

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、 γ -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、 γ -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、 γ -H2AX、HMGB2、Ki-67 標識率の有意な上昇を確認した。今年度は、28 日間反復経口投与と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、 γ -H2AX、HMGB2 および Ki67 いずれにおいても 2 日間投与と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 (γ -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、 γ -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適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、 γ -H2AXはラットにおいて染色問題が生じたものの、ヒト γ -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日間反復経口投与と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、 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。

C. 研究結果

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 日間投与と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。

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., Uemura, 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 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