

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 二重鎖切断マーカーである 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 28 年度は H2AX に関して、種差を検討するためのマウスを用いた動物実験、多施設共同研究に基づく提供膀胱サンプルを用いた解析、他臓器（肝・腎）への応用可能性について検討を行った。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 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、マウスに対して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された。また、皮下あるいは膀胱内投与による膀胱発がん性が知られる 3 物質（DMBA、BOP、MNU）を経口投与したラットにおいても H2AX の発現増加が認められ、潜在的な膀胱発がん性の指標になり得る可能性が示唆された。一方で、肝・腎に対する遺伝毒性発がん物質早期検出への応用には、細胞増殖活性に関連した H2AX 発現誘導など、検討すべき課題があると考えられた。

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巣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、化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに追加することで早期に検出できる病理組織学的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ーである 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 28 年度はこの H2AX について、発現の種差を検討するためのマウスを用いた動物実験、多施設共同研究に基づく提供膀胱サンプルを用いた発現解析、他臓器（肝・腎）への応用可能性について検討を行った。

B. 研究方法

6 週齢の雄 B6C3F₁ マウスに、0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)、0.6% 2-nitroanisole (2-NA)、0.025% 2-acetamidofluorene (2-AAF)、1% *p*-cresidine、0.125% 2,2-bis(bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、0.01%

dimethylarsinic acid (DMA)、0.45% melamine、3% uracil、0.04% glycidol、0.001% *N*-nitrosodiethylamine (DEN) および 0.005% acrylamide (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解析した。H2AX 陽性細胞を、その局在から basal/intermediate/umbrella cell の 3 種に分類した。2-AAF 投与群については、膀胱表層に位置する umbrella cell のマーカーである uroplakin III (UpkIII) 発現の検索も実施した。

名古屋市立大学 (F344 ラットに遺伝毒性発がん物質 8 種：3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)、*N*-nitroso-*N*-methylurea (MNU)、dimethylnitrosamine (DMN)、1,2-dimethylhydrazine (DMH)、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)、*N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) および 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 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：aminomethylphenylnorharman (AMPNH) および aminophenylnorharman (APNH) 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。

6 週齢の雄 F344 ラットに、肝臓検索用として遺伝毒性肝発がん物質：0.001% DEN および 0.015% 3,3'-dimethylbenzidine (DMB)、遺伝毒性非肝発がん物質：1% 4-chloro-*o*-phenylenediamine (COP) および 0.001% *N*-nitroso-*N*-ethylurea (ENU)、非遺伝毒性肝発がん物質：1.2% di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)

および0.5% 1,4-dioxane (D0)を、腎臓検索用として遺伝毒性腎癌がん物質：0.00625% *N*-nitrosomorpholine (NMOR), 0.01% tris(2,3-dibromopropyl)phosphate (TBPP)および0.05% potassium bromate (KBrO₃)、非遺伝毒性腎癌がん物質：2% trisodium nitrilotriacetic acid monohydrate (NTA)および150 mg/kg *d*-Limonene、非癌がん性腎毒性物質：2% carboxin (CBX)を4週間経口投与し、投与終了時または2週間の休薬後に解剖し、それぞれ肝細胞と腎尿管上皮細胞における H2AX 発現を解析した。

(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

マウス膀胱における H2AX 発現：4 週投与終了時の検討において、遺伝毒性膀胱癌がん物質である 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 陽性細胞の有意な増加が認められた (図 1、2)。一方、マウスに対し膀胱癌がん性のない 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。2 週間の休薬後においても、BBN および *p*-cresidine 投与群の H2AX 発現レベルは対照群と比較して有意に高かった。

Ki67 発現の検索では、BBN、*p*-cresidine、PEITC および uracil 投与群で有意な増加がみられた (図 3)。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 発現の上昇もみられなかった (図 4)。2-AAF 投与ラットの Upk III 発現は対照群と変化がなかったのに対し、マウスでは Upk III 陽性 umbrella cell の減少と配列の乱れが観察された。

