

## 肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発に関する研究

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 准教授

### 研究要旨

本研究は動物の肺腫瘍モデルにおける早期病変について、将来の腫瘍化の推定が可能なマーカーの同定を目的としている。これまでにラットにおいて、肺早期病変である過形成病変に対する Napsin A の肺胞壁内細胞への高発現の有無により、腫瘍化リスクの判別の可能性が明らかになった。これは DHPN 誘発ラット肺腫瘍と quartz 誘発ラット肺（炎症性病変）の比較により確認されたものである。今回は、DHPN 以外の種々の発がん物質により誘導された肺過形成病変について、Napsin A が同様の染色性を示すことが確認された。また、ラットに加えて、マウスでも発がん物質による肺過形成病変の Napsin A の染色性が確認された。

### A. 研究目的

ラットの肺腫瘍誘発物質としては、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) (2 週間の飲水投与) が知られている。しかし、肺腫瘍発生までには約 30 週間と長期を要する。マウスでは、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の腹腔内投与による肺腫瘍モデルが存在するが、これも肺腫瘍発生までに最短で 12 週間を要する。

これらのモデルにおいて、早期に過形成病変が出現するが、将来、病変が消失するものと悪性化するものが混在している。特に、最近のナノテクノロジーの発展によって、ナノ粒子の吸入毒性が問題となっている。ナノ粒子の種類によっては時に過形成病変が発生する場合があります。この病変が、将来、腫瘍化リスクが高いのか否かを判別する方法も期待されている。

以上より、本研究では肺発癌の早期病変における将来の悪性化リスクを予想可能なマーカーの検索を目的とした。このマーカーにより、上記の期待に応えるのみでなく、早期病変での悪性化のメカニズムについて、新たな病理組織学的知見を得られる可能性がある。

これまでに、肺の早期腫瘍性病変の同定に有用なマーカーの候補の検索を目的とした研究を行ってきた。DHPN により誘導された過形成は経時的に腺腫、腺癌へ進展する。DHPN 投与により肺に生じた代表的な腫瘍性病変について、複数の抗体を検討し、候補となるマーカーの検索を行った。検討した複数の抗体は Cyclin D1、Napsin A、p27、Thyroid transcription factor 1 (TTF-1)、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34  $\beta$  E12、CK 5/6、surfactant proteins-A (SP-A)、p53、Endothelial growth factor receptor (EGF-R)、estrogen receptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )、progesterone receptor (PR)、carcinoembryonic antigen1 (CEA)、p16、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、chromogranin A および synaptophysin の 19 種類である。また、ラット肺の炎症性変化（炎症性過形成）についてもマーカーの発現を確認するための実験を行った。

各種微粒子 2mg を気管内投与後、28 日目のラット肺を用いてマーカーの発現を検討した。炎症を誘発する微粒子としては、quartz、NiO および CuO の 3 種類を用いた。これらの実験の結果、Napsin A が最有力候補として絞られた。

さらに、Napsin A は肺サーファクタント B の成熟に関与していることから、その発現機序解明を目的として、サーファクタントプロテイン (SP) の分子種である SP-A、B、C、D について染色を行い、napsin A の発現と比較検討を行った。用いた材料は DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍（腺系腫瘍、30 週）及び quartz 誘発 F344 雄ラット肺（炎症性変化、28 日目）の固定標本である。

以上の実験から、Napsin A は、肺に発生する過形成病変の将来の腫瘍化リスクについての判別に有用であることが判明した。また、Napsin A の発現は肺サーファクタンとプロテイン-B の発現に若干の相同性を示した。

これまでの研究による Napsin A の有用性は、肺腫瘍誘発物質として、DHPN のみを使用した検討の結果である。今回の研究は、DHPN 以外の発がん物質 (Urethane、dimethylnitrosamine (DMN)、Benzo[a]pyrene) により誘導されたラットの肺過形成病変についても Napsin A が同様の染色性を示すかについての確認を目的とした。さらに、マウスについても検証を行った。種々の発がん物質として、urethane、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)、Benzo[a]pyrene を用いて誘発した病変に対して検討を行った。

## B. 研究方法

### 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。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。

なお、実験に用いた発がん物質の詳細な情報は以下のとおりである。

\*DHPN : No. 14027、ナカライテスク株式会社 (京都)

\*Urethane : CAS no. 51-79-6、東京化成工業株式会社 (東京)

\*DMN: CAS no. 62-75-9、東京化成工業株式会社 (東京)

\* Benzo[a]pyrene: CAS no. 50-32-8、sigma-aldrich Co., LCC. (MO, USA)

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胞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)。

### (倫理面への配慮)

動物実験に先立ち、香川大学、総合生命科学研究センター、動物実験部門の動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

### 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。

## C. 研究結果

### 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。16 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、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 (図 1)。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 (図 2)。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。肉眼的、組織学的評価のまとめを表 2 に示した。

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。肉眼的、組織学的評価のまとめを表2に示した。

Napsin Aの発現について、DHPN、MNU、Urethane誘発のhyperplasiaにはNapsinA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(図1)。炎症性と思われるhyperplasia(Urethane、Benzo[a]pyrene誘発)にもNapsinA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(図2)。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。

## D. 考察

各発癌物質に誘発されたhyperplasiaにおいて、ラットおよびマウスともNapsin Aの肺胞壁内の高発現が確認された。Napsin Aは2型肺胞上皮に由来している。肺胞壁内で2型肺胞上皮が増殖する過形成は、腫瘍化能が高いと推測される。炎症性過形成の場合、肺胞壁で増殖している細胞は血管内皮細胞や組織球、線維芽細胞が推測され、Napsin Aの発現は低いと考えられる。今回、炎症性hyperplasiaの検討は実施できていないが、マウスの炎症性hyperplasiaは比較的発生頻度が低いため、今後の検討課題と言える。

また、他の分担担当者について、標的臓器は異なるが、多種の発癌物質を投与する検討を予定している。肺について増殖性病変が発生した場合、今後もNapsin Aの検討を行う予定である。本年度、分担研究者より(国立医薬品食品衛生研究所、小川久美子先生)、膀胱腫瘍をターゲットにした多種発癌剤投与後6週のラット肺組織の送付をいただいたが、組織学的に肺の増殖性病変は確認できなかった。

一方で、分担研究者は超早期マーカーとして $\gamma$ H2AXの有用性について研究を行っている。形態的な変化の見られない、超早期の肺についても腫瘍化の可能性が高い場合には、 $\gamma$ H2AXの発現が見られる可能性がある。肺における $\gamma$ H2AXの有用性の有無について何らかの結論を出すことを今後の検討課題としたい。

## E. 結論

肺過形成の腫瘍化リスクの判別におけるNapsin Aの有用性の検証を目的に実験を行った。ラットにおける多種の肺発がん物質(DHPN、Urethane、DMN、Benzo[a]pyrene)により誘導された肺過形成病変、マウスにおいてUrethane、NNK、B[a]Pに誘発された肺過形成病変のいずれも、Napsin Aの肺胞壁内高発現が確認された。ラットおよびマウスの過形成性病変におけるNapsin Aの高発現は将来の腫瘍化を示唆することが明らかになった。早期肺病変としての可逆性過形成と腫瘍性過形成の鑑別が可能であり、肺動物モデル試験系において有用なマーカーと期待される。

形態的な変化は見られないが、腫瘍化の可能性が高い実験早期の肺に $\gamma$ H2AXの発現が見られる可能性があり、今後の検討課題としたい。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K., Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66: 117-123, 2014.

Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 27(3-4):175-182, 2014.

### 2. 学会発表

横平政直; 山川けいこ; 中野裕子; 沼野琢旬; 岸宗佑; 二宮芙美子; 竿尾光祐; 今井田克己、Immunohistochemical characteristics of surfactant protein A, B, C and D in the lung of F344 rats.、第72回日本癌学会学術総会、2013.10

横平政直; 山川けいこ; 木内茂巳; 中野裕子; 二宮芙美子; 岸宗佑; 竿尾光祐; 今井田克己、Immunohistochemical characteristics of the lung proliferative lesions in F344 rats.、第71回日本癌学会総会、2012.09

## 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

表1、体重および臓器重量

Group Treatment	Wks No.	Body weight (g)	Liver		Right Kidney		Left kidney		Lung	
			Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
1 DHPN	16 6	292.8±8.1	8.1 ±0.3	2.8±0.1	0.9 ±0.0	0.3 ±0.0	0.8 ±0.0	0.3 ±0.0	1.5 ±0.5	0.5 ±0.2 <sup>b</sup>
2 Urethane	16 6	277.8±11.7 <sup>a,b</sup>	8.0 ±0.5	2.9±0.1	0.8 ±0.1	0.3 ±0.0	0.8 ±0.0	0.3 ±0.0	1.3 ±0.2	0.5 ±0.1
3 DMN	16 6	302.7±19.5	8.6 ±0.5	2.8±0.1	0.8 ±0.1	0.3 ±0.0	0.9 ±0.1	0.3 ±0.0	1.2 ±0.1	0.4 ±0.0
4 Benzo[a]pyrene	16 5	303.3±13.8	8.3 ±0.6	2.7±0.1	0.8 ±0.1	0.3 ±0.0	0.9 ±0.1	0.3 ±0.0	1.1 ±0.1	0.4 ±0.0
1 DHPN	32 5	307.6±22.9	8.2 ±0.8	2.7±0.2	0.9 ±0.0	0.3 ±0.0	1.0 ±0.1	0.3 ±0.1	2.6 ±0.2 <sup>c,d</sup>	0.9 ±0.1 <sup>c,d</sup>
2 Urethane	32 6	311.5±24.5	8.4 ±1.0	2.7±0.1	0.8 ±0.1	0.3 ±0.0	0.8 ±0.1	0.3 ±0.0	1.8 ±0.3	0.6 ±0.1
3 DMN	32 6	321.8±21.0	8.7 ±0.6	2.7±0.3	0.9 ±0.0	0.3 ±0.0	0.9 ±0.0	0.3 ±0.0	2.1 ±0.5 <sup>d</sup>	0.7 ±0.2
4 Benzo[a]pyrene	32 5	352.1±33.1	9.2 ±1.0	2.6±0.1	0.9 ±0.1	0.3 ±0.0	0.9 ±0.1	0.3 ±0.0	1.5 ±0.3	0.4 ±0.1

<sup>a</sup> P<0.05 vs Group 3 of 16w by Tukey-Kramer test.

<sup>b</sup> P<0.05 vs Group 4 of 16w by Tukey-Kramer test.

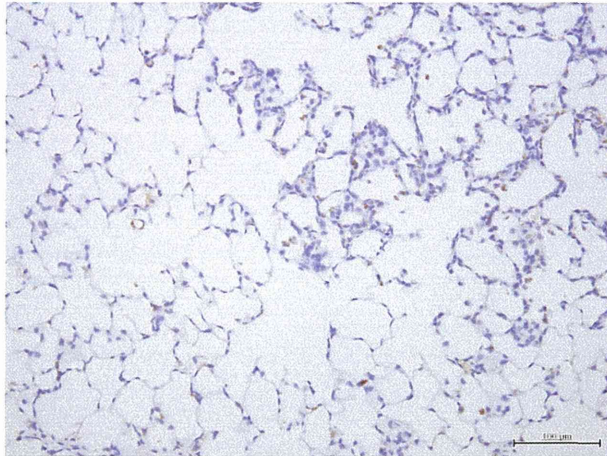
<sup>c</sup> P<0.05 vs Group 2 of 32w by Tukey-Kramer test.

<sup>d</sup> P<0.05 vs Group 4 of 32w by Tukey-Kramer test.

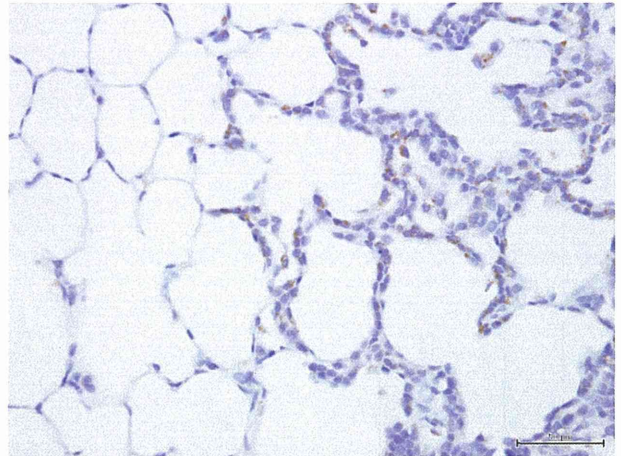
表 2、肺における病理組織学的所見

Histopathological findings of lung						
Weeks	Treatment	No.	Hyperplasia	Inflammatory hyperplasia	adenoma	lymphocyte (bronchus)
16	DHPN	6	6	2	3	3
16	Urethane	6	1	0	0	4
16	DMN	6	6	1	0	0
16	Benzo[a]pyrene	5	0	4	0	0
32	DHPN	5	5	0	3	5
32	Urethane	6	0	3	0	6
32	DMN	6	4	0	1	6
32	Benzo[a]pyrene	5	0	2	0	3

