

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究

研究代表者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

化学物質は毎年新規に開発され、その一部は Ames 試験等の変異原試験陽性が含まれ、ヒトに対する発がんへの危険性の確認が必要であるものの、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難であるため、行政的な化学物質の安全対策の観点において、本研究では化学物質の発がん性検証に病理組織診断法を利用する短・中期のバイオアッセイ系の開発を目的とした。大腸と肺臓モデルでの病理組織学的なバイオマーカーであるそれぞれ aberrant crypt foci (ACF) と NapsinA は、短・中期発がん予測モデルへ提唱できる準備が整ってきた。加えて、新たに DNA 損傷依存的ヒストン修飾蛋白である H2AX が膀胱癌の早期病巣同定の予測マーカーとして有用である可能性を見いだした。本年度は、本研究班で検討してきた多施設共同での動物臓器供与システムを利用して検討し、H2AX が他臓器においても発がん性化学物質暴露における早期マーカーとしての可能性を見いだした。また、新たに化学物質に暴露された動物系における発がん予測モデルを遺伝子マーカーの利用により超短期に検出できる可能性を認め、今後の検証の必要性をみた。さらに、マウス肝臓 DNA アダクトーム解析により遺伝性発がん物質と非遺伝性発がん物質を区別できる可能性が示唆された。

研究分担者	所属機関	職名
吉見 直己	琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学	教授
塚本 徹哉	藤田保健衛生大学・病理学	准教授
魏 民	大阪市立大学大学院医学研究科・分子病理学	准教授
横平 政直	香川大学医学部・病理学	准教授
小川 久美子	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター 病理部・実験病理学	部長
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
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
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

は動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞での方法論は、生体での変化を確認することは困難である。そのため、動物モデルでの評価法はいまだに必要不可欠と考えられるが、国際的に動物試験に対する 3 R（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）の原則は、動物系実験を肯定的に考える我々研究者も当然考慮すべきものである。このため、腫瘍形成を正確に判定し得る病理組織学的な評価を基とした各臓器別の発がん試験として短・中期でのバイオアッセイ系の開発はその一つの解決策と考えている。実際、ヒトの場合においても各臓器のがんの早期発見がその治療と予後に重要な関与があることは周知の事実である。実際、ヒトのがんの診断に病理組織診断が利用されるようになった 150 年ほどの間に、生検標本での病理診断技術の発達は、内視鏡的にも病変を認めない場合でも、ランダム生検により、病理組織学的に異型細胞の存在は重要な診断価値があり、その後の精査の対象となっている。しかるに、未知物質の発がん性試験には長期動物実験による肉眼的な腫瘍形成を指標としており、その観察される腫瘍の病理組織学的な検索はあくまでも腫瘍組織を確定するためのものであった。しかし、動物実験においても従前より前がん病変として種々の早期に発現する病巣の研究がなされてきた。その多くの研究は腫瘍発生機序の視点でのものであり、微小な病理組織での判定はなされていなかった。このため、本研究では、前がん病変とされてきたもののうち、その肉眼的な腫瘍形成に拘わらず、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものを

A．研究目的

本研究では、短・中期発がん予測バイオアッセイ系の開発と検証が目的であり、化学物質の安全評価の迅速化、高度化、標準化を目指している。特に発がん予測評価手法の標準化を目標とする。既にヨーロッパ・ユーロ圏の諸国での研究施設では、特に化粧品関連物質に関しては、法的に動物実験系ができなくなるため、代替実験法の開発が急がれ、最近で

指標とする試験法の検証を目指すことにした。

加えて、動物使用数を減少させるため、臓器専門性を有する多施設間での動物の共有システムの検討を目的とした。

B. 研究方法

1) 多施設共同システム構築

一昨年度(26年度)の多施設共同評価のために作成した動物処理マニュアルの若干の修正を各施設に要請した。多施設間で臓器を担当施設に搬送し、その分野での病理組織学的変化を呈する病変を検討した。今年度は特に、H2AXとin vitro系実験に利用して、検討された。

2) 中・短期バイオアッセイ系

胃

1. ラット胃粘膜における H2AX の発現

多施設共有システムにおいて名古屋市立大学がラットで行った実験の胃組織を用いて胃発がん性の検討を行った。すなわち、6週齢オスF344ラットに、15 mg/kg 体重 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、5 mg/kg 体重 N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)、10 mg/kg 体重 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)、5 mg/kg 体重 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を週5回×4週間強制胃内投与した。MNNGは直接発がん物質であり、DMAB、DMN、DMHは間接発がん物質である。また、対照群には水を投与した。実験第28日に屠殺し、胃組織を採取し、胃体部前庭部境界部の一部より total RNA を抽出し、残りをホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。Hematoxylin eosin (HE)染色および H2AX (抗 rabbit polyclonal 抗体、Cell Signaling Technology)免疫染色を施行し、胃底腺、幽門腺領域に関して、腺管あたりの H2AX 陽性細胞数をカウントした。また、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)を内部標準にヒストン H2AX (h2afx)、p53 に応答する分子として p21waf1、幽門腺領域の pepsinogen として pepsinogen c (pgc)、胃底腺領域の pepsinogen として pepsinogen a5 (pga5)の遺伝子発現の変化を SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kits, QIAGEN) を用いて定量的 RT-PCR 法により検討した。PCR primer の配列は以下の通りである。gapdh (forward: CTAAGTGGGCTCTCCACCCAT; reverse: TTGTCATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT)、h2afx (forward: GGGCCTAGCTATCCCTCTCCCT; reverse: CTGCAAAAGTTCCAGTTCAGAAGCCAGA)、p21waf1 (forward: CACACAGGAGCAAAGTATGCCGTCGTC; reverse: TGGCGAAGTCAAAGTTCACCGTT)、pgc (forward: GTGCCACCCACCGCCTTGCCAG; reverse:

TGCCACCGTTAGACCCCTG)、pga5 (forward: ACCTACCCAGTGCCAGCCAGT; reverse: ATCAAACACGGTGAAGTACAGCCTCAGGA)。数値は Kruskal-Wallis test および Dunn's multiple comparisons test により統計学的に解析した。

大腸

1) 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

多施設共有システムにより、香川大の検体に関して検討した。

肺臓発がんモデルに使用される N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を飲料水として処理された30週の雄F344ラット大腸粘膜を観察した。

2) 大腸粘膜における H2AX の発現変動

5週齢の雄F344ラット18匹にAOM(15 mg/kg BW)を腹腔内投与し、その1週間後に同量のAOMを再度腹腔内投与した。2回目の投与から3日後、1週間後、2週間後にそれぞれ6匹ずつ屠殺し、大腸をホルマリン固定後、スイスロール状に包埋してパラフィン切片を作成した。H2AX 免疫染色(抗 rabbit polyclonal 抗体、Cell Signaling Technology)を試行し、全長が確認できる crypt 内の細胞数をカウントし、その中の陽性細胞数をカウントして陽性率を算出した。

肝臓

1. 超短期発がん性予測モデルの開発

公的データベースである Open TG-GATEs 遺伝子発現データベースを用いて、遺伝子マーカー群の探索と抽出を行った。約150化合物のうち既知の遺伝毒性肝発がん物質(5物質)についての遺伝子発現データがあり、これら5物質のラット単回投与24時間後で共通して発現変化を示す遺伝子群を探索した。

次に単回投与24時間後における抽出した遺伝子マーカー群の遺伝子発現データを使用し、遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質(14物質)を区別できる予測モデルの構築を行った。

2. モデル精度検証

公的データベースである Open TG-GATEs 遺伝子 Open TG-GATEs には含まれていない遺伝毒性肝発がん物質(計5物質)について、新たにラット単回投与試験を行い、投与24時間後の肝臓を摘出し、10遺伝子マーカー群の遺伝子発現変化を qPCR にて測定した。

肺臓

2006年～2014年に香川大で実施した6週齢または7週齢で開始したF344ラットによる実験の肺ブロック標本を用いて検討を行った。用いた肺ブロック材料は14実験群で、発がん物質はN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)、urethane, DMN, benzo[a]pyren (B(a)P), NNKである。検討した週齢は13週から30週と幅がある。各群、3匹ずつの肺について検討した。

免疫組織学的検討

H2AXの染色に関して、抗体は、Phospho-Histone H2A.X (Ser139) antibody (Cell Signaling, MA, USA)を用いた。すべての染色行程はベンタナ自動免疫染色装置 (VENTANA Discovery XT system, VENTANA medical Systems, AZ, USA)を使用した。クエン酸 buffer (CC2 extended (90分))で抗原賦活化を行い、1次抗体は10倍希釈で60分、2次抗体 (rabbit) は30分反応させた。形態的に変化の見られない肺胞上皮について、細胞1000個以上あたりのH2AX陽性細胞数を計測し、その割合 (%) を算出した。

膀胱

- 6週齢の雄B6C3F1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/Ki67発現を免疫組織化学的に検索した。
- 多施設共同システムを利用して、名古屋市立大学 (F344ラットに遺伝毒性発がん物質8種を週5日、4週間強制経口投与) および国立がん研究センター研究所 (F344ラットにノルハルマン代謝物2種を4週間混餌投与) から提供された膀胱を用いて、H2AX/Ki67発現を検索した。

前立腺

6週齢F344雄ラットに、PhIPを15 mg/kg、BOP、7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を5 mg/kg、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) を10 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、H2AX, HMGB2 および Ki67 の

標識率を前立腺腹葉、側葉および背葉において検討した。

3) 新規 in vitro 発がん性予測試験

網羅的なDNA付加体解析法

雄性F344ラット (各群それぞれ5匹) にDEN(0.001%)、*o*-Tolidine-2HCl(0.015%)、COP(1.0%)、ENU(0.001%)、DEHP(1.2%)、DO(0.5%)を4週間飲水投与を行った後、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。

ヒストン修飾を指標とした評価法

1. 界面活性剤NPE0によるH2AX誘導機構の検討

ヒト培養細胞株 (MCF7 ヒト乳がん細胞) に界面活性剤 (nonylphenol polyethoxylate (NPE0)) 作用を行い、一定時間で培養した後、ウェスタンブロット法および免疫蛍光染色法により、H2AX、deoxyribonuclease I (DNase I)、actin変化を解析した。

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

Methylnitrosourea (MNU), 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB), dimethylnitrosamine (DMN), dimethylhydrazine (DMH) を4週間投与したF344ラットから採取した肝臓を多施設共有システムにより各市大から供給を受けた。各組織50-80mgからヒストンを抽出し、ウェスタンブロット法により解析を行った。