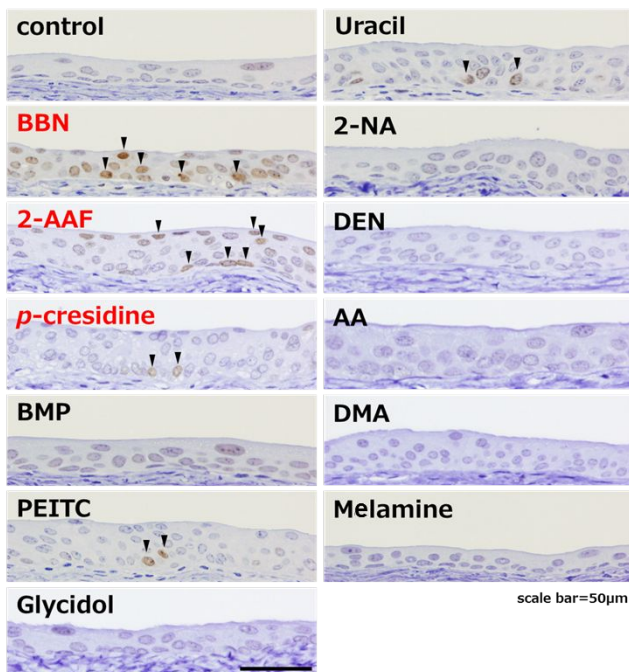


図 1. マウス膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 発現 (矢頭： H2AX 陽性細胞)

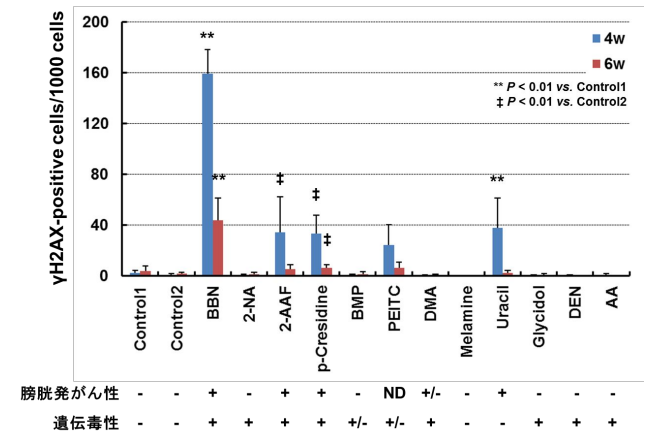


図 2. マウス膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞の定量解析

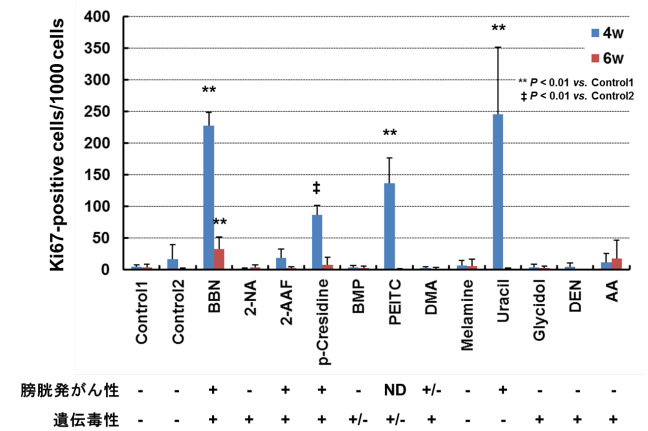


図 3. マウス膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析

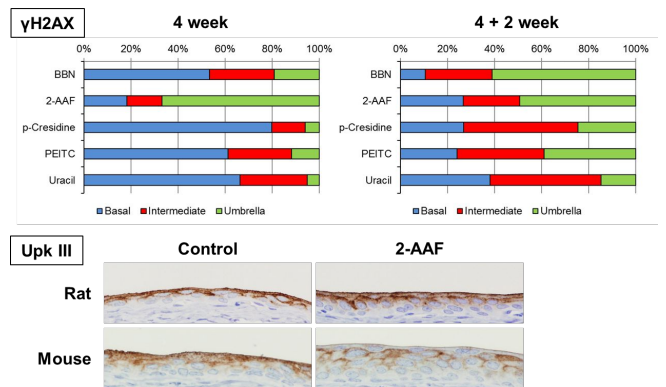


図 4. (上) マウス膀胱粘膜の H2AX 陽性細胞における basal/intermediate/umbrella cell の割合 (下) 2-AAF 投与ラットおよびマウス膀胱における Upk III 発現

他施設提供膀胱サンプルにおける H2AX 発現：8 種の遺伝毒性癌がん物質を投与したラット膀胱における 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(図5)。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 (data not shown)。

4 週間の APNH (アニリンのノルハルマン代謝物) 投与により、膀胱粘膜における H2AX 陽性細胞は有意に増加した(図6)。2 週間の休薬後には減少したが、対照群よりも高い発現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、4 週時点で 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。