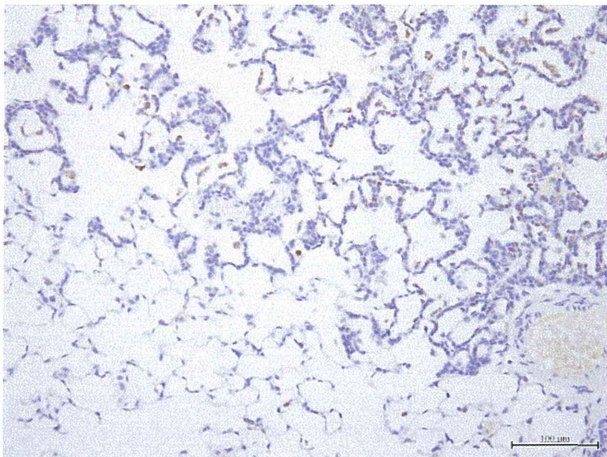
図1、ラット肺過形成病変の Napsin A の発現



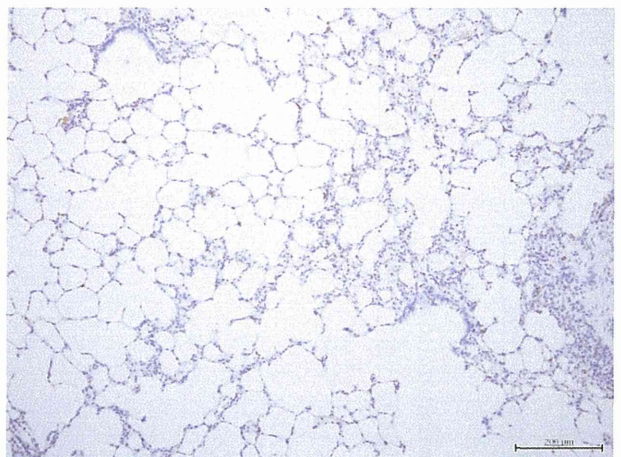
0.1%DHPN 2週間飲水投与、16w



DMN 30mg/kg i.p.×1、32w

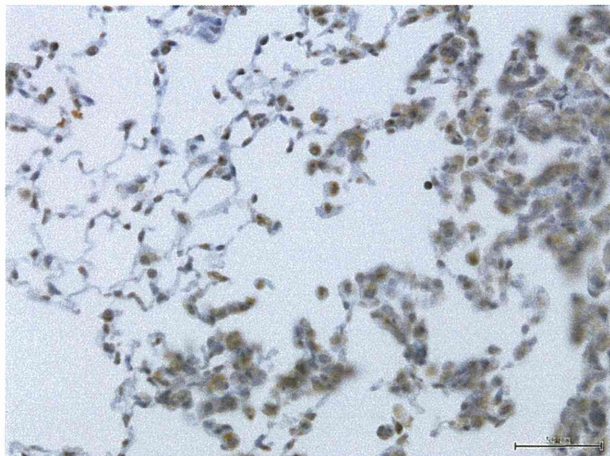


Urethane 1kg/kg i.p. ×10(毎週)、16w

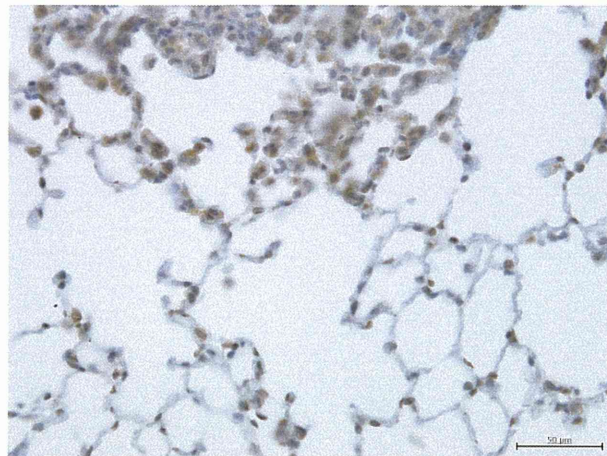


Benzo[a]pyrene 20mg/kg i.t.、32w

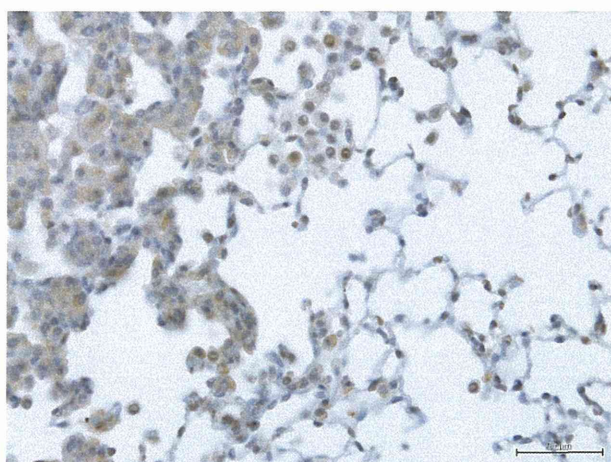
図 2、マウス肺過形成病変の Napsin A の発現



Urethane 5mg、26w



Benzo[a]pyrene 1mg、26w



NNK 2mg、26w

## 前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発

研究分担者 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 Ki67 発現が有意に上昇することを見いだした。一昨年までに、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、前立腺における発がん性の臓器特異性について、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2、Ki-67 標識率を検討し、HMGB2、Ki-67 については発がん指標となり得ることを示した。昨年度は、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。今年度は、28 日間反復経口投与毒性試験への応用を目標として、4 週間の DMAB および MNU を主体とする発がん物質の経口投与実験を行った結果、 $\gamma$ -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。また、DMA を 4 週間投与した前立腺において、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。

### 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 Ki67 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 Ki67 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相当である可能性が示唆された。

また、昨年度は、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、 $\gamma$ -H2AX はラットにおいて染色問題が生じたものの、ヒト  $\gamma$ -H2AX および、ラット・ヒト HMGB2 や Ki67 は腫瘍病変で有意な上昇を認めた。また、DMAB や N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) について、上記3つの遺伝子の発現変化は投与経路により変化せず、経口投与でも問題はないことを確認した。

今年度は、上記発がん指標となる3つの遺伝子発現について、既存の毒性試験などで得られた臓器において検討可能であるかを解析した。その際に、今回は28日間反復経口投与毒性試験への応用を目標として実験を行った。当実験において他の分担研究者が所望する各臓器を採取し、各施設へ送付した。また、他の分担研究者が行った種々の化学物質を4週間投与された試験から得られた前立腺組織についても、3つの遺伝子発現解析を同様に行った。



