

## 前立腺を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発

分担研究者 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 を投与したラットにおいて、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki67 発現が有意に上昇することを見いだした。発がん物質投与 2 日後に、前立腺組織において  $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki67 の標識率が前立腺発がん物質で上昇する一方で、前立腺に標的性のない発がん物質では対照群と差がないことを確認した。一昨年は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、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2、Ki-67 標識率の有意な上昇を確認した。去年から今年にかけて、28 日間反復経口投与毒性試験への応用を目標として、4 週間の PhIP、DMAB、MNU および BOP を主体とする発がん物質の経口投与実験を行った結果、HMGB2 および Ki67 において前立腺発がん物質特異的に有意な標識率上昇を認める一方で、前立腺に標的性のない発がん物質においては対照群との差が見られなかった。 $\gamma$ -H2AX は前立腺発がん物質での発現上昇傾向を認めたものの、DMAB 以外は有意な差がなかった。以上の結果から、28 日間反復経口投与毒性試験で採取された前立腺組織を用いて前立腺発がん物質を検出できる可能性を示し、その検出マーカー候補タンパクとして HMGB2 および Ki67 を同定した。

### 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。

我々は以前に、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 ( $\gamma$ -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、 $\gamma$ -H2AXは標識率が0.02%と低いことから値変動が大きく、検出力が相対的に低く、検出マーカーとして使用するには不適當である可能性が示された。

また、一昨年度は、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、 $\gamma$ -H2AXはラットにおいて染色問題が生じたものの、ヒト $\gamma$ -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。

去年度は、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、28日間反復経口投与毒性試験への応用を目標として実験を行った。去年度は、前立腺発がん物質のDMAB および N-Methyl-N-nitrosourea(MNU) で、HMGB2やKi67の有意な標識率上昇を認める一方で、 $\gamma$ -H2AXはDMABのみ有意な標識率上昇が存在した。前立腺に標的性のない発がん物質である Dimethylnitrosamine (DMN) や 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) については対照群と差がなかった。

今年度は、残り2つの前立腺発がん物質PhIPと、N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)を主体に同様の実験を行った。また、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。

## B . 研究方法

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、 $\gamma$ -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。

## C . 研究結果

4週間の経口投与実験において、PhIP投与による  $\gamma$ -H2AX の有意な標識率上昇は見られなかったものの、他は  $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki67 いずれにおいても 2 日間投与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出来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。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

外国語論文

- 1) Kato H, Naiki-Ito A, Naiki T, Suzuki S, Yamashita Y, Sato S, Sagawa H, Kato A, Kuno T and Takahashi S: Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget* 7: 2009-2021, 2016.
- 2) Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Suzuki S, Mori H and Takahashi S: Preventive effects of fermented brown rice and rice bran

against prostate carcinogenesis in TRAP rats. *Nutrients* 8: 421, 2016.

- 3) Sato S, Katsushima K, Shinjo K, Hatanaka A, Ohka F, Suzuki S, Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S and Kondo Y: Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer research* 76: 4192-4204, 2016.
- 4) Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Sawada T, Akashi H, Inoue M, Suzuki S, Inagaki Y, Hayashi N, Nishie H, Shimura T, Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Joh T: Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget* 7: 47242-47251, 2016.
- 5) Suzuki S, Mori Y, Nagano A, Naiki-Ito A, Kato H, Nagayasu Y, Kobayashi M, Kuno T and Takahashi S: Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 17: 2071, 2016.
- 6) 高橋智、鈴木周五、佐藤慎哉、内木綾、久野壽也：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、技術情報協会、pp27-31, 2016.
- 7) 鈴木周五、内木綾、加藤寛之、早川将史、高橋智：前立腺発癌と炎症、別冊 B10 Clinica、5 巻、84-88, 2016.

### 2 . 学会発表

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。