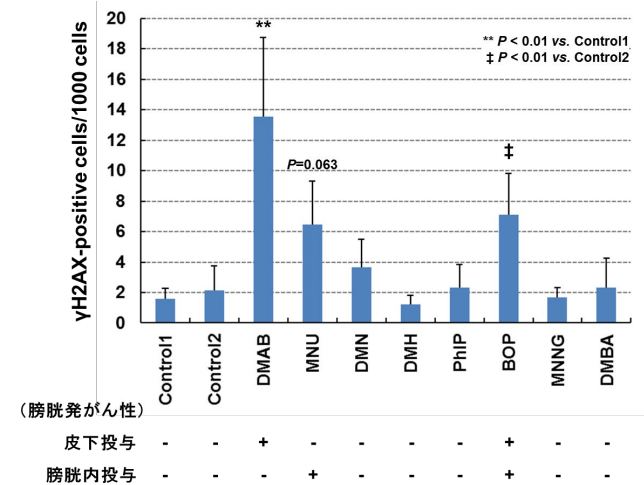


図5.ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞の定量解析 (名古屋市立大学提供サンプル)

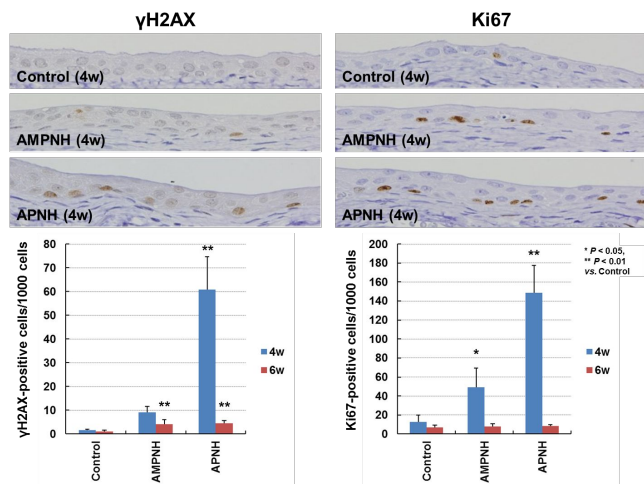


図6.ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX/Ki67 発現および定量解析 (国立がん研究センター研究所提供サンプル)

肝・腎における H2AX 発現: 遺伝毒性肝発がん物質 (DEN/DMB) のうち、DEN 投与群では核内の点状陽性巣である H2AX foci 発現細胞の有意な増加が認められた一方、DMB 投与群では対照群と同じレベルであった(図7)。肝臓を標的としない遺伝毒性発がん物質

(COP/ENU)、非遺伝毒性肝発がん物質 (DEHP/DO) を投与した群では、H2AX foci の増加はみられなかった。

遺伝毒性腎発がん物質 (NMOR/TBPP/KBrO₃) のうち、NMOR および KBrO₃ 投与群では H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められ、TBPP 群では増加傾向がみられた(図8)。一方で、非遺伝毒性腎発がん物質 (NTA/d-Limonene) のうち d-Limonene 投与群において、再生尿細管を除外した検索においても H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた。

