

Polk 欠損マウスを用いた高感度な CYP 非依存的ベンゾ[a]ピレン誘発遺伝毒性の評価

研究代表者 赤木純一 国立医薬品食品衛生研究所病理部研究員

研究要旨

ベンゾ[a]ピレン (BaP) は生体内で代謝を受けて活性化され、DNA に付加体を形成する遺伝毒性物質である。本研究では損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼである Polk (カップ) を欠損した細胞で代謝活性化を行わない条件下での BaP による細胞毒性が特異的に見られたことから、野生型および Polk 欠損マウスに BaP および CYP1A 阻害剤 α -ナフトフラボン (ANF) を混餌投与して BaP 誘発がんにおける Polk と CYP の役割を検討した。その結果、野生型マウス、Polk 欠損マウスともに、ANF の併用投与により前胃の腫瘍性病変の数が増加した。一方で、予想に反して Polk 欠損マウスでは BaP 単独投与および ANF との併用投与のいずれの場合においても野生型マウスと比べて一頭あたりの腫瘍性病変の発生数が抑制されていた。これらの結果は既知の BaP の毒性発現機序および生体内での防御機構の働きから予想される結果とは逆であり、BaP の毒性発現およびその予防因子についてさらなる解析が必要であると考えられる。

A. 研究目的

ベンゾ[a]ピレン (BaP) は多環芳香族炭化水素の一つであり、排ガス、煙草煙の他、加熱調理した食品にも含まれる汚染物質である(1)。BaP は生体内で代謝を受けて活性化され、DNA に付加体を形成する。こうした損傷塩基を乗り越えて DNA 合成を継続する機構が損傷乗り越え複製 (TLS) である(2)。哺乳類細胞は Pol η 、Pol ι 、Polk など複数の TLS ポリメラーゼを持っている(3)。研究代表者はこれまでに、Pol η ・Pol ι ・Polk 三重欠損細胞 (TKO) が様々な変異原に対して野生型細胞 (WT) と比較して高い感受性を示すことを見出している。BaP は WT 細胞に対しては従来の知見と一致して S9 mix 非存在下では 50 μ M でも全く細胞毒性がみられず、S9 mix 存在下のみで生存率低下を示した (IC₅₀=13.5 μ M)。一方で TKO 細胞は S9 mix 非存在下で BaP に対して極めて高い感受性を示し (IC₅₀=0.25 μ M)、S9 mix 存在下では WT 細胞とは逆に細胞毒性が低下した (IC₅₀=4.8 μ M)。さらに TKO 細胞のみならず BaP 付加体の乗り越えに関与する Polk の単独欠損細胞でも同様の現象がみられた。このことから BaP には *in vitro* で CYP を介する代謝活性化による既知の毒性発現機序に加えて、CYP を介さない毒性発現機序の存在が示唆された。また、BaP は CYP により代謝活性化を受けるが経口投与による動物実験において、肝臓では腫瘍性病変を誘発せず、前胃、食道、舌といった食物と直接接触する部位が発

がん標的臓器となっている(4)。さらに、CYP1A1 欠損マウスや HRN マウスを用いた研究から、*in vivo* では BaP は CYP により解毒されることが示されている(5, 6)。TLS 欠損細胞における高感受性はリスク評価上閾値がないとされる遺伝毒性を示唆していることから、肝酵素による代謝を受けていない BaP が極めて低濃度で DNA 損傷を誘発する可能性が示されたことは食品安全上重要な知見であると考えられた。こうした上部消化管における CYP 非依存的な BaP 誘発遺伝毒性を、TLS 欠損細胞および遺伝子改変マウスを用いて高感度に検出することを目的として本研究を実施した。

B. 研究方法

B-1. Polk 欠損マウスの維持・繁殖

Polk は損傷 DNA の乗り越え複製に関与する因子であるため、内因性の突然変異が蓄積するリスクを避けるために Polk ヘテロ欠損 (Polk^{+/-}) マウスと野生型 C57BL6J を掛け合わせて系統維持および繁殖を行った。Polk^{+/-}マウス雌雄は作成者である大森治夫博士 (元・学習院大学客員教授) より了承を得て、日本クレアで受託飼育されていた SPF 動物を搬入した。動物は基礎飼料 (CE-2、30 kGy 滅菌済; 日本クレア) および調製水を自由摂取させ、温度 24 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 5%、換気回数約 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で飼育した。床敷としてソフトチップ (三協ラボサービス) を敷いたポリカーボネート製箱型ケージ

に 1-6 匹ずつ収容し、ケージおよび床敷を週 1 回の頻度で交換した。実験に供するホモ欠損 ($Polk^{-/-}$) および同腹の野生型 ($Polk^{+/+}$) マウスは、 $Polk^{+/-}$ 雌雄を掛け合わせて作出した。

B-2. $Polk^{+/+}$ マウスおよび $Polk^{-/-}$ への BaP および ANF の混餌投与による発がん性実験

それぞれの遺伝子型ごとに、動物を投与開始日の体重に基づいて各群の平均体重が近似するように 1 群 6 匹の 7 週齢雄からなる 6 群 (計 12 群) に分けた。BaP はコーン油に溶解し、溶媒対照 (0%)、非発がん用量 (0.003%)、発がん用量 (0.01%) の濃度で単独または CYP1A1 阻害剤である α ナフトフラボン (ANF) (7) と共に粉末基礎飼料に混ぜ、40 週間自由摂取させた。実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重、摂餌量および飲水量を週 1 回測定した。動物は投与期間終了後イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈より放血して安楽死させた。剖検を実施して、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓を摘出し、重量を測定した。また、上記の組織に加え舌、食道、前胃、腺胃、小腸、大腸を摘出した。肝臓については一部を凍結保存し、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従いパラフィン包埋、薄切標本作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学的解析を実施した。

B-3. 病理組織学的解析

前胃において肉眼的に認められた約 0.5 mm 以上の結節全ての薄切標本を作成して組織病理学的解析を実施した。1 個体あたりの病変の発生数の算出にあたっては病変無し个体は 0 病変/個体として計算に加えた。診断基準は以下の通りである。異形成は外形、大きさ、核の形態が異常な細胞を含む異型過形成であり、しばしば上皮内に角質化を認める。乳頭腫は分化した扁平上皮細胞で覆われた分枝した線維血管織である。扁平上皮癌は細胞の極性喪失、核の多型性、および豊富な分裂像を示す細胞を含み、しばしば壊死像および同心円層状の角化物質 (癌真珠) を認める。

B-4. 統計学的解析

体重については、各遺伝子型について Dunnett 法により対照群との有意差を検定した。前胃における病変の発生率については、カイ二乗検定によ

り対照群との有意差を検定した。1 個体あたりの病変の発生数については、Tukey-Kramer 法により有意差を検定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え動物実験は国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の審査・承認を得て、同所の定める『遺伝子組換え実験安全管理規則』および『動物実験の適正な実施に関する規定』を遵守して行った。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、実験終了時の剖検は深麻酔下で実施し、苦痛の軽減に努めた。また、実験者の健康被害防止のため、被験物質の取扱は安全キャビネット、防塵マスクおよび手袋等を使用して厳重に実施した。

C. 研究結果

C-1. $Polk$ 欠損マウスの維持・繁殖

$Polk^{+/-}$ (ヘテロ) 雌雄 56 組を掛け合わせて、319 匹の仔マウスを得た。遺伝子型解析の結果、雄 $Polk^{+/+}$ 、 $Polk^{-/-}$ とともに同腹の野生型および $Polk$ ホモ欠損の雄マウス各 41 匹が得られたため、各遺伝子型ごとに 1 群 6 匹×6 群で本実験を実施した。順調に繁殖が進んだ結果、当初の予定より早く 6 月 22 日から投与を開始することが可能となったため、発がん性をエンドポイントとした解析を実施するために本実験の投与期間を 40 週間に設定した。

C-2. $Polk^{+/+}$ マウスおよび $Polk^{-/-}$ への BaP および ANF の混餌投与による発がん性実験

昨年度に実施した予備実験の結果、非発がん用量である 0.003% および発がん用量である 0.01% BaP と 0.1% ANF の 4 週間の単独および併用投与で死亡または急激な体重減少等は認められず、長期投与が可能と判断されたため、本実験における用量は予備実験と同様に 0.003% または 0.01% BaP の単独または 0.1% ANF との併用投与とした。

実験期間中の死亡として、投与 36 週目に $Polk$ 欠損マウスの 0.01% BaP + 0.1% ANF 群で 1 匹死亡があり、剖検したところ前胃に複数の白色結節があった。また肝臓、腎臓が淡色であったことか

ら貧血が疑われた。投与 37 週目に野生型マウスの 0.01% BaP + 0.1% ANF で 1 匹死亡があり、剖検したところ胃内部に 1.3 cm×1.0 cm×0.5 cm の白色腫瘤があった。腫瘤は噴門を閉塞しており消化管に内容物が認められなかったことから、摂食障害に伴う死亡と考えられた。これらの 2 例については、組織病理学的診断を実施した。38 週目に野生型マウスの 0.003% BaP + 0.1% ANF 群で 1 匹死亡があり、剖検を行ったが死後変化が高度であり、本例については組織病理診断を断念した。

体重については、9 週目以降 33 週目まで Polk 欠損マウスの 0.01% BaP + 0.1% ANF 群に、24 週目以降 37 週目まで野生型マウスの 0.003% BaP + 0.1% ANF 群に有意な体重増加抑制が見られた (Table 1, Fig. 1)。摂餌量は群間で大きな差は見られず、BaP および ANF の摂取量は投与濃度にほぼ比例していた。

40 週投与後に生存動物をイソフルラン麻酔下で安楽死させ、剖検を行った。BaP 投与動物では前胃に白色の結節が見られた。病理組織診断の結果、BaP 投与動物において前胃に扁平上皮過形成、異形成、乳頭腫、扁平上皮癌が見られ (Fig. 2)、野生型マウスの 0.01% BaP 群と 0.01% BaP + ANF 群、および Polk 欠損マウスの 0.01% BaP 群では扁平上皮過形成の発生率の有意な増加が見られた。野生型マウスの 0.01% BaP + ANF 群ではそれに加えて乳頭腫および扁平上皮癌の発生率の有意な増加が見られた。また、異形成、乳頭腫および扁平上皮癌を前腫瘍性／腫瘍性病変として発生率を算出したところ、野生型マウスの 0.01% BaP 群および 0.01% BaP + ANF 群で前腫瘍性／腫瘍性病変の発生率の有意な増加が認められた。一方で Polk 欠損マウスの 0.01% BaP 群および 0.01% BaP + ANF 群では、用量相関的な腫瘍性病変の増加が見られたものの統計学的な有意差は認められなかった (Table 2)。

次に 1 個体あたりの病変数を調べたところ、野生型マウスの 0.01% BaP + ANF 群では対照群および ANF 群と比べて 1 個体あたりの扁平上皮過形成、乳頭腫、扁平上皮癌、および前腫瘍性／腫瘍性病変 (異形成+乳頭腫+扁平上皮癌) の総発生数が有意に増加していた。乳頭腫と扁平上皮癌は 0.01% BaP 群と比べても有意に多かった。一方で

Polk 欠損マウスの 0.01% BaP + ANF 群では対照群、ANF 群、および 0.01% BaP 群と比べて扁平上皮癌の発生数が有意に多かったが、扁平上皮過形成、異形成、乳頭腫、および前腫瘍性／腫瘍性病変の総発生数は対照群および ANF 群と比べて有意な差は見られなかった。また、乳頭腫の発生数は野生型マウスの 0.01% BaP + ANF 群と比べて有意に少なかった。(Table 3, Figure 3)。

D. 考察

BaP および ANF を野生型および Polk 欠損マウスに 40 週間混餌投与したところ、投与期間中に計 3 匹の死亡があり、いずれも BaP + ANF 併用投与群であった。また BaP + ANF 併用投与群では BaP 単独群と比べて体重が低い傾向があり、Polk 欠損マウスの 0.01% BaP + 0.1% ANF 群では 9 週目以降 33 週目まで、野生型マウスの 0.003% BaP + 0.1% ANF 群では 24 週目以降 37 週目まで有意な体重増加抑制が見られた。これらの群で摂餌量の低下は認められなかったことから、投与に伴う変動と考えられた。動物数の制約と個体間のばらつきにより統計学的な用量相関性は明確ではないが、これらの結果から ANF の併用投与により BaP の毒性が亢進することが示唆された。

組織病理学的検査では、いずれの遺伝子型のマウスにおいても BaP 投与により前胃に扁平上皮過形成および前腫瘍性／腫瘍性病変が見られた。非発がん用量 (0.003%) の BaP の単独投与では野生型マウスでは扁平上皮過形成のみ見られ、Polk 欠損マウスでは扁平上皮過形成に加えて異形成が一例のみ見られた。一方で発がん用量 (0.01%) の BaP 投与では野生型マウスでは扁平上皮過形成に加えて異形成および乳頭腫が見られた。Polk 欠損マウスではそれに加えて扁平上皮癌が 1 例見られたが、異形成および乳頭腫の発生率および発生数はいずれも野生型マウスより低かった。ANF の併用投与群では、野生型の 0.003% BaP + ANF 群で前胃扁平上皮癌に起因するとみられる死亡例が 1 例あったほか、Polk 欠損マウスでは乳頭腫が見られた。また、0.01% BaP + ANF 群では 0.01% BaP 群と比べて腫瘍性病変のうち、野生型マウスで乳頭腫と扁平上皮癌、Polk 欠損マウスでは扁平上皮癌の発生数の増加がみられた。これらの結果から、CYP1A 阻害剤である ANF の併用投与は BaP の発がん性を増強すると考えられる。BaP は CYP1A1 を起点とした代謝活性化により毒性を発現する *in*

in vitro の毒性発現機序に反して、CYP1A1 欠損マウスでは野生型マウスと比べてBaPの亜急性毒性が増強することが報告されている(8)。今回の研究結果から、CYP1A1 抑制条件下ではBaPの亜急性毒性だけでなく発がん性も増強することが示された。

野生型マウスと Polk 欠損マウスにおける腫瘍性病変の発生数を比較すると、野生型マウスでは0.01% BaP 群および0.01% BaP + ANF 群で腫瘍性病変の発生率の有意な増加が認められ、0.01% BaP + ANF 群の乳頭腫、扁平上皮癌については発生率、発生数ともに有意な増加が認められたのに対して、Polk 欠損マウスでは0.01% BaP + ANF 群で扁平上皮癌の発生数の有意な増加が認められたのみであった。Polk はBaPの活性代謝産物であるBenzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE) が付加したグアニン塩基を効率よく正確に乗り越える活性を持っており、Polk 欠損細胞は野生型細胞に比べてBaPに高い感受性と突然変異頻度を示すことが知られているが(9)、個体レベルでPolkがBaP誘発発がんを抑制するかどうかは未だに明らかになっていなかった。本研究の結果では、意外にもPolk 欠損マウスでは野生型マウスより乳頭腫の発生数が有意に低かった。Polk はBPDE付加体を正確に乗り越えるとはいえ通常の複製に比べると複製エラーは避けられず、PolkがBaPによるDNA損傷を乗り越えることで突然変異を持つ細胞の生存を促し、結果として前がん病変の発生に寄与する可能性が考えられる。一方で、扁平上皮癌の発生数については野生型マウス、Polk 欠損マウスともに同程度であった。Polk 欠損マウスでは強い複製阻害により染色体不安定性が引き起こされることで、より悪性度の高い腫瘍性病変が誘発される頻度が上昇するためではないかと考えられる。

E. 結論

本研究により、CYP1A 阻害剤であるANFとの併用投与によりBaPの発がん性が増強されることが明らかとなった。また、Polk 欠損マウスでは腫瘍性病変の形成が野生型よりも減少していた。これらの結果は既知のBaPの毒性発現機序および生体内での防御機構の働きから予想される結果とは逆であり、BaPの毒性発現およびその予防因子についてさらなる解析が必要であると考えられる。

(参考文献)

1. 環境省 (2007) 化学物質の環境リスク評価 第5巻.
2. Friedberg,E.C., Wagner,R. and Radman,M. (2002) Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science*, **296**, 1627–1630.
3. Ohmori,H., Friedberg,E.C., Fuchs,R.P., Goodman,M.F., Hanaoka,F., Hinkle,D.C., Kunkel,T.A., Lawrence,C.W., Livneh,Z., Nohmi,T., *et al.* (2001) The Y-family of DNA polymerases. *Mol. Cell*, **8**, 7–8.
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (2012) BENZO[a]PYRENE. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*
5. Uno,S. (2006) Oral Benzo[a]pyrene in Cyp1 Knockout Mouse Lines: CYP1A1 Important in Detoxication, CYP1B1 Metabolism Required for Immune Damage Independent of Total-Body Burden and Clearance Rate. *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1103–1114.
6. Arlt,V.M., Stiborová,M., Henderson,C.J., Thiemann,M., Frei,E., Aimová,D., Singh,R., Gamboa da Costa,G., Schmitz,O.J., Farmer,P.B., *et al.* (2008) Metabolic activation of benzo[a]pyrene *in vitro* by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification *in vivo*: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. *Carcinogenesis*, **29**, 656–665.
7. Hodek,P., Fousova,P., Brabencova,E., Moserová,M., Pavek,P., Anzenbacherova,E., Brotanek,J., Hudecek,J., Frei,E. and Stiborová,M. (2014) Effect of dihydromyricetin on benzo[a]pyrene activation in rats. *Neuro Endocrinol. Lett.*, **35 Suppl 2**, 158–168.
8. Uno,S., Dalton,T.P., Derkenne,S., Curran,C.P., Miller,M.L., Shertzer,H.G. and Nebert,D.W. (2004) Oral Exposure to Benzo[a]pyrene in the Mouse: Detoxication by Inducible Cytochrome P450 Is More Important Than Metabolic Activation. *Mol. Pharmacol.*, **65**, 1225–1237.
9. Ogi,T., Shinkai,Y., Tanaka,K. and Ohmori,H. (2002) Polk protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 15548–15553.