## B. 研究方法

6 週齢 F344 雄ラットに、DMAB、MNU、1,2-Dimethylhydrazine (DMH) を 5 mg/kg、Dimethylnitrosamine (DMN) を 2 mg/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、 $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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。

## C. 研究結果

4 週間の経口投与実験においても、 $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

外国語論文

- 1) Hayashi, N., Kataoka, H., Yano, S., Tanaka, M., Moriwaki, K., Akashi, H., Suzuki, S., Mori, Y., Kubota, E., Tanida, S., Takahashi, S., Joh, T.: A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages. *Mol Cancer Ther*, 14: 452-460, 2015.
- 2) Sagawa, H., Naiki-Ito, A., Kato, H., Naiki, T., Yamashita, Y., Suzuki, S., Sato, S.,

Shiomi, K., Kato, A., Kuno, T., Matsuo, Y., Kimura, M., Takeyama, H., Takahashi, S.: Connexin 32 and luteolin play protective roles in nonalcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 36(12): 1539-1549, 2015.

- 3) Kato, A., Naiki-Ito, A., Nakazawa, T., Hayashi, K., Naitoh, I., Miyabe, K., Shimizu, S., Kondo, H., Nishi, Y., Yoshida, M., Umemura, S., Hori, Y., Mori, T., Tsutsumi, M., Kuno, T., Suzuki, S., Kato, H., Ohara, H., Joh, T., Takahashi, S.: Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3 $\beta$  and ERK1/2. *Oncotarget*, in press.
- 4) Kato, H., Naiki-Ito, A., Naiki, T., Suzuki, S., Yamashita, Y., Sato, S., Sagawa, H., Kato, A., Kuno, T., Takahashi, S.: Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget*, in press.
- 5) 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、Pioglitazone によるラット前立腺発癌抑制効果、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 5 月、名古屋。
- 2) 鈴木周五、他、Pioglitazone によるラット前立腺発癌抑制効果、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋。
- 3) 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。
- 4) 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、香川。

## 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

## 膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発

研究分担者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長

### 研究要旨

本研究は、膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質を早期に検出できる指標の探索を目的としている。ラットを用いた昨年度までの検討により、DNA 二重鎖切断のマーカーである  $\gamma$ H2AX が、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。平成 27 年度は、マウスを用いた動物実験を実施し、 $\gamma$ H2AX 発現の種差について検討した。6 週齢の雄 B6C3F<sub>1</sub> マウスに、0.05% BBN、0.6% 2-NA、0.025% 2-AAF、1% *p*-Cresidine、0.125% BMP、0.1% PEITC、0.01% DMA、0.45% Melamine、3% Uracil、0.04% Glycidol、0.001% DEN および 0.005% AA を 4 週間混餌または飲水投与し、投与終了時または 2 週間の休薬後に各群 5 匹を解剖し、膀胱上皮での  $\gamma$ H2AX および Ki67 発現を免疫組織化学的に検索した。解析を終えた 6 物質（2-AAF、*p*-Cresidine、DMA、Glycidol、DEN、AA）のうち、遺伝毒性膀胱発がん物質である 2-AAF および *p*-Cresidine 投与群では、ラットと同様に  $\gamma$ H2AX 発現の有意な増加が認められた一方、マウス膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質（Glycidol、DEN、AA）投与群では対照群と同程度であった。この結果から、 $\gamma$ H2AX はマウスにおいても遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性が示唆された。一方で、2-AAF 投与ラットでは Ki67 発現の有意な増加がみられたのに対し、マウスでは対照群と同じ発現レベルにとどまった。今後、残る 6 物質の解析を進めるとともに、2-AAF 投与群における Ki67 発現のように、ラット/マウス間に認められた種差についても検討を加える予定である。

### A. 研究目的

近年、発がん過程における DNA 損傷・修復経路の重要性が明らかにされつつあり、特に DNA 二重鎖切断はゲノム不安定性の原因となる深刻な傷害と認識されている。DNA に二重鎖切断が生じると、ヒストン構成タンパクの一種である H2AX が速やかにリン酸化され、 $\gamma$ H2AX を形成する。 $\gamma$ H2AX は DNA 修復因子の結合標的となり、二重鎖切断修復に必須の役割を果たすことが知られている。 $\gamma$ H2AX は損傷部位から離れた領域まで広範囲に集積する特徴があり、特異抗体によって核内の小型点状巣として検出することが可能となっている。

本研究は、膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質を早期に検出できる指標の探索を目的としている。ラットを用いた昨年度までの検討により、DNA 二重鎖切断の鋭敏なマーカーである  $\gamma$ H2AX を、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。

$\gamma$ H2AX の有用性を詳細に検討するにあたり、化学物質による発がん感受性および標的性における種差の存在を考慮する必要がある。膀胱がんを例に挙げれば、*N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) はラット膀胱に乳頭状癌を誘発する一方、マウスに対しては浸潤癌が多いことがよく知られている。そこで、平成 27 年度はマウス膀胱を対象とした動物実験を実施し、 $\gamma$ H2AX 発現の種差について解析を行った。

### B. 研究方法

6 週齢の雄 B6C3F<sub>1</sub> マウスに、0.025%

2-Acetylaminofluorene (2-AAF)、1% *p*-Cresidine、0.01% Dimethylarsinic 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。さらに、0.05% 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。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  $\gamma$ H2AX、および細胞増殖マーカーである Ki67 の発現を免疫組織化学的に解析した。各個体につき約 3,000 個の膀胱上皮細胞を測定し、1,000 個あたりの陽性細胞数を算出した。さらに、cell population の解析として、基底層 (basal cell)、中間層 (intermediate cell) および表層 (umbrella cell) ごとの  $\gamma$ H2AX/Ki67 陽性細胞の割合についても併せて計測した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

### C. 研究結果

$\gamma$ H2AX は膀胱上皮細胞の核内にドット状の foci として観察された (図 1)。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  $\gamma$ 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  $\gamma$ H2AX 陽性細胞数 (±SD) は、2-AAF 群  $34 \pm 28$  および *p*-Cresidine 群  $34 \pm 14$  で、対照群  $1.1 \pm 0.7$  と比較して有意に高かった (図 2)。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、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞数はそれぞれ  $0.3 \pm 0.3$ ,  $0.3 \pm 0.3$  ならびに  $1.0 \pm 0.9$  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  $\gamma$ 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 発現については、*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 (図 3)。

cell population の解析では、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞は *p*-Cresidine 群では basal cell の割合が高かったが、2-AAF および DMA 群では umbrella cell の割合が高かった (図 4)。2 週間の休薬後、*p*-Cresidine 群でも basal cell が減少し、intermediate/umbrella cell が増加する傾向が認められた。

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、マウスにおける遺伝毒性膀胱発がん物質早期検出指標としての  $\gamma$ H2AX の有用性、ならびにラットとの種差を検討する予定である。

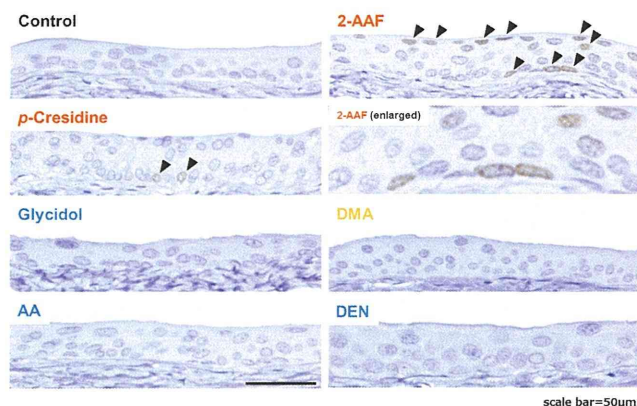


図 1. マウス膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ H2AX 発現 (矢頭:  $\gamma$ H2AX 陽性細胞)

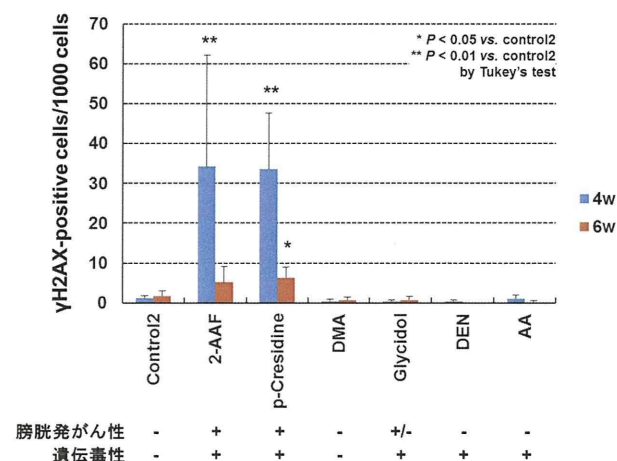


図 2. ラット膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ H2AX 陽性細胞の定量解析

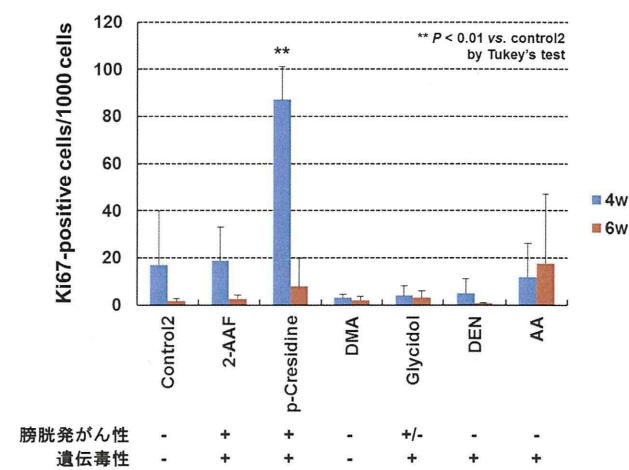


図 3. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析

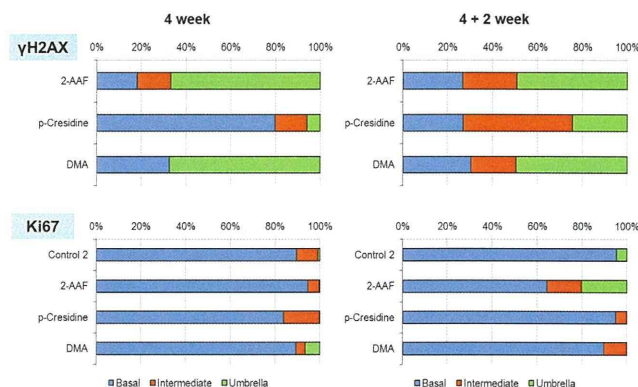


図 4.  $\gamma$ H2AX および Ki67 陽性細胞における basal/intermediate/umbrella cell の割合

#### D. 考察

マウス膀胱粘膜における  $\gamma$ H2AX 発現は、遺伝毒性膀胱発がん物質 (2-AAF, *p*-Cresidine) の投与で有意に増加した一方、膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質 (Glycidol, DEN, AA) では変動がみられなかった。これらの結果から、 $\gamma$ H2AX は遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として、マウスモデルにおいても有効である可能性が示唆された。

Ki67 発現については、*p*-Cresidine 投与群ではラットと同様に有意な陽性細胞の増加が観察されたのに対し、2-AAF 群ではラットと異なり、対照群とほぼ同じレベルであった。また、2-AAF 投与群ではラット・マウスともに  $\gamma$ H2AX 発現の有意な増加がみられたが、cell population の解析において、その陽性細胞の内訳は異なっていた。ラットでは basal cell での  $\gamma$ H2AX 発現が多数を占めていたが、マウスでは表層の umbrella cell の割合が高かった。2-AAF 投与によって、マウス膀胱の umbrella cell に細胞傷害が誘導されることが、超微形態学的研究によって示唆されている (Frith *et al.*, *Invest Urol*, 1981)。細胞傷害に関連した umbrella

cell の  $\gamma$ H2AX 発現は、BMP または DMA 投与ラットにも観察されている (Toyoda *et al.*, *Toxicol Sci*, 2015)。今回の結果は、2-AAF 代謝における種差によって、細胞傷害の標的が異なるものと推察された。

## E. 結論

本研究の結果から、 $\gamma$ H2AX 免疫染色によって、遺伝毒性膀胱発がん物質を短期間 (4 週間) の投与で検出される可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Hirata T, Nishikawa A, Ogawa K. Early detection of genotoxic urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. *Toxicol Sci*, 148: 400-408, 2015

2) Toyoda T, Shi L, Takasu S, Cho YM, Kiriyama 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*, 21: 131-142, 2016

3) Onami S, Cho YM, Toyoda T, Akagi J, Fujiwara S, Ochiai R, Tsujino K, Nishikawa A, Ogawa K. 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

4) 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

### 2. 学会発表

1) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of  $\gamma$ H2AX as a biomarker of genotoxic carcinogen in the urinary bladder of rats. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015, Philadelphia, 2015.4.21

2) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、平田直、西川秋佳、小川久美子. DNA 二重鎖切断マーカー ( $\gamma$ H2AX) を指標とした遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出. 第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、2015 年 6 月 30 日

3) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、平田直、西川秋佳、小川久美子.  $\gamma$ 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、名古屋、2015 年 10 月 8 日

4) 曾根瑞季、豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、平田直、西川秋佳、小川久美子.  $\gamma$ 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、高松、2016 年 1 月 29 日

## 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

## 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

研究分担者 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

### 研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法 (DNA アダクトーム法) の構築に取り組んできた。本年度は、遺伝毒性発がん物質である 2-Acetamidofluorene (AAF) 及び N-Nitrosodiethylamine (DEN) の遺伝毒性の評価を、ラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、LC-MS を用いたアダクトーム解析 (付加体の網羅的解析) により検討した。0.025% AAF 及び 0.001% DEN をラットに 4 週間投与し、肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。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。DEN はデオキシグアノシンの O6 位へのメチル化 ( $O^6$ -MedG) がその主要な付加体であることから、AAF と同様についても調べてみたところ、 $O^6$ -MedG に相当する m/z 値 [M+H: 298.1] を示すシグナルが、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。それぞれの化学物質に特徴的な付加体が検出された際には、これら付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう予定である。

### A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験 (変異原性試験)、コメットアッセイ (DNA 損傷試験)、小核試験 (染色体異常試験) などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考え。これまで我々は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法 (アダクトーム法) を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめてきた。また、昨年度は確立した LC-TOF-MS による DNA アダクトーム法を用いて、非遺伝毒性発がん物質のリスク評価をラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、DNA アダクトーム法で行う事の妥当性について検討した。今年度は、遺伝毒性発がん物質である 2-Acetamidofluorene (AAF) 及び N-Nitrosodiethylamine (DEN) の DNA 損傷性評価を、ラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討した。

### B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

### C. 研究結果

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図 1 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 (図 1)。一方、DEN についても同様にアダクトーム解析を行った。結果を図 2 に示す。DEN はデオキシグアノシンの O6 位へのメチル化 ( $O^6$ -MedG) がその主要な付加体であることから、 $O^6$ -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 (図 2)。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。

図1 2-AAF投与群及びDEN投与群のPCA解析結果

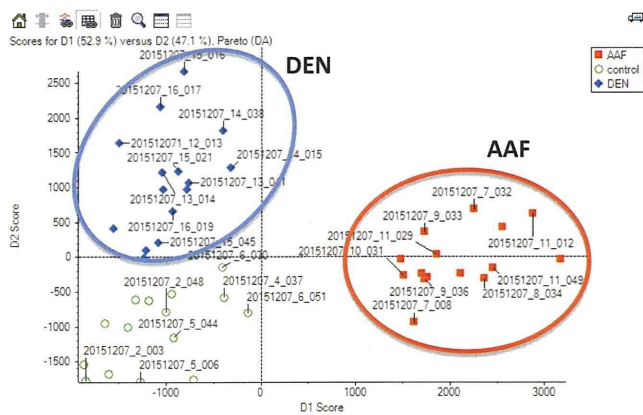


図2 2-AAF由来の付加体(2-AAF-dG)の探索結果

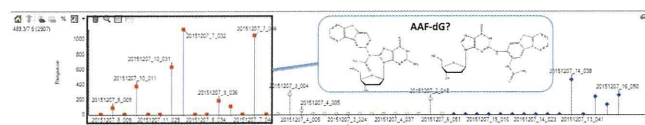
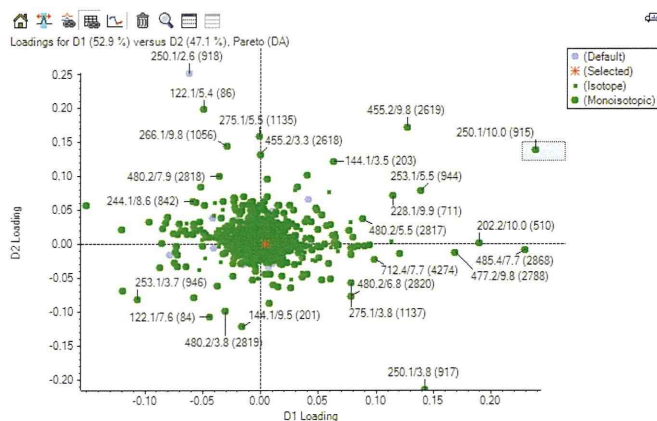
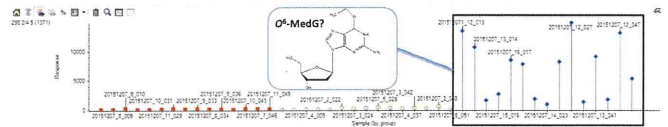
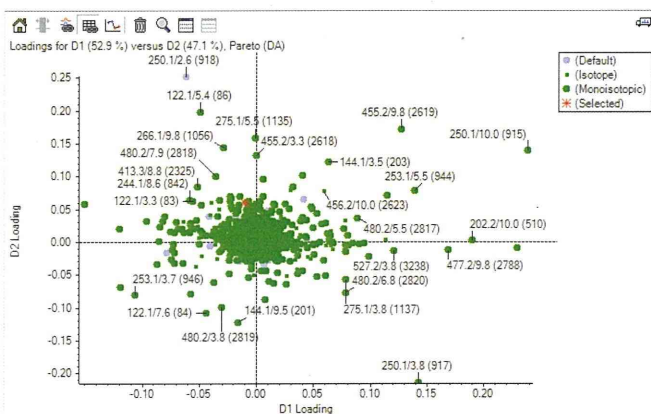


図3 DEN由来の付加体( $\beta$ -MedG)の探索結果



#### D. 考察

2-AAF及びDENを投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の解析を行なった。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。このことから、2-AAF及びDEN投与によって生成される付加体はそれぞれ異なったものであることが示唆された。また、2-AAF及びDEN投与に相關する付加体として、それぞれの既知付加体であるdG-C8-AAFまたはdG-N2-AAF、 $\beta$ -MedGの生成について確認した。dG-AAFまたは $\beta$ -MedGに相当するm/z値を示すシグナルが、それら化学物質投与群で多く検出されていた。よって2-AAFおよびDEN投与により、ラット肝臓にこれら化学物質が運搬・分布され、DNA損傷が誘発されたことを確認することが可能となった。現在、これら付加体以外の生成に関して、アダクトーム法を用いて検索し、それら付加体の類似性や差異などについて検討する予定である。それぞれの化学物質に特徴的な付加体が検出された際には、これら付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう事が必要である。更に、アダクトーム法の他の遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん物質のリスク評価への応用についても検討を行なう事が必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2015, Feb 4:16(2):3474-92.
- Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* 2015 Aug 27.

##### 2. 学会発表

- 戸塚ゆかり、中釜 斉：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7月
- Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : 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

3. 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
4. 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里：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

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

## 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

研究分担者 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

### 研究要旨

本研究ではヒストンの化学修飾に焦点をあてた新規 *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、最終的に本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系との対比検討を行うことにより、その有用性を確認することを目標としている。これまでに、中・短期動物発がん実験系において、各組織でヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) の検出が可能であることが示されている。ヒストン修飾変化を発がんリスク評価系としてさらに推し進めるために、昨年度の検討において偽陽性検出の可能性が示唆された、DNA 損傷を誘導しない界面活性剤による  $\gamma$ -H2AX 誘導メカニズムについて検討した。また、複数のヒストン修飾を指標とした *in vitro* 評価系構築の可能性を探るために、既に  $\gamma$ -H2AX の組織免疫化学的解析が行われている各種化学物質を投与したラット組織（肝臓、肺）からヒストンを抽出し、 $\gamma$ -H2AX ならびにヒストンアセチル化を解析した。

ヒト培養細胞における界面活性剤（LAS）処理による  $\gamma$ -H2AX の出現は、ZnCl<sub>2</sub> や EGTA により阻害された。ZnCl<sub>2</sub> や EGTA は、deoxyribonuclease I (DNase I) の阻害剤であり、界面活性剤作用後、DNase I が細胞質から細胞核へ移行し、DNA を切断することが確認された。この  $\gamma$ -H2AX の出現機構は、これまでに報告されてきた化学物質自身による DNA 損傷を起因とせず、細胞内 DNase I による DNA の切断という新しいものであることが示された。よって  $\gamma$ -H2AX 検出の際は、DNA 損傷に基づかない陽性反応に注意する必要がある。

ラット組織のヒストン解析では、肝臓において  $\gamma$ -H2A の上昇、幾つかの化学物質によるヒストンアセチル化の上昇が認められたが、化学物質の肝発がん性との相関は不明であった。また、肺ではそれらヒストン修飾の上昇は認められないことから、肝臓における化学物質の代謝などが関連していると考えられるが、これについては継続検討が必要である。

### A. 研究目的

本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系において、化学物質を作用した動物の各組織でヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) の検出が可能であることが示されている。 $\gamma$ -H2AX が高感度な DNA 損傷マーカーであることは、*in vitro* の実験で証明されているが、*in vivo* において  $\gamma$ -H2AX の検出を発がんリスクマーカーとして推し進めるためには、本来の化学物質による DNA 損傷を原因とする  $\gamma$ -H2AX の誘導と、偽陽性を含めたそれ以外の原因による誘導を区別して評価できるようにする必要がある。 $\gamma$ -H2AX は DNA 損傷に対する細胞応答であるため、DNA 損傷を起因としない偽陽性検出の可能性がある。本年度は、昨年度の検討において偽陽性検出の可能性が示唆された DNA 損傷を誘導しない界面活性剤による  $\gamma$ -H2AX 誘導メカニズムについて検討し、 $\gamma$ -H2AX の偽陽性出現の一機構について明らかにすることを目的とした。また、既に  $\gamma$ -H2AX の組織免疫化学的解析が行われている各種化学物質を投与したラット組織（肝臓、肺）からヒストンを抽出し、 $\gamma$ -H2AX とヒストンアセチル化を解析し、 $\gamma$ -H2AX の確認と同時に解析可能な他のヒストン修飾について模索した。

### B. 研究方法

#### B-1. 界面活性剤による $\gamma$ -H2AX 誘導機構の検討

ヒト培養細胞株（A549 肺上皮細胞）に界面活性剤（linear alkylbenzene sulfonates (LAS)）作用を行い、一定時間で培養した後、Western blotting 及び免疫蛍光染色法により、 $\gamma$ -H2AX、deoxyribonuclease I (DNase I)、actin 変化を解析した。細胞分画は、Sucrose による高張液処理と遠心により行った。

Western blotting：細胞を回収後、ヒストン（核画分）を抽出、15% ゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。一次抗体は、Rabbit anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG (Merck Millipore Co.)、Rabbit anti-DNase I polyclonal IgG (Thermo Scientific)、Rabbit anti-actin polyclonal IgG (SantaCruz Biotech.) を用いた。二次抗体を反応後、ECL+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて検出した。

免疫蛍光染色法：35mm ガラス底ディッシュに細胞を播種し、培養後、各種化学物質等を作用した。6% ホルマリンで固定、2% Triton X-100 で透過処理した。一次抗体に Mouse anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG, (Merck Millipore Co.)、Rabbit anti-DNase I polyclonal IgG を使用した。アクチン



は、Anti-stain TM555 fluoresceine phalloidin (Cytoskelton Inc.)で染色し、蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus Co., Japan)で撮影を行った。

## B-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾の解析法

同班の小川博士、豊田博士より、2-acetylaminofluorene (2-AAF), p-cresidine, dimethylarsenic acid (DMA), glycidol, N-nitrosodiethylamine (DEN), acrylamide (AA)を4週間投与した F344 ラットから採取した肝臓、肺を譲り受けた。各組織 50-80mg からヒストンを抽出し、Western blotting により解析を行った。検出バンドの解析には Image J 1.46 (Broken Symmetry Software, USA) を使用した。使用したヒストンアセチル化検出抗体は以下のとおりである。

- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (global) IgG
- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (lys9) IgG
- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (Lys14) IgG
- (いずれも Merck Millipore Co.)

## C. 研究結果

### C-1. 界面活性剤による $\gamma$ -H2AX 誘導機構

界面活性剤 (LAS) 作用により、濃度依存的に  $\gamma$ -H2AX が誘導された。この誘導は、ZnCl<sub>2</sub> や EGTA の前作用により阻害された (図 1)。一方、一般的な DNA 損傷剤である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による  $\gamma$ -H2AX は抑制しなかった。ZnCl<sub>2</sub> や EGTA は、DNase I の阻害剤であることが知られている。そこで、細胞を核と細胞質に分画して DNase I の局在を調べたところ、界面活性剤作用後、DNase I が核分画に検出された。さらに、DNase I の核移行を免疫蛍光染色法により確認したところ、通常細胞質に存在する DNase I が、界面活性剤作用と共に核に移行すること、その際、 $\gamma$ -H2AX が誘導されることが示された (図 2)。また、同時に、細胞骨格を構成し、DNase