倫理面への配慮

全ての分担者の動物施設においての規程に基づいて、実験計画の許可とともに、遺伝子を利用する場合はそれぞれの施設での組み換えDNA実験委員会の許可を得、厳正に動物愛護と倫理面を配慮した実験を施行した。特に動物試験における3R (代替法活用、使用数削減、苦痛軽減) の原則を遵守した。

C. 研究結果

1) 多施設共同システム構築

図1のように、各施設でのマニュアル (図2) に沿う形で摘出された臓器を一部施設間ないし一方向で搬送した。

図1 今回実施した多施設の相関図

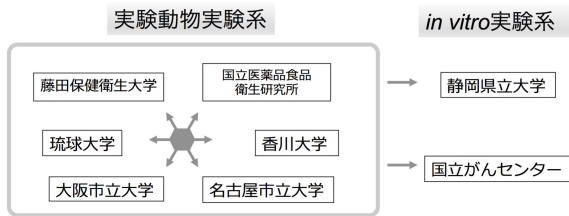
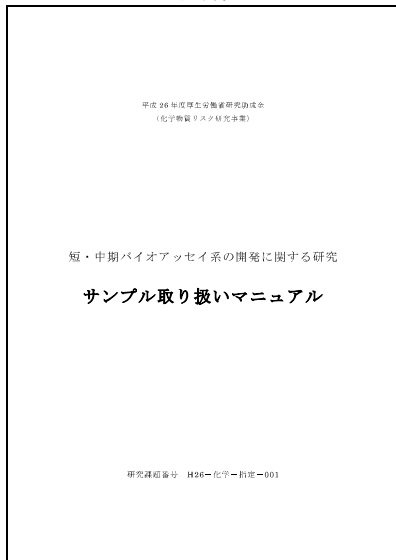


図2 マニュアル表紙



2) 中・短期バイオアッセイ系
胃

ラット胃底腺、幽門腺の増殖帯における1腺管あたりの-H2AX陽性細胞数を計測した。Control群、PhIP群、BOP群、MNNG群、DMBA群それぞれで、幽門腺領域では、 2.57 ± 0.48 、 3.86 ± 0.38 、 2.73 ± 0.50 、 4.82 ± 0.55 、 3.33 ± 0.38 個/腺管 (AVE \pm SD)とPhIP群 ($P < 0.05$)で-H2AX陽性細胞数の有意な上昇があった。胃底腺領域では、 2.18 ± 0.25 、 4.12 ± 0.83 、 2.85 ± 0.44 、 3.28 ± 0.69 、 3.23 ± 0.42 個/腺管 (AVE \pm SD)と、PhIP群とMNNG群 ($P < 0.05$)で-H2AX陽性細胞数の有意な上昇が見られた。表層のアポトーシス細胞は、それぞれ、 0.18 ± 0.12 、 0.52 ± 0.50 、 0.23 ± 0.05 、 3.58 ± 1.30 、 0.28 ± 0.13 個とMNNG群で有意な増加が見られた ($P < 0.005$)。各種遺伝子発現の検討では、Control群を1とすると、PhIP ($\text{Log}_2 = -0.51 \pm 0.17$, $P < 0.01$)、BOP (-0.71 ± 0.67 , NS)、MNNG (-0.65 ± 0.50 , $P < 0.05$)、DMBA (-0.71 ± 0.23 , $P < 0.01$)群でh2afx mRNAの発現が有意に低下した。また、p21 mRNAの発現をみるとControl群1に対し

て、それぞれ、 $\text{Log}_2 = 0.18 \pm 0.48$ 、 0.39 ± 0.26 、 0.52 ± 0.26 、 0.13 ± 0.17 とMNNG群での発現が有意に上昇した ($P < 0.05$)。Pepsinogen CおよびAについては、各群で有意な変動は見られなかった。

大腸

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

多施設共有システムにおける香川大の検体のうち、0.1%DHPNを2週間飲水投与した大腸粘膜に、ACFを 53.5 ± 18.3 を観察し、4個以上の腺管を有するもの 24.7 ± 11.0 観察された。一部その組織像も確認したが、明らかな異型腺管増生を認め、微少腺腫と考えられ、対象物質の主なる標的臓器ではないために、顕在化しないまでも、物質の発がん性の可能性が示唆された。

2. 大腸粘膜におけるH2AXの発現変動

F344雄ラット大腸粘膜のH2AX陽性率は、3日後群で 1.66 ± 0.6 (対照群: 0.85 ± 0.3)、1週後群で 0.13 ± 0.1 (対照群: 0.11 ± 0.1)、2週後群で 0.08 ± 0.1 (対照群: 0.00 ± 0.2)であり、極めて早期での3日後群では増加傾向を認めた。

