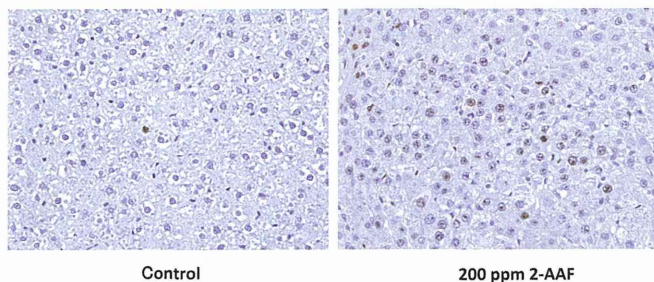


図 2 肝臓における γ -H2AX の発現

2-AAF 群で有意に増加したが (図 2, 3)、DEN 群と DMN 群では有意な増加は認められなかった (図 3)。遺伝毒性非肝発がん物質投与群において、p-cresidine 群、glycidol 群、AA 群、DMBA 群及び MNU 群で γ -H2AX の標識率の有意な増加は認められなかったが、DMH 群では有意に増加した (図 3)。非遺伝毒性肝発がん物質であるダンマル樹脂及び非遺伝毒性非肝発がん物質である DMA を投与した肝臓には γ -H2AX の標識率は対照群と有意な差はなかった (図 3)。

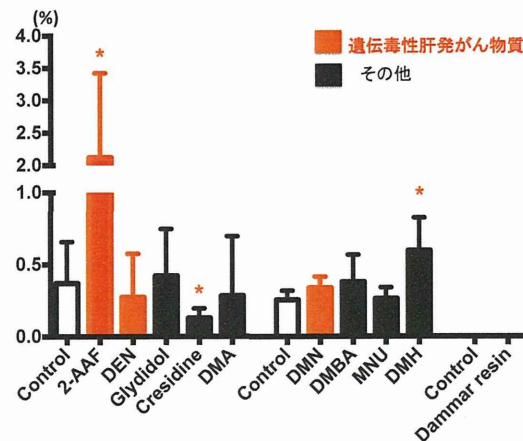


図 3 肝臓における γ -H2AX の標識率

D. 考察

実験 1：非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の解明

二年間発がん性試験において、ダンマル樹脂が雄ラットのみで肝発がん性を示した。今回のダンマル樹脂の 4 週間投与試験において、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現量がダンマル樹脂投与群の雄ラットのみで有意に増加したことから、ダンマル樹脂の肝発がんメカニズムにアポトーシスの抑制が関与する可能性が示唆された。また、ダンマル樹脂投与群の雌雄ともに、CYP1A、CYP2Bs 及び CYP3A の誘導が認められたことから、ダンマル樹脂の代謝に複数の CYP 代謝酵素が関与する可能性が示唆された。異物代謝に関与する核内受容体として AhR、CAR および PXR が知られている。これらの核内受容体はリガンドが結合すると、核内に移行して標的遺伝子の転写活性を制御することで肝発がん性に深く関与している。AhR、CAR および PXR がそれぞれラットの肝臓で薬物代謝酵素 CYP1、CYP2、CYP3 ファミリーを誘導することが知られている。したがって、ダンマル樹脂が AhR、CAR および PXR の活性化を惹起する可能性が考えられた。一方、CYP2C6、CYP2E1 及び CYP3A2 の発現量がダンマル樹脂投与群の雄ラットのみで有意に増加したことから、ダンマル樹脂の代謝及び核内受容体の活性化において性差がある可能性が示唆された。今後、AhR、CAR および PXR のタンパクレベルでの発現および発現の局在、核内転写活性などに関する性差及びその肝発がん性に及ぼす影響を検討する必要がある。

実験 2： γ -H2AX のラットにおける遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マーカーとしての有用性の検討

今回検討した3種の遺伝毒性肝発がん物質のうち、2種(DEN及びDMN)では γ -H2AX標識率の増加は認められなかった。その原因として、4週間の短期試験にしては投与量が低かった可能性が考えられた。

E. 結論

本研究の結果から、非遺伝毒性肝発がん物質であるダンマル樹脂の発がんメカニズムにアポトーシスの抑制が関与する可能性が考えられた。また、ダンマル樹脂が核内受容体 AhR、CAR および PXR の活性化を惹起する可能性が示唆された。これからの結果は、ダンマル樹脂の肝発がんメカニズム解明に寄与するとともに、非遺伝毒性肝発がん物質の検索モデル開発に一助になるものと期待される。また、 γ -H2AX の遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マーカーとしての有用性については、用量設定根拠を十分に吟味した上で用量を設定し、さらに検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gi M. et al. Modifying effects of 1,2-dichloropropane on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced cholangiocarcinogenesis in male Syrian hamsters. J Toxicol Sci 40: 647-656, 2015.

- 2) Xie X. L., Gi M. et al. Ethanol-extracted propolis enhances BBN-initiated urinary bladder carcinogenesis via non-mutagenic mechanisms in rats. Food Chem Toxicol 83: 193-200, 2015.
- 3) Gi M. et al. Determination of hepatotoxicity and its underlying metabolic basis of 1,2-dichloropropane in male syrian hamsters and B6C3F1 mice. Toxicol Sci 145: 196-208, 2015.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) 魏 民、他、ダンマル樹脂の F344 ラットを用いたがん原性試験：ダンマル樹脂はラット肝発がん物質である。第 73 回日本癌学会学術総会、2015 年、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし