

## 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 -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 -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 -H2AX 標識率の増加は認められなかった。今後、-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。

-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、-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 -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 -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、-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℃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, 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：-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、-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。

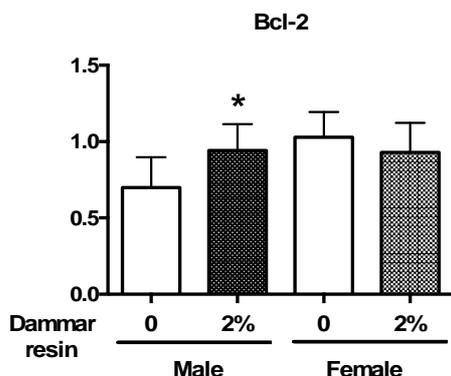


図 1 肝臓における Bcl-2 mRNA の発現

実験 2 : -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 -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

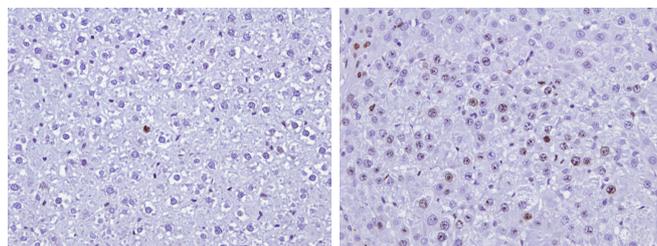


図 2 肝臓における -H2AX の発現

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 -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 -H2AX の標識率は対照群と有意な差はなかった(図 3)。

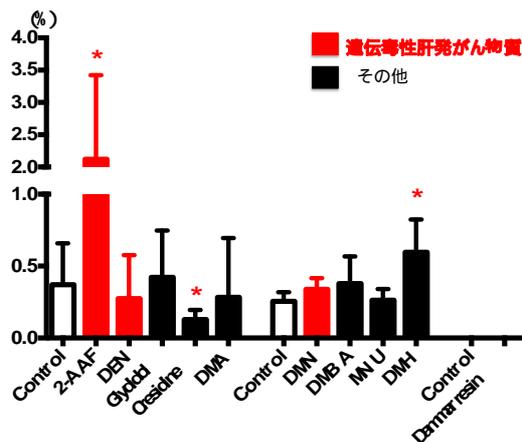


図 3 肝臓における -H2AX の標識率

### 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 : -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-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、-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