肝臓

1. 超短期発がん性予測モデルの開発

計10遺伝子が抽出され、これらを次の予測モデル構築で使う遺伝子マーカー群として同定できた。

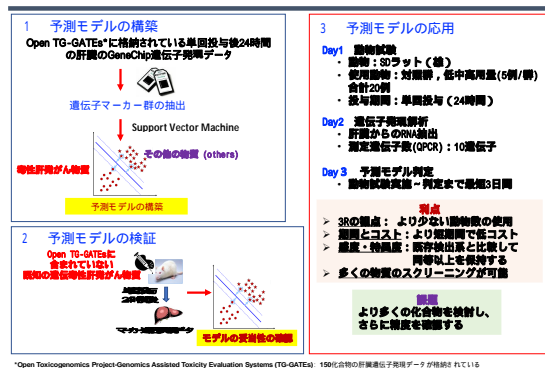
構築した予測モデルを用いて、Open TG-GATEsにある遺伝毒性肝発がん物質 (計5物質)とそれ以外の物質 (計53物質)について判定した結果、高い正答率(91%)で遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を判別できることを確認した。

2. モデル精度検証

投与24時間後の肝臓を摘出し、10遺伝子マーカー群の遺伝子発現変化をqPCRにて測定した。その結果を予測モデルに当てはめた結果、全ての物質について陽性判定が得られ、単回投与24時間後の遺伝子マーカー群の遺伝子発現変化を測定し、構築した予測モデルを使うことで、遺伝毒性肝発がん物質を検出できる可能性が示唆された(図3)。

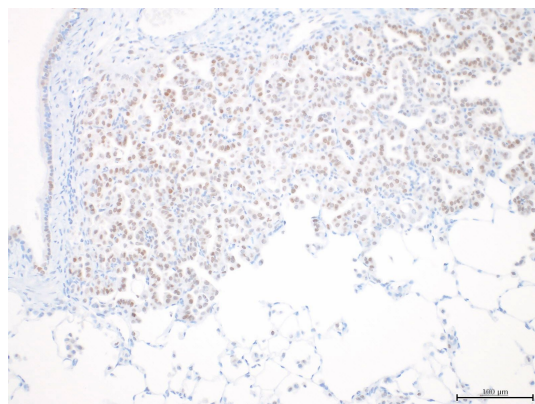
図 3

遺伝毒性肝発がん物質検出予測モデル開発



*Open Toxicogenomics Project-Genomics Assisted Toxicity Evaluation Systems (TG-GATEs) 150化合物の肝臓遺伝子発現データが提供されている

図 4 ラット、気管支肺胞腺腫における H2AX の発現 (14EX DHPN, 16w)



肺臓

気管支肺胞腺腫においては、H2AX 発現細胞が多く認められた(図 4)。一方、正常肺胞上皮については陽性細胞が散見されるのみであった。これらの陽性細胞数を集計したものが表 1 である。今回の 12 週以降の検討では、発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。一部の実験は経時的な変化を検討するものであり、DHPN 投与後、H2AX の経時的発現変化についての結果が期待された。しかしながら、その発現率に変化は認められなかった。また、実験ごとに、H2AX の発現に差が見られた。

表 1 正常肺胞上皮における H2AX 発現率

実験群	化学物質名	H2AX 発現率(%, 週齢)
1	Untreated	1.4 ± 0.5 (13W)
2	Untreated	6.4 ± 2.8 (23W)
3	DHPN	24.6 ± 10.4 (16W)
3	urethane	21.6 ± 2.1 (16W)
3	DMN	25.7 ± 1.9 (16W)
3	B(a)P	22.4 ± 2.8 (16W)
4	DHPN	5.0 ± 2.4 (12W)
4	DHPN	7.5 ± 3.1 (16W)
4	DHPN	3.1 ± 4.1 (23W)
4	DHPN	3.7 ± 2.9 (30W)
5	NNK	1.4 ± 0.5 (12W)
5	NNK	4.1 ± 1.3 (16W)
5	NNK	2.3 ± 1.7 (23W)
5	NNK	1.9 ± 0.7 (30W)

膀胱

- 4 週時の検討において、遺伝毒性膀胱発がん物質である BBN、2-AAF、および *p*-Cresidine を投与したマウスでは、ラットと同様に H2AX の有意な発現上昇が認められた。一方、マウスに対し膀胱発がん性のない 2-NA、Glycidol、DEN および AA 投与群では、対照群と同じ発現レベルにとどまった。この結果から、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。しかし、2-AAF 投与マウスにおける H2AX 陽性細胞は、ラットと異なり umbrella cell が主体で、Ki67 発現の上昇は伴わなかった。2-AAF 代謝における種差により、細胞傷害の標的が異なる可能性が考えられた。また、PEITC および Uracll 投与群においても、H2AX/Ki67 発現の有意な上昇が認められたことから、細胞増殖活性に伴う H2AX の誘導を考慮する必要があると思われる。
- 名市大サンプル：H2AX 発現は DMAB および BOP 投与群で有意に増加し、MNU 投与群でも増加傾向が認められた。Ki67 陽性細胞の割合は、いずれの投与群でも対照群と有意な差はみられなかった。DMAB および BOP はそれぞれハムスターとラットへの皮下投与、BOP と MNU はカテーテルを用いたラット膀胱内投与による膀胱発がん性が報告されていることから、H2AX 発現は遺伝毒性物質による潜在的な膀胱発がん性の指標になり得る可能性が示された。国がんサンプル: 4 週間の APNH(アニリンのノルハルマン代謝物) 投与により、膀胱粘膜での H2AX 発現は有意に増加した。2 週間の休薬後には減少したが、対照群よりも高いレベルを維持していた。AMPNH(オトルイジンのノルハルマン代謝物) 投与群にお

いても、統計学的有意差はないものの、H2AX 発現の増加傾向が認められ、6 週後の発現レベルは対照群よりも有意に高かった。AMPNH/APNH はともに、4 週時点での Ki67 発現を増加させた。APNH は遺伝毒性およびラット膀胱への発がん性が報告されており、遺伝毒性膀胱発がん物質検出指標としての H2AX の有用性を示唆する結果と考えられた。

前立腺

4 週間の経口投与と実験において、PhIP 投与による H2AX の有意な標識率上昇は見られなかったものの、他は 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。特に HMGB2 および Ki67 は、前立腺発がん物質をいずれかの葉で有意な標識率上昇を認め、検出することが可能だった。

去年および今年度の結果から、HMGB2 および Ki67 は、前立腺発がん物質によりいずれかの葉で有意な標識率上昇を認めた一方で、前立腺に標的性のない発がん物質についてはいずれも対照群と差がなかった。特に、皮下投与や腹腔内投与といった通常の前立腺発がんモデルで用いる投与方法ではなく、経口投与を用いても検出されることが確認された。また、各物質の投与濃度も Lethal Dose, 50% (LD50) の約 1/20 で用いており、これらの結果から、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、HMGB2 および Ki67 の免疫組織化学染色による核陽性率が、前立腺特異的発がん物質の検出法として有用である可能性を示せた。

3) 新規 in vitro 発がん性予測試験

網羅的な DNA 付加体解析法

各種化学物質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に示す。主成分 (PCA) 解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の 3 つのグループに分離されることがわかった (図 5)。一方、遺伝毒性発がん物質とコントロールとの比較では、肝発がん性の有無で 2 つのクラスターとして分離されることがわかった (図 6)。また、非遺伝毒性発がん物質の分離に寄与している DNA 付加体をデータベースとの比較により探索した結果、抽出された付加体は酸化ストレスに起因する付加体が多いことが推測された。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。

図 5 遺伝性および非遺伝性発がん物質のアダクトーム解析と PCA 解析

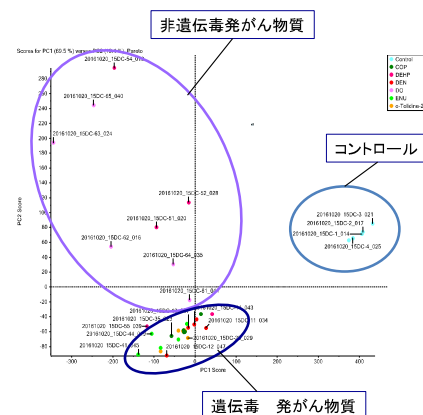
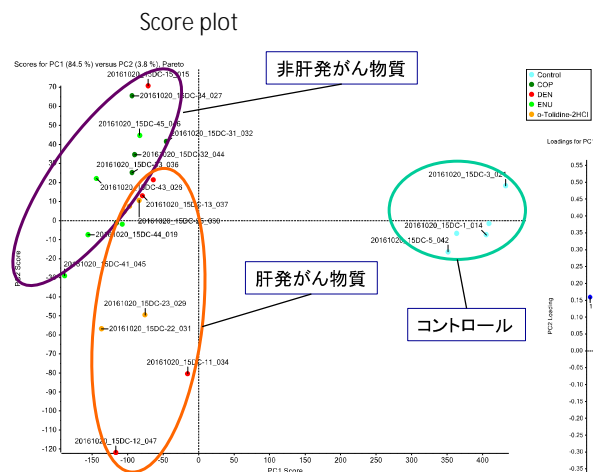


図 6 遺伝毒性発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価 (PCA 解析による)



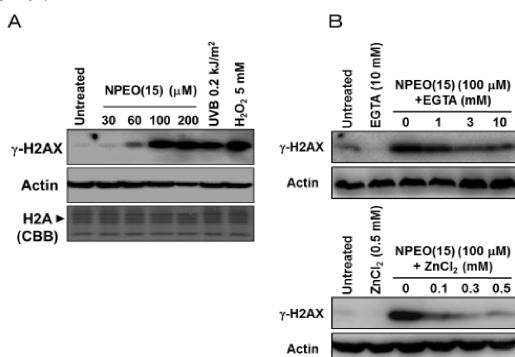
ヒストン修飾を指標とした評価法

1. 界面活性剤 NPE0 による H2AX 誘導機構の検討

昨年度までに、陰イオン界面活性剤 (linear alkylbenzene sulfonates : LAS) 作用により、濃度依存的に H2AX が誘導されることを明らかにし、その機構について検討してきた。本年度は、非イオン界面活性剤である NPE0 による H2AX の誘導とその機構について解析した。NPE0 により H2AX が誘導され、この誘導は、ZnCl₂ や EGTA の前作用により阻害された (図 7)。一方、一般的な DNA 損傷剤である UVB や H₂O₂ による H2AX は ZnCl₂ や EGTA では抑制されなかった。ZnCl₂ や EGTA は、DNase I の阻害剤であることが知られている。そこで、DNase I の挙動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、NPE0 作用と共に核に移行すること、その際、H2AX が誘導

されることが示された。同時に、細胞骨格を構成し、DNase I と共存しているアクチンの崩壊が観察された。

図7 NPEO 作用後の H2AX の誘導。 A: NPEO(1)作用後、B: EGTA, ZnCl₂による誘導阻害



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からヒストンを抽出し、Western blotting により、H2AX、ヒストン H3 アセチル化 (global, K9, K14) の解析を行った。

一部の化学物質で H2A が上昇する傾向が認められたが有意ではなかった。DMN, DMH 投与により、ヒストン H3 アセチル化の変化が認められたが、化学物質の肝臓がん性や傷害性との相関は不明であった。この変化の意義についてはさらなる検討が必要である。

D. 考察

2011 年度からの 6 年間(実質 5 年間)に班全体で臓器特異的な発がん物質を含め 50 種類を超える化学物質を検討した成果を踏まえて、考察する。

前年度までに、多施設間共有システム構築のための共有臓器摘出できる動物処理マニュアル(図2)を作成し、実際に運用し、大腸の前がん病変である ACF や肺がんバイオマーカーである NapsinA 及び H2AX の発がんバイオマーカーとしての有用性について検討した。

本研究班で検討した化学物質での ACF 発現を、改めて表 2 にまとめたが、大腸発がん物質に特異的に発現していることが判った。さらに、ACF と発がん性との関連や ACF をバイオマーカーとした大腸発がん抑制に関する論文数は極めて多く(参考 下図 8 & 9、2013 年度の本研究班での調査結果より)、今回、多施設間での検討された物質のうち、上述の DHPN 除き、大腸への発がん性を見いだしていない物質での発現は認めていない(表 2)。ACF 検出とその病理組織学的な検討は、毒性病理専門の技術を要

するものの、大腸発がん物質の評価手法として OECD ガイドラインに提唱する必要性を有し、具体的な準備体制になったと考えられた。

表 2 多施設由来の大腸(ラットおよびマウス)での ACF の発現度合い

標的臓器が検討臓器と一致する化学物質の陽性率	標的臓器が検討臓器と一致しない、ないし不明の化学物質の陽性率
2 / 2 (AOM & DMH)	1 / 33 (DHPN)

図 8 ACF と大腸発がん性に関連する論文数の年次推移

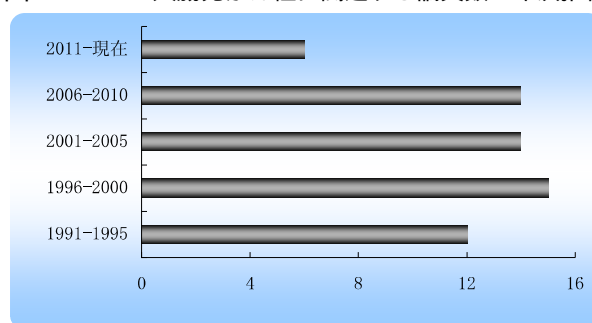
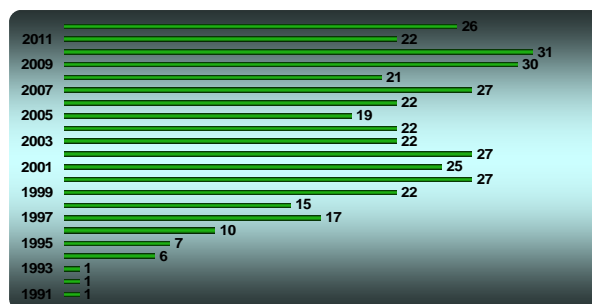
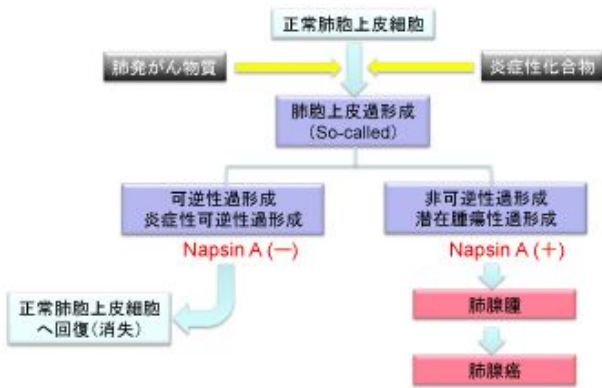


図 9 ACF をバイオマーカーとした大腸発がん抑制に関する論文数の年次推移



肺がんモデルでは、ラットにおいて DHPN、DMN、Urethane 誘発の過形成病変には NapsinA の肺胞壁内における高発現が認められ、またマウスにおいても Urethane, NNK, B[a]P で誘発された過形成病変において、Napsin A の肺胞壁内における高発現が認められた。このため、図 10 のように、NapsinA の免疫組織化学による早期病変の同定により発がん性予測が可能と考えられ、今後、同様にガイドラインの設定に向けて多施設共同による研究の推進が必要であると考えられた。

図 10 肺がんモデルにおける NapsinA 発現の予測



本研究班のなかで、提唱された新規のバイオマーカー H2AX の発現を多施設共有システムの臓器を利用して検討し、その成果を表 3 にまとめた。当初、膀胱でその有用性が示され、論文化されたが、表 3 のように、膀胱以外の各臓器における早期発現を認め、発がん物質の標的臓器に必ずしも特異的に発現していないものの、H2AX の早期の発現は各臓器での発がん予測の可能性があるものと考えられ、今後の更なる検証が必要である。しかしながら、本研究班での H2AX に関する in vitro 系の実験成果から、遺伝毒性を呈する物質が関与するだけでなく、一部遺伝毒性を有しない物質でも、DNaseI が遊離することで、DNA を切断して誘導される可能性が示され、今後、こうした視点を踏まえた動物系での発現解析も、新規マーカーとしての検証と平行して、実施する必要がある。

さらに、二つの化学物質暴露動物系を利用した迅速評価方法の新展開が示された。一つは肝臓担当者から、化学物質への動物暴露 24 時間後で、遺伝子マーカーの利用により発がん性予測の可能性を示すモデルが提唱された。今後、より多くの検証が必要と考えられるが、化学物質の評価手法の迅速化に貢献できる可能性が考えられた。二つ目として、肝臓における DNA 付加体の網羅的な解析により、遺伝毒性化学物質と非遺伝毒性化学物質を区別できる可能性を見いだした。両者ともに今後の検証研究が不可欠ではあるが、化学物質の評価手法の迅速化への新たな展開と期待される。

表 3 H2AX の各種臓器における発現のまとめ

検討臓器	検討臓器で H2AX 発現陽性を示す化学物質のうち、発がん標的臓器と一致する物質数	検討臓器が発がん標的臓器でない化学物質のうち、H2AX 発現陽性を示す物質数
胃	2 (MNU & MNNG) / 2	1 (PhIP) / 6
大腸	1 (AOM) / 1	not examined
肝臓	1 (2-AAF) / 3	1 (DMH) / 6
肺臓	5 (DHPN, urethane, DMN, B(a)P, NNK) / 5	not examined
膀胱	4 (BBN, 2-AAF, p-cresidine, uracil) / 4	0 / 7
前立腺	3 (DMAB, PhIP, MNU) / 4	0 / 4

E. 結論

今回、短・中期発がん性予測モデルとして、大腸発がん性に関しては前がん病変である ACF、肺発がん性には NapsinA が有用であり、さらに、H2AX が種々の臓器において、発がん物質による早期に誘導されるバイオマーカーとなり得ると考えられた。特に、従来からの顕在化による腫瘍形成を、毒性専門家による病理組織学的な検索での短・中期での発がん性予測は、動物実験に対する 3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)にも合致し、OECD ガイドラインとして推奨されたと考えられた。そのためには、多施設共同システムの構築を含めた毒性病理学専門家集団の育成・確立も必要であると考えられる。

さらに、本班の本年度の新たな成果であるが、ふたつの化学物質の評価手法の迅速化への新たな展開の可能性も示された。次年度以降での新たな検証が必須である。

F. 研究発表

1. 著書発表

- 1) 高橋智、鈴木周五、他 前立腺がん化学予防の現状、菅原隆 編、次世代のがん治療薬・診断のための研究開発. pp27-31、技術情報協会、東京、2016.
- 2) 吉見直己、他 小腸・大腸 毒性病理組織学 (日本毒性病理学会編)、pp188-215、西村書店、東京、2017
- 3) Tsukamoto T., et al., *Helicobacter*, Laboratory Models for Foodborne Infections (Ed : Liu, D), CRC Press, London, in press

2. 論文発表

- 1) Cao D, Tsukamoto T., et al., 18beta-glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling. *Oncotarget*. 7: 71960-71973, 2016.
- 2) Kiriya Y, Tsukamoto T., et al., Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia is irreversible point with eradication of *Helicobacter pylori*. *Open J Pathol*. 6: 93-104, 2016.
- 3) Toyoda T, Tsukamoto T., et al., Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter*. 21: 131-142, 2016.
- 4) Toyoda T, Ogawa K., Tsukamoto T. et al. Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 21: 131-142, 2016.
- 5) Kanki M, Gi M., et al., Detection of non-genotoxic hepatocarcinogens and prediction of their mechanism of action in rats using gene marker sets. *J Toxicol Sci*. 41: 281-92, 2016.
- 6) Kakehashi A, Gi M., et al., Ethanol-Extracted Brazilian Propolis Exerts Protective Effects on Tumorigenesis in Wistar Hannover Rats. *PLoS One*. 11: e0158654, 2016.
- 7) Kato H, Suzuki S., et al., Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget*. 7: 2009-2021, 2016.
- 8) Kuno T, Suzuki S., et al., Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats. *Nutrients*. 8: 421, 2016.

- 9) Sato S, Suzuki S., et al., Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer Res*. 76: 4192-4204, 2016.
- 10) Tanaka M, Suzuki S., et al., Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget*. 7: 47242-47251, 2016.
- 11) Suzuki S., et al., Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 17: 2071, 2016.
- 12) 鈴木周五、他：前立腺発癌と炎症. 別冊 BIO Clinica、5巻、84-88, 2016.
- 13) Suzuki I, Ogawa K., et al., 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol*. 29: 237-246, 2016.
- 14) Toyoda T, Ogawa K., et al., Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic toxicity induced by 3-monochloropropane-1,2-diol. *J Toxicol Sci*. 42: 1-11, 2017.
- 15) Suzuki I, Ogawa K., et al., Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity. *J Appl Toxicol*, 37: 485-494, 2017.
- 16) Nonaka M, Ogawa K., et al., Non-neoplastic lesions found only in the two-year bioassays but not in shorter toxicity studies of rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 86, 199-201, 2017.
- 17) Matsushita K, Ogawa K., et al., Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat. *J Toxicol Pathol*, 30 :57-62, 2017.
- 18) Cho YM, Ogawa K., et al., Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water. *J Appl Toxicol*. in press
- 19) Hirata T, Ogawa K., et al., Lack of in vivo mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of gpt delta rats administered singly or in combination. *J Appl Toxicol*. in press
- 20) Mimaki S, Totsuka Y., et al., Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis*. 37: 817-26, 2016.
- 21) Zhao X, Ibuki Y., et al., Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation

of histone H2AX. J Photochem Photobiol B. 162: 213-222, 2016.