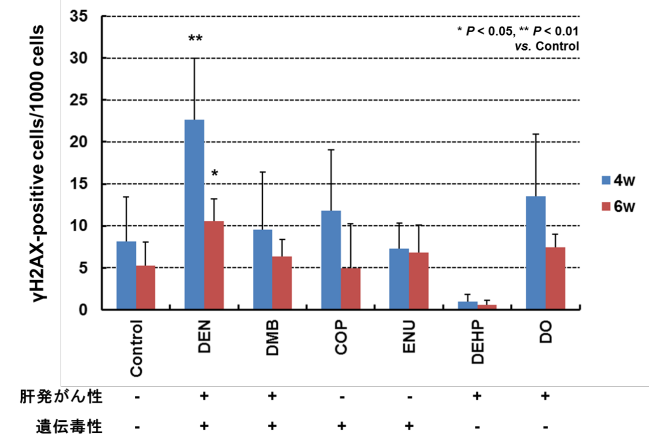


図7.ラット肝細胞における H2AX (foci) 陽性細胞の定量解析

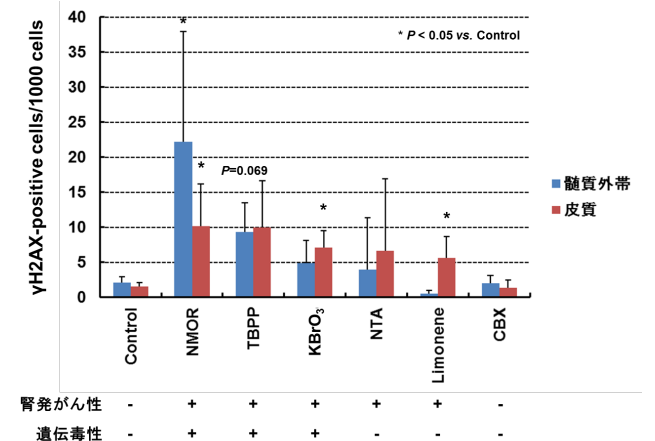


図8.ラット腎尿細管上皮細胞 (再生尿細管を除く) における H2AX 陽性細胞の定量解析

D. 考察

マウス膀胱における H2AX 発現: 今回の結果から、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。2-AAF 投与群にみられた H2AX 陽性細胞は、ラットでは基底層の basal cell に多かったのに対し、マウスでは表層の umbrella cell が主体であった。2-AAF はマウス膀胱の umbrella cell に細胞傷害を誘導するとの報告があり (Frith et al., Invest Urol, 1981)。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可能性が考えられた。また、PEITC および uracil 投与群においても、過形成を伴った H2AX/Ki67 陽性細胞

胞の有意な増加が認められたことから、細胞増殖活性に関連した H2AX 発現を考慮する必要があると思われた。

他施設提供膀胱サンプルにおける H2AX 発現：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 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。

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 (Kawamori et al., *Carcinogenesis*, 2004) 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。AMPNH 投与群においても、休薬後に対照群と比較して高い H2AX 発現レベルを維持しており、膀胱発がんに寄与する可能性があると思われた。

肝・腎における H2AX 発現：肝細胞における H2AX foci 陽性細胞は、DEN 投与群で有意に増加した一方、DMB 投与群では対照群と同じレベルであった。遺伝毒性肝発がん物質早期検出指標としての H2AX の応用には、これら 2 物質による肝発がん機序の差異等、検討すべき課題があると考えられた。

腎近位尿細管上皮細胞における H2AX 発現は、遺伝毒性腎発がん物質の投与によって増加した。一方で、非遺伝毒性腎発がん物質や腎毒性物質を投与した群においても、再生尿細管に一致した H2AX 発現が認められた。腎臓に対する H2AX の応用には、細胞増殖活性に関連した H2AX 発現を考慮する必要があると考えられた。

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) Cho YM, Hasumura M, Imai T, Takami S, Nishikawa A, Ogawa K. Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water. *J Appl Toxicol*, in press
- 2) Hirata T, Cho YM, Toyoda T, Akagi J, Suzuki I, Nishikawa A, Ogawa K. 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
- 3) Nonaka M, Amakasu K, Saegusa Y, Naota M, Nishimura T, Ogawa K, Nishikawa A. Non-neoplastic lesions found only in the two-year bioassays but not in shorter toxicity studies of rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 86: 199-204, 2017
- 4) Matsushita K, Toyoda T, Inoue K, Morikawa T, Sone M, Ogawa K. Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat. *J Toxicol Pathol*, 30: 57-62, 2017
- 5) Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J,

Nakamura Y, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, Ogawa K. Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity. *J Appl Toxicol*, 37: 485-494, 2017

6) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. 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

7) Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Park EY, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol*, 29: 237-246, 2016

2. 学会発表

- 1) 曾根瑞季、豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子：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、名古屋、2016 年 6 月 29 日
- 2) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、松下幸平、西川秋佳、小川久美子 . 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、東京、2016 年 9 月 17 日
- 3) 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、横浜、2016 年 10 月 6 日
- 4) 赤木純一、横井雅幸、豊田武士、曹永晩、花岡文雄、小川久美子 . 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、横浜、2016 年 10 月 8 日
- 5) 豊田武士、鈴木周五、加藤寛之、曾根瑞季、松下幸平、曹永晩、赤木純一、井上薫、高橋智、西川秋佳、小川久美子 . 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、大阪、2017 年 1 月 26 日
- 6) 曾根瑞季、豊田武士、松下幸平、森川朋美、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子 . 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、大阪、2017 年 1 月 26 日
- 7) Toyoda T, Sone M, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Nishikawa A, Ogawa K. H2AX expression is a biomarker of genotoxic carcinogen in the urinary bladder of rodents. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore, 2017.3.14

8) Sone M, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Nishikawa A, Ogawa K. Detection of *in vivo* genotoxicity in rat liver and kidney using H2AX expression. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore, 2017.3.14

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