

## 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である 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、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 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 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う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、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、H2AX を形成する。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。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集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である 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。

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、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 の混餌投与と実験（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 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 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

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 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 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 (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、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 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、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 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。

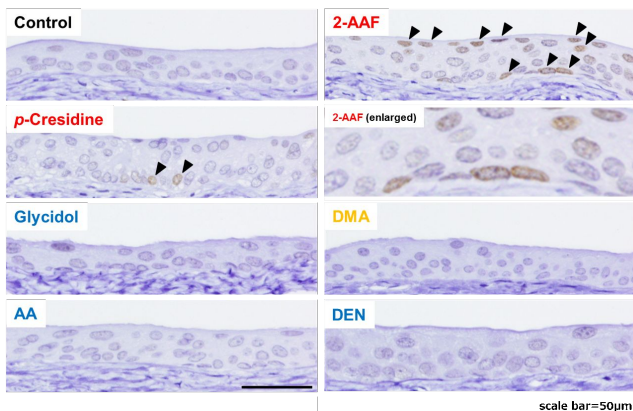


図 1. マウス膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 発現 (矢頭: H2AX 陽性細胞)

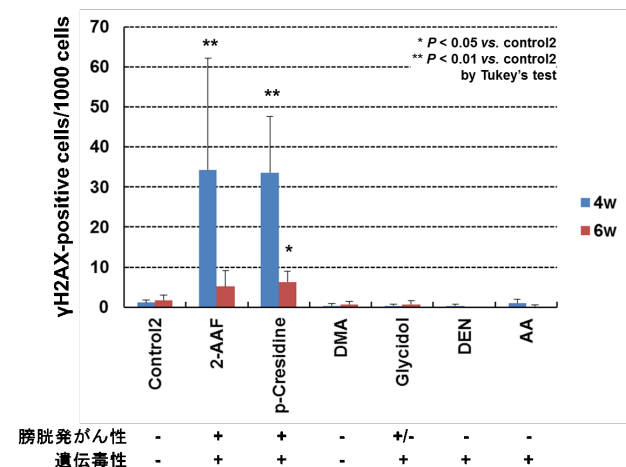


図 2. ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞の定量解析

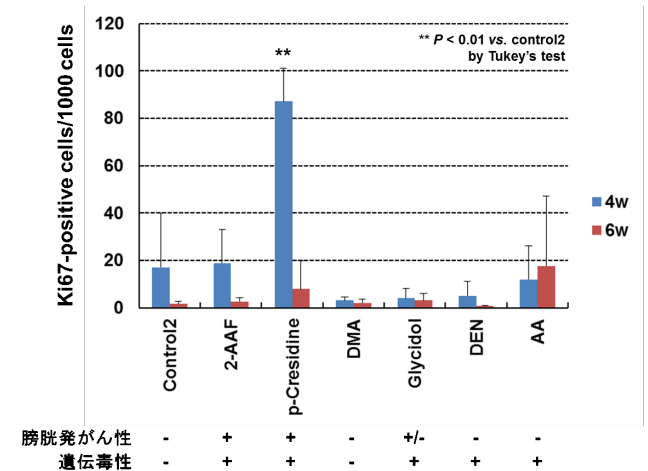


図 3. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析

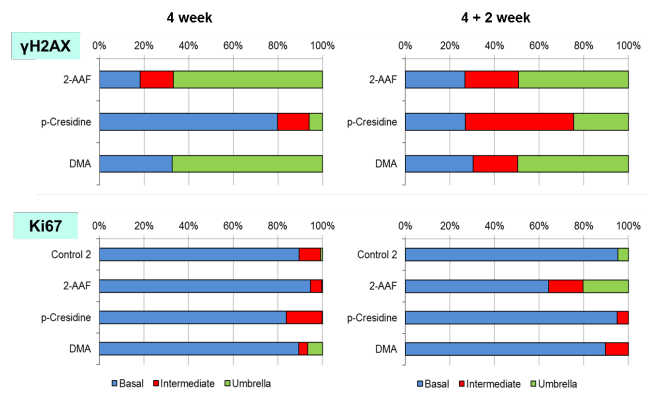


図 4. H2AX および Ki67 陽性細胞における basal/intermediate/umbrella cell の割合

## D. 考察

マウス膀胱粘膜における 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、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 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 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 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、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)の投与で検出し得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 -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 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 (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 . 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 . 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