- 22) 伊吹裕子、化学物質によるヒストン修飾と遺伝毒性、Bio Clinica 31: 93-96, 2016.

3. 学会発表

- 1) Nakachi S, Yoshimi N. 他: The Modifying Effects of the Extract from Okinawan Sweet Potato Leaves in Mouse Colon Carcinogenesis. AACR Annual Meeting 2016, 2016年4月、ニューヨーク
- 2) 鱒淵英機、魏 民、他. 遺伝毒性・発がん性をスクリーニングする *in vivo* 短期検索法. 第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月、名古屋
- 3) 藤岡正喜、魏 民、他. 非遺伝毒性ラット肝発がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の検討. がん予防学術大会 2016 名古屋、2016年7月、名古屋
- 4) 藤岡正喜、魏 民、他. ラット腎癌肺高転移株を用いた転移亢進に寄与する分子生物学的特性の検討. 第13回日本病理学会カンファレンス、2016年7月、神戸
- 5) 平山幸良、魏 民、他. mTOR 阻害剤 everolimus と抗 PD-L1 抗体の併用療法による抗腫瘍効果. 第31回発癌病理研究会、2016年8月、長野
- 6) 河内聡子、魏 民、他. 1,2-DCP および DCM 複合曝露がマウス肝発がんを促進する. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 7) 魏 民、辰己久美子、他. ハムスター二段階発がんモデルにおける 1,2-DCP の発がん修飾作用. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 8) 岡田諭志、魏 民、他. EGFR・ALK 陰性原発性肺腺癌を用いた網羅的リン酸化プロテオーム解析. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 9) 横平政直、他. A possible predictable marker, napsin A, for the tumorigenic potential of lung bronchio-alveolar hyperplasia in rodents. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 10) 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105回日本病理学会総会、2016年5月、仙台
- 11) 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75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 12) 加藤寛之、鈴木周五、他. 前立腺癌細胞株の同種同所移植モデルの確立. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 13) 鈴木周五、他. 前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立. 第33回日本毒性病理学会総会および学術集会、2017年1月、堺
- 14) 曾根瑞季、小川久美子、他. H2AX を指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット肝臓における検討 - . 第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月、名古屋
- 15) 豊田武士、小川久美子、他. 化学物質の膀胱に対する *in vivo* 遺伝毒性および発がん性の短期評価系開発. 第2回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2016年9月、東京
- 16) 桐山諭和、豊田武士、小川久美子、塚本徹哉. ヒト胃癌における H2AX と p53 の免疫組織学的解析. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 17) 赤木純一、小川久美子、他. Pol I、Pol II、および Pol III の欠損はさまざまな化学物質に対して異なる感受性を示し、遺伝毒性のスクリーニングに有用である. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 18) 豊田武士、鈴木周五、小川久美子、他. 遺伝毒性膀胱発がん物質によるラット膀胱粘膜における H2AX 発現. 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017年1月、大阪
- 19) 曾根瑞季、小川久美子、他. H2AX を指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット腎臓における検討 - . 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017年1月、大阪
- 20) Totsuka Y, Lin Y, et al., Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 50th Anniversary Conference IARC, 2016年6月、リヨン
- 21) Totsuka Y, Watanabe M, et al., Development of a novel *in vitro* mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials, 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 2016年8月、コペンハーゲン
- 22) 戸塚ゆ加里、林 櫻松、他. DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 23) 伴野 勲、戸塚ゆ加里、他. 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 24) 三牧幸代、戸塚ゆ加里、他. 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 25) 戸塚ゆ加里. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索. 第59回日本放射線影響学会、2016年10月、広島
- 26) 佐藤 春菜、戸塚ゆ加里、他. 多層カーボンナノチューブの繊維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響. 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば
- 27) 前迫裕也、戸塚ゆ加里、他. 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析. 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば

- 28) 戸塚ゆ加里、善家 茜、他. 次世代シーケンサーとDNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索、第 45 回日本環境変異原学会、2016 年 11 月、つくば G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
- 29) 楊光、伊吹裕子. たばこ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延、日本光医学光生物学会第 38 回年会、2016 年 7 月、京都 2. 実用新案登録
該当なし
- 30) 楊光、伊吹裕子. タバコ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延とカルボニル類の関与、第 29 回変異原機構研究会、2016 年 9 月、京都 3. その他
該当なし
- 31) 趙曉旭、伊吹裕子. 各種金属ナノ粒子によるヒストン修飾変化とその誘導メカニズムの検討、第 45 回日本環境変異原学会、2016 年 11 月、つくば
- 32) 楊光、伊吹裕子. 飽和/不飽和アルデヒド類によるヌクレオチド除去修復の阻害 第 45 回日本環境変異原学会、2016 年 11 月、つくば