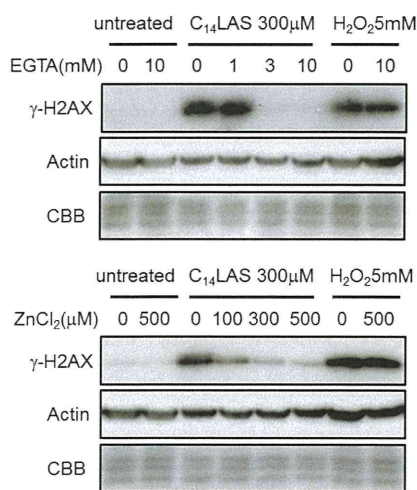


図 1 ZnCl<sub>2</sub> と EGTA による LAS 誘導  $\gamma$ -H2AX の抑制  
LAS 作用後に誘導される  $\gamma$ -H2AX は ZnCl<sub>2</sub> と EGTA により抑制されるが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により誘導される  $\gamma$ -H2AX は抑制されない。

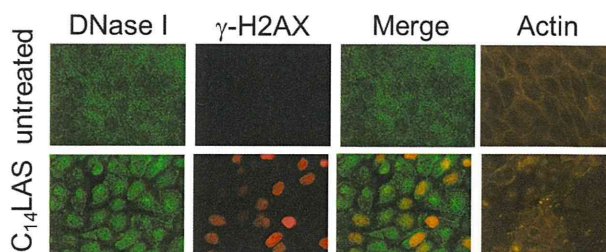


図 2 LAS 作用後の DNase I の細胞内局在と  $\gamma$ -H2AX  
界面活性剤 LAS 作用後、細胞質に存在した DNase I は核に移行し、 $\gamma$ -H2AX を誘導した。その際、LAS による Actin の崩壊が確認された。

I と共存しているアクチンの崩壊が観察された。

### C-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾

化学物質投与ラットから採取した肝臓、肺からヒストンを抽出し、Western blotting により、 $\gamma$ -H2AX、ヒストンアセチル化 (global, K9, K14) の解析を行った。

肝臓では、化学物質の種類によらず、H2AX がリン酸化される傾向が認められた。特に、DEN, AA で有意な上昇が認められた。また、ヒストンアセチル化 (global) は、2-AAF, glycidol, AA、アセチル化 (K9) は、DMA, glycidol, AA、アセチル化 (K14) は、DMA, glycidol, DEN, AA で認められた。

一方、肺では、肝臓で検出されたヒストン修飾の変化はほとんど認められなかった。

## D. 考察

### D-1. 界面活性剤による $\gamma$ -H2AX 誘導機構と DNA 損傷性

界面活性剤により、DNase I がアクチンから遊離し、核移行することが判明した。細胞核内に入った DNase I は、DNA を切断し、 $\gamma$ -H2AX を誘導すると考えられた。これまで、 $\gamma$ -H2AX 誘導は、放射線や化学物質等により直接誘導される DNA 損傷に基づくと考えられてきたが、本研究で明らかになった  $\gamma$ -H2AX 誘導は、化学物質による直接的な DNA 損傷を反映していない。細胞骨格の損傷による DNase I 遊離による DNA 損傷、そして  $\gamma$ -H2AX 誘導であり、これまで明らかになっていなかった機構である。

### D-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾

肝臓において、 $\gamma$ -H2AX、ヒストンアセチル化が観察された。しかしながら、 $\gamma$ -H2AX は化学物質の種類に依存せず、全体的に高く、肝遺伝毒性を反映した結果とはならなかった。また、アセチル化においては、修飾部位により、上昇をさせる化学物質が異なったので、今後、さらに化学物質の種類を増やして解析していくことが必要と考えられた。

肺では化学物質投与後のヒストン修飾変化がほとんど認められなかった。ヒストンアセチル化において

は、肝臓における化学物質の代謝などが関係している可能性がある。肺に標的のある化学物質を使用して検討することにより、臓器によるこれら修飾の差異の理由が明らかになる可能性がある。

## E. 結論

本研究班では、中・短期動物発がん評価の標的として、 $\gamma$ -H2AXの可能性を検討している。我々は、*in vitro*の実験において、これまで $\gamma$ -H2AXがDNA損傷を起因としない別の要因により検出される可能性を示唆してきた。本検討により、細胞骨格の崩壊によりDNAを切断する酵素が遊離し、DNA切断が $\gamma$ -H2AXが検出される場合があることを示した。本結果は、 $\gamma$ -H2AX検出において、偽陽性を検出する可能性を示唆するものであり、それを考慮の上で *in vivo*, *in vitro* の両検討を行う必要がある。

*in vivo* の組織解析により、化学物質投与後、 $\gamma$ -H2AXだけでなく、ヒストンアセチル化も引き起こされることが示された。アセチル化は、遺伝子発現制御に重要なヒストン修飾であり、今後、*in vitro* での実験を含め、データを蓄積することにより、発がん評価の標的、または、 $\gamma$ -H2AXを補う評価対象として検討できる可能性を考えている。しかしながら、本年度の検討では、発がんとの相関が認められるデータは得られていないため、今後の継続検討が必要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] X. Zhao, T. Toyooka, T. Kubota, G. Yang, Y. Ibuki.  $\gamma$ -H2AX induced by linear alkylbenzene sulfonates is due to deoxyribonuclease-1 translocation to the nucleus via actin disruption. *Mutat Res.* 777, 33-42 (2015).
- [2] Y. Ibuki, M. Shikata, T. Toyooka.  $\gamma$ -H2AX is a sensitive marker of DNA damage induced by metabolically activated 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane. *Toxicol. in vitro.* 29, 1831-8 (2015).
- [3] X. Zhao, G. Yang, T. Toyooka, Y. Ibuki. New mechanism of  $\gamma$ -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).

### 2. 学会発表

- [1] Yuko Ibuki: Histone modifications induced by chemicals and change of sensitivity to UV. 15<sup>th</sup> International Conference of Radiation Research (Kyoto), May 2015.
- [2] 豊岡達士, 伊吹裕子, 山口さち子, 王 瑞生: 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 (南知多) 2015年10月
- [3] 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 (福岡) 2015年11月.
- [4] 荻野真宏, 豊岡達士, 伊吹裕子: 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 (福岡) 2015年11月.
- [5] 豊岡達士, 伊吹裕子, 山口さち子, 王 瑞生: 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 (福岡) 2015年11月.
- [6] 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 (富士) 2015年12月.
- [7] 荻野真宏, 豊岡達士, 伊吹裕子: DNA 損傷能を有さない熱ストレスがなぜ $\gamma$ -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 (富士), 2015年12月.

## 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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
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	
Tsukamoto T., Kiriya Y., Tamatsu M	Chapter 22 Helicobacter	Liu, D.	Laboratory Models for Foodborne Infections	Taylor and Francis, CRC Press	London, UK	